

Aus dem Institut Anatomie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
komm. Leiter: Prof. Dr. Timm J. Filler

Korrelation der CD 15-Expression und der raum-zeitlichen Expression
der synthetisierenden α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX
im murinen Gehirn

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Julia Domin
(2017)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. J. K. Mai

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. dent. A. Hugger

„Wahrheit kann niemals so
ausgesprochen werden, daß sie
verstanden und nicht geglaubt wird.“
(William Blake)

Zusammenfassung

Glykoproteine sind ein wichtiger Bestandteil unseres Organismus. Die α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX sind für die Synthese des Glykokonjugates CD 15 verantwortlich. Im Fokus steht hierbei die Bedeutung innerhalb Zell-Zell Kontaktmechanismen durch Glycosylierung von Zellen im Rahmen von Ad- und Dishäsions-Prozessen und ist relevant für Embryogenese, Neurogenese, Inflammation und Metastasierung.

Anhand von murinen Gehirnproben unterschiedlicher Hirnareale verschiedener Altersstufen (P0, P42, P365) wurde die Genexpression und Proteinbildung von den α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX, CD 15 und dem STAT 2 untersucht. Die Untersuchungen fanden anhand quantitativer PCR und Western Blot Analysen statt. Die Expression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX war innerhalb der einzelnen Hirnabschnitte nicht identisch und es wurden areal- und zeitspezifische Expressionsraten festgestellt. In den untersuchten Hirnarealen kam es in der Altersstufe P365 zu einem Anstieg der Genexpression von der α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX und Proteinbildung von CD 15. Innerhalb dieser Arbeit konnte die Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX und CD 15 für die Embryogenese, aber auch die Rolle innerhalb der postnatalen Reifung und Alterungsprozesses des Hirns bestätigt werden.

Ein Aspekt innerhalb Genexpression von α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX ist der notwendige Signaltransduktionsweg samt Botenstoffen wie STAT 2. Erste Untersuchungen zeigten, dass Fut4/Fut9 transfizierte Zellen ein erhöhtes Vorkommen von STAT 2 aufweisen. Die in dieser Arbeit korrelierenden Werte der STAT 2 zu CD 15 lassen Rückschlüsse zu, dass STAT 2 eine Funktion in der Genexpression von den α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX und Synthese von CD 15 innehält.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bisherige Untersuchungen die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX nur im Hirn in toto oder Unterteilung in Cerebrum und Cerebellum untersucht haben und keine Differenzierung in die einzelnen Hirnareale erfolgt ist. Mit dieser Studie konnte eine areal- und zeitspezifische Genexpression festgestellt werden. Durch die ermittelte, im Alter zunehmende Synthese von CD 15 wird die Bedeutung und direkte Korrelation zwischen den α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX und CD 15 deutlich und bestätigt die wichtige Funktion innerhalb der Embryogenese, festigt aber auch die Hypothese, dass sie darüber hinaus auch im reifen und alternden Hirn Funktionen in Neurogenese, Inflammation, Apoptose und Metastasenbildung innehält.

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Aqua bidest	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	<i>Aqua destillata</i> , einfach destilliertes Wasser
β	Beta
Bo	Bulbus olfactorius
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Cb	Cerebellum
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO₂	Kohlenstoffdioxid
C_t	Cycle Threshold – Schwellenwert-Zyklus
Cx	Cortex
Δ	Delta
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fut IV	Fucosyltransferase IV
Fut IX	Fucosyltransferase IX
fwd	Forward
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
>	Größer als
Hc	Hippocampus
HCl	Salzsäure
H₂O	Wasser
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
λ	Lamnda
M	Mol
max.	Maximal
Mes	Mesencephalon
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

MgCl₂	Magnesiumchlorid
ml	Mililiter
Mm	Mus musculus
mM	Milimol
Min.	Minute
NaCl	Natriumchlorid
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
Oligo dT	Oligo Desoxythymidin
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
§	Paragraph
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	Potentia Hydrogenii
P0	Postnatal 0 Tage alt
P42	Postnatal 42 Tage alt
P365	Postnatal 365 Tage alt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
%	Prozent
qPCR	quantitative PCR (Real-Time PCR)

Rb₂	Rabbit
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäureprotease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SG	SYBR Green
s.o.	siehe oben
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N – Tetramethylethylendiamine
Th	Thalamus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UNG	Uracil-N-Glycosylase
V	Vol

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	S. 26
Tab. 2	Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	S. 29
Tab. 3	Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	S. 30
Tab. 4	Inhalt 2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix	S. 31
Tab. 5	Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	S. 35
Tab. 6	Bestandteile des Protease Inhibitor Cocktails	S. 35
Tab. 7	Eichreihe	S. 36
Tab. 8	Zusammensetzung Proteinladepuffer	S. 40
Tab. 9	verwendete Primärantikörper	S. 43
Tab. 10	verwendete Sekundärantikörper	S. 43
Tab. 11	Belichtungszeiten der Antikörper	S. 44

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematischer Aufbau einer α (1,3) Fucosyltransferase	S. 02
Abb. 2	CD 15 Pathway (rechts) und schematischer Auszug der enzymatischen Umwandlung in Gal β 1,4(Fuca α 1,3)GlcNAc (links)	S. 03
Abb. 3	Selektin induzierte Leukozytenadhäsion	S. 04
Abb. 4	Schematische Darstellung des Glykokonjugats CD 15	S. 08
Abb. 5	Schematische Darstellung des Signaltransduktionsmechanismus STAT 2	S. 11
Abb. 6	Präparation murines Gehirn und anatomische Strukturen	S. 25
Abb. 7	Konzentration der extrahierten RNA	S. 28
Abb. 8	Thermocyclerprogramm für die qPCR	S. 32
Abb. 9	Amplifikationsplot (Versuchsmaus: e9j) für die untersuchten Gene	S. 33
Abb. 10	Relative Quantifizierung mittels $2^{-\Delta Ct}$ Methode	S. 34
Abb. 11	Beispiel-Standardgerade der Proteinbestimmung (Versuchsmaus e5j)	S. 37
Abb. 12	SeeBlue® Plus2 Marker	S. 40
Abb. 13	MagicMark™ XP Marker	S. 40
Abb. 14	Aufbau des Blot-Sandwich	S. 41
Abb. 15	Beispiel Ponceau-Färbung der PVDF-Membran	S. 42
Abb. 16	Beispielplot des Western Blots CD15 (Versuchsmaus e5j)	S. 45
Abb. 17	Ein Beispiel der Ergebnisse der densitometrischen Analyse (Versuchsmaus e5j)	S. 45
Abb. 18	Genexpression α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV der Altersstufen P0, P42 und P365 in toto (Summe Regionalwerte)	S. 50
Abb. 19	Genexpression Altersstufe P0	S. 51
Abb. 20	Genexpression Altersstufe P42	S. 52
Abb. 21	Genexpression Altersstufe P365	S. 53

Abb. 22	Vergleich der Genexpression von Fut IX der Altersstufen P0, P42, P365	S. 55
Abb. 23	Vergleich der Genexpression von Fut IV der Altersstufen P0, P42, P365	S. 56
Abb. 24	Beispiel Western Blot: β -Tubulin II Alterstufe P365 (Versuchsmaus e2j)	S. 57
Abb. 25	Western Blot: Fut IX Alterstufe P0 (Versuchsmaus eprot) (siehe Abb. links) samt Präimmunserum Rb2 (Versuchsmaus eprot) (siehe Abb. rechts)	S. 58
Abb. 26	Western Blot: CD15 Alterstufe P0 (Versuchsmaus eprot)	S. 59
Abb. 27	Western Blot: STAT 2 Alterstufe P0 (Versuchsmaus eprot)	S. 59
Abb. 28	Proteinmenge Altersstufe P0	S. 60
Abb. 29	Western Blot: Fut IX Alterstufe P42 (Versuchsmaus e5j) (siehe Abb. links) samt Präimmunserum Rb2 (Versuchsmaus e5j) (siehe Abb. rechts)	S. 61
Abb. 30	Western Blot: CD15 Alterstufe P42 (Versuchsmaus e6j)	S. 62
Abb. 31	Western Blot: STAT 2 Alterstufe P42 (Versuchsmaus e5j)	S. 62
Abb. 32	Proteinmenge Altersstufe P42	S. 63
Abb. 33	Western Blot: Fut IX Alterstufe P365 (Versuchsmaus e12j) (siehe Abb. links) samt Präimmunserum Rb2 (Versuchsmaus e12j) (siehe Abb. rechts)	S. 64
Abb. 34	Western Blot: CD15 Alterstufe P365 (Versuchsmaus e2j)	S. 65
Abb. 35	Western Blot: STAT 2 Alterstufe P365 (Versuchsmaus e4j)	S. 65
Abb. 36	Proteinmenge Altersstufe P365	S. 66
Abb. 37	Verlauf der relativen Densität entlang der Altersstufen	S. 67
Abb. 38	Vergleich der Altersstufen Fucosyltransferase IX	S. 68
Abb. 39	Vergleich der Altersstufen CD15	S. 69
Abb. 40	Vergleich der Altersstufen STAT 2	S. 69

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1-13
1.1 α (1,3) Fucosyltransferasen	2-7
1.1.1 α (1,3) Fucosyltransferase IV	4-6
1.1.2 α (1,3) Fucosyltransferase IX	6-7
1.2 Das Glykokonjugat (Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc): CD15, FAL, Lewis(x)	7-9
1.2.1 CD15 – Vorkommen und differenzierte Funktionen	8-9
1.3 Regulation der CD15 Expression – Zelluläre Signaltransduktion	9-11
1.3.1 STAT 2 (signal transducers and activators of transcription)	10-12
1.3.2 Inflammatorische Prozesse im Körper - Leukozytenantwort	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material	14-23
2.1 Tiere	14
2.1.1 verwendete Mauslinie	14
2.1.2 Haltung und Zucht	14
2.1.3 Einteilung der Versuchstiere	14
2.2 Enzyme	14
2.2.1 Kits	14-15
2.2.2 Primer	15
2.3 Antikörper	15-16
2.3.1 Primärantikörper	15
2.3.1 Sekundärantikörper	15-16
2.4 Chemikalien	16-17
2.5 Puffer und Lösungen	17-20
2.6 Sonstige Reagenzien	20-21
2.7 Laborgeräte	21-22
2.8 Labor- und Verbrauchsmaterial	22-23
3. Methoden	24-47
3.1 Präparation der Versuchstiere	24-26
3.2 RNA Extraktion aus murinem Gewebe	26-29
3.2.1 Konzentrationsbestimmung der RNA	27-28
3.2.2 Reverse Transkription der RNA	28-29
3.3 Quantitative PCR (qPCR)	30-35
3.3.1 Primer	34-35
3.4 Proteinisolation aus murinem Gewebe	35-38
3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	36-38
3.5 Quantifizierung der Proteine durch Western Blot Analyse	38-46

3.5.1	Polyacrylamid – Gel – Elektrophorese (PAGE)	38-41
3.5.2	Western Blotting	41-42
3.5.3	Immunochemische Detektion	42-46
3.5.4	Entfernung der gebundenen Antikörper	46-47
3.5.5	Methodenspezifität	47
4.	Ergebnisse	48-70
4.1	Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX	48-53
4.1.1	Quantität der Genexpression muriner Hirnareale in toto	49-50
4.1.2	Quantität der Genexpression in den unterschiedlichen murinen Hirnarealen	50-54
4.1.3	Veränderung während der Altersentwicklung	55-56
4.2	Immunochemische Detektion der Proteine	56-70
4.2.1	Quantität der Proteinmengen in der Altersstufe P0	57-60
4.2.2	Quantität der Proteinmengen in der Altersstufe P42	61-64
4.2.3	Quantität der Proteinmengen in der Altersstufe P365	64-66
4.2.4	Veränderung während der Altersentwicklung	67-70
5.	Diskussion	71-84
5.1	Die Versuchstiere – Mus musculus C57B1/6	71
5.2	Genexpressionsrate der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX – Methode qPCR	72
5.3	Vorkommen der α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX in den Unterschiedlichen Hirnarealen	73-75
5.4	Quantifizierung der Proteine der α (1,3) Fucosyltransferasen IX, CD15, STAT2 - Methode Western Blot	75-76
5.5	Korrelation zwischen der α (1,3) Fucosyltransferasen IX und CD15	76-78
5.6	Signaltransduktionsweg – STAT 2	78-79
5.7	Mögliche Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX und CD15 im Gehirn während des Alterns	79-82
5.8	Schlussfolgerung	82-84
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis	85-92
7.	Danksagung	
8.	Eidesstattliche Versicherung	

1. Einleitung

Fast alle Proteine auf den Zelloberflächen von Organismen haben eine Kohlenhydratverknüpfung und gehören zu der Gruppe der Glykokonjugaten. Aufgrund des zahlreichen, artenübergreifenden Vorkommens ist die Untersuchung ihrer Struktur, Funktion und Wirkungsweise von besonderer Bedeutung. Glykokonjugate liegen in einer hohen, strukturellen Vielfalt vor und weisen durch spezielle Modifikationen wie z.B. Sulfatierung oder Phosphatierung eine hohe Diversität auf. Die obligate Zuckerverknüpfung erfolgt hierbei entweder über eine Sauerstoff- (O) oder Stickstoffverbindung (N). Somit werden demnach O- und N-Glykane unterschieden. Die Biosynthese der Kohlenhydratverbindung der N-Glykane startet im Zytosol der jeweiligen Zelle. Dem folgen Syntheseschritte im Endoplasmatischen Retikulum und zuletzt Golgi-Apparat. O-Glykane werden im Golgi-Apparat zusammengesetzt [Helenius and Aebi, 2004; Moremen et al., 2012].

Betrachtet man die Biosynthese des N-Glykans *Gal β 1,4(Fuca α 1,3)GlcNAc (α 1,3fucosyl-N-acetyllactosamin)*, so wird zunächst aus einem Fructose-6-Phosphat GDP-Mannose synthetisiert. Durch weitere enzymatische Modifikationen im Endoplasmatischen Retikulum wird aus diesem Mannose-Donor der Oligosaccharid Dolichylpyrophosphat-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Im späteren Verlauf erfolgt die Transferierung des Oligosaccharidrests auf ein Protein und die enzymatische Abspaltung von drei Glucoseresten im Endoplasmatischem Retikulum sowie von sechs Mannoseresten im Golgi-Apparat. Im Anschluss findet noch die Verknüpfung eines Fucoserestes mit einem N-acetyllactosamin statt und das N-Glykan *Gal β 1,4(Fuca α 1,3)GlcNAc* entsteht.

Glykoproteine sind essentiell für den Organismus und bereits geringfügige Defizite oder Defekte haben zum Teil fatale Folgen für Adhäsionsprozesse in Zell-Zell Interaktionen, welche zu Entwicklungsstörungen führen können [Jaeken and Matthijs, 2007]. Verantwortlich für die benötigte enzymatische Verknüpfung der Zuckerreste auf die jeweiligen Proteine sind die sogenannten Transferasen. Zu ihnen zählen die α (1,3) Fucosyltransferasen, welche für die Bildung des Glykoproteins, dem *Gal β 1,4(Fuca α 1,3)GlcNAc* verantwortlich sind.

1.1 α (1,3) Fucosyltransferasen

Bisher sind uns aus der Familie der humanen α (1,3) Fucosyltransferasen sechs unterschiedliche Typen bekannt. Die Fucosyltransferase III (FucT III) [Kukowska-Latallo et al., 1990], die Fucosyltransferase IV (FucT IV), welche ein myeloidales Enzym darstellt [Goelz et al., 1990; Lowe et al., 1991], die Fucosyltransferase V (FucT V) [Weston et al., 1992a], die Fucosyltransferase VI (FucT VI) [Weston et al., 1992b], die Fucosyltransferase VII (FucT VII) [Natsuka et al., 1994] und die Fucosyltransferase IX (FucT IX) [Kaneko et al., 1999]. Die α (1,3) Fucosyltransferasen gehören zu den Typ II Transmembran-Glykoproteinen. Sie werden vom Golgi-Apparat per Vesikel zur Zellmembran transportiert. Sie bestehen aus einem N-terminalen Schwanz, einer Membranumfassenden Region, dem Stamm und einem C-terminalen katalytischem Zentrum im Lumen des Golgi-Apparates (siehe Abbildung 1) [Paulson and Colley, 1989].

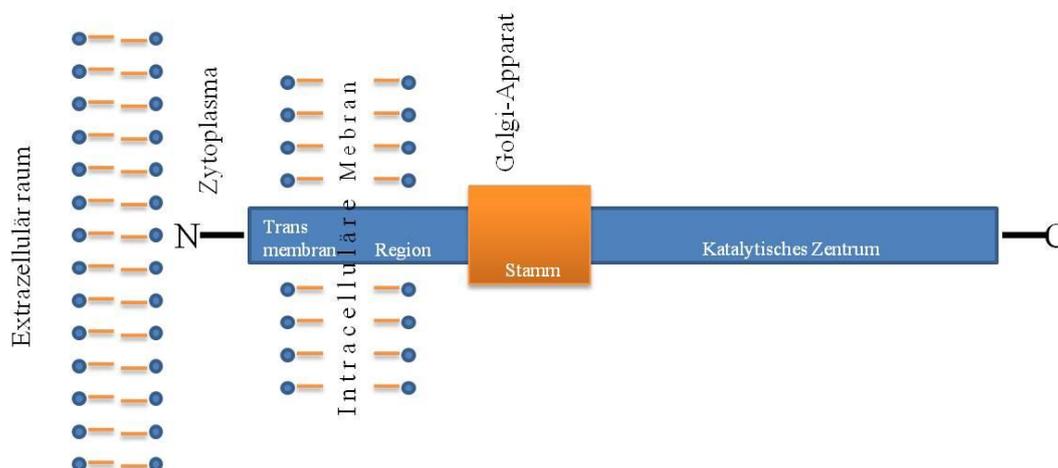


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer α (1,3) Fucosyltransferase

Dargestellt von links nach rechts: N-terminaler Schwanz (schwarz), Membranübergreifende Region (blau), Stamm (gelb), Katalytisches Zentrum (blau) und C-terminaler Rest (schwarz), die Lokalisation reicht von dem Zytoplasma über die Zellmembran bis zum Golgi-Apparat.

Fucosyltransferasen ähneln sich untereinander durch einen hohen Anteil an homologen Aminosäuren-Sequenzen - die α (1,3) Fucosyltransferase IV und α (1,3) Fucosyltransferase IX sind zu 40% kongruent in der Aminosäuresequenz [Vries et al., 2001]. Trotz der vorhandenen Homologie im Aufbau sind die einzelnen α (1,3) Fucosyltransferasen äußerst heterogen in ihrer Funktion und substratspezifisch [Dupuy et al., 1999; Xu et al., 1996]. Generell betrachtet,

dienen die Fucosyltransferasen zur Katalyse der Reaktion der Fucosylierung von Glycokonjugaten. Hierbei kommt es durch den Transfer der Fucose-Gruppe von dem Donor GDP-Fucose zum Akzeptor N-acetyllactosamin auf N-acetyllactosamin zu $\text{Gal}\beta 1,4(\text{Fuc}\alpha 1,3)\text{GlcNAc}$ ($\alpha 1,3$ fucosyl-N-acetyllactosamine) (siehe Abbildung 2) [Becker and Lowe, 2003]. Das $\text{Gal}\beta 1,4(\text{Fuc}\alpha 1,3)\text{GlcNAc}$ ist unter dem Begriff **CD 15** (*leucocyte cluster of differentiation 15*) oder ferner auch unter **Lewis (x) (Le^x)** und **SSEA-1** (*stage-specific embryonic antigen 1*) aufgeführt. Die α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX katalysieren somit die Synthese von CD 15, sind aber darüber hinaus noch für weitere Katalyse-Schritte verantwortlich, welches die komplexe Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferasen unterstreicht [Mai, 2002] (siehe Abbildung 2).

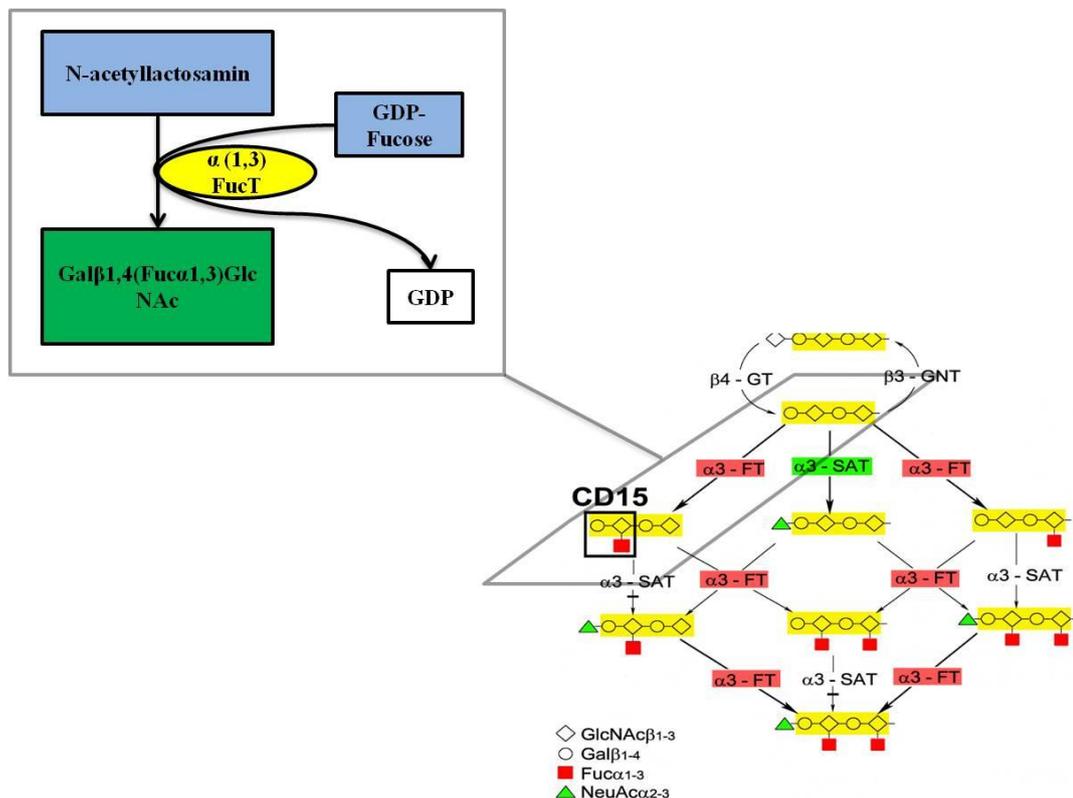


Abb. 2: CD 15 Pathway (rechts) und schematischer Auszug der enzymatischen Umwandlung in $\text{Gal}\beta 1,4(\text{Fuc}\alpha 1,3)\text{GlcNAc}$ (links)

Schema links = Gelb: Enzym α (1,3)Fucosyltransferase, Blau: Substrat GDP-Fucose und N-acetyllactosamin, Grün: Produkt $\text{Gal}\beta 1,4(\text{Fuc}\alpha 1,3)\text{GlcNAc}$; Schema rechts = Gelb: N-acetyllactosamin, Rot: Fucosylrest, GT: Glycosyltransferase, GNT: N-acetylglycosamintransferase, SAT: Sialyltransferase, FT: Fucosyltransferase, Schwarz umrandet: CD 15, grauer Kasten markiert Synthese Schritt CD 15. (Quelle Schema rechts: mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Mai)

1.1.1 α (1,3) Fucosyltransferase IV

Das Gen der humanen α (1,3) Fucosyltransferase IV ist auf dem Chromosom 11q21 lokalisiert [Reguigne et al., 1994] und zu fast 80% homolog zur murinen α (1,3) Fucosyltransferase IV [Ozawa and Muramatsu, 1996], welche auf dem Chromosom 9, Cytoband A3 nachgewiesen wurde [Gersten et al., 1995]. Die α (1,3) Fucosyltransferase IV gehört zu den sogenannten myeloidalen Fucosyltransferasen und katalysiert die Synthese von Selektin bindenden Glykokonjugaten wie CD 15 (siehe Kapitel 1.1). Es sind bisher drei Selektinarten bekannt, welche eine Rolle innerhalb der Zell-Zell-Interaktionen samt Adhäsion spielen und in Zusammenhang mit der α (1,3) Fucosyltransferase IV stehen: L-, E- und P-Selektine [Lowe, 1997; Martinez et al., 2005; Vestweber and Blanks, 1999]. Die benötigte Glykostruktur für die jeweiligen Liganden stellt das Glykokonjugat CD 15 dar [Huang et al., 2002]. Ihr früherer Name ELAM-1-Ligand Fucosyltransferase bezog sich auf die ihrerseits induzierte Leukozytenadhäsion während inflammatorische Prozesse [Kumar et al., 1991] – ELAM-1 = *endothelial – leucocyte adhesion molecule 1*. Nach Aktivierung des E-Selektins durch CD 15 kommt es zur Bindung an den E-Selektin Liganden 1, welcher den Adhäsionsprozess und die Adhäsionsgeschwindigkeit der Leukozyten innerhalb des als „Homing“ bezeichneten Prozesses im Rahmen von Inflammation bestimmt (siehe Abbildung 3) [Vestweber, 2003; Vestweber, 2007a; Weninger et al., 2000].

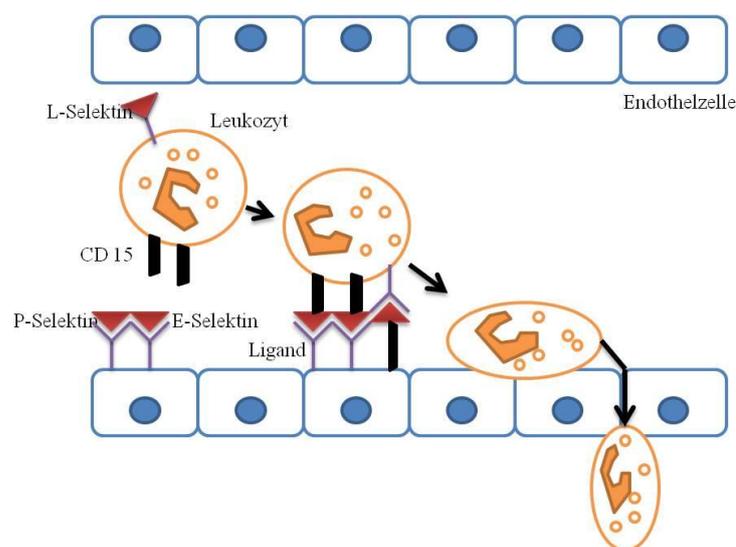


Abb. 3: Selektin induzierte Leukozytenadhäsion

E-, P- und L-Selektin = rotes Dreieck, lila = Selektin bindende Liganden, schwarz = Glykokonjugat CD 15, Endothelzellen = blau, Leukozyt = orange

Die α (1,3) Fucosyltransferase IV ist aber nicht nur für die Leukozyteneinwanderung bedeutsam sondern spielt auch bei anderen „*Homing*“ - Prozessen eine wichtige Funktion, z.B. bei der Embryogenese (siehe unten).

So wurde in den ersten zwei Monaten der frühen pränatalen Entwicklung bereits eine erhöhte Expressionsrate der α (1,3) Fucosyltransferase IV erfasst und ihr eine wichtige Rolle in der Initiation von Zell-Zell Adhäsion während der Embryogenese zugesprochen [Cailleau-Thomas et al., 2000].

Die bisher höchsten Werte bezogen auf die Genexpression der (1,3) Fucosyltransferase IV wurden für Leukozyten und epitheliale Zellen ermittelt [Allahverdian et al., 2006]. Auch die Rolle der α (1,3) Fucosyltransferase IV im Zusammenspiel mit der CD 15 Synthetisierung innerhalb Tumorprogression ist bereits bekannt. So ist ein Zusammenhang mit erhöhten Expressionsraten und verschiedenen Tumorerkrankungen wie Kolon-Carcinoma erwiesen [Kudo et al., 1998b; Taniguchi et al., 2000; Yang et al., 2012].

Die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV beschränkt sich nicht auf die genannten Zellarten und Gewebe sondern ist auch in Darm, Gehirn, Magen, Nieren und Uterus bereits nachgewiesen [Nishihara et al., 2003] [Gersten et al., 1995]. Die Genexpression im Gehirn wurde bereits in murinen und humanen Gewebeproben untersucht. Nishihara et al. untersuchten an Mäusen der Altersstufen P0, P7, P30 und P100 die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV. Die Gewebeproben wurden unterteilt in Cerebellum (mit Mesencephalon) und Cerebrum. Eine weitere Differenzierung der unterschiedlichen Hirnareale fand nicht statt. Die ermittelte Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV nahm mit zunehmendem Alter sowohl für das Cerebrum als auch für das Cerebellum (einschl. Mesencephalon) ab [Nishihara et al., 2003]. Anhand von Northern Blots wurden auch geringe Mengen an mRNA der α (1,3) Fucosyltransferase IV in Gewebeproben des Cerebrums (plus Cerebellum) von adulten Mäusen festgestellt aber nicht weiter spezifiziert [Gersten et al., 1995]. Im Gegensatz dazu fanden auch Untersuchungen an humanen Gewebeproben unterschiedlichen Alters statt. Die mittels qPCR bestimmte Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV des Vorderhirns

war im Vergleich zur Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX nahezu identisch [Kaneko et al., 1999].

Festzuhalten ist, dass eine detaillierte Untersuchung der regionalen Unterschiede der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV im murinen und humanen Gehirn zusammen mit einer Überprüfung eines zeitlichen Musters anhand von Altersstufen noch nicht erfolgt ist.

1.1.2 α (1,3) Fucosyltransferase IX

Das Gen der humanen α (1,3) Fucosyltransferase IX befindet sich auf dem Chromosom 6q16 und ähnelt im hohen Maße der murinen α (1,3) Fucosyltransferase IX [Kaneko et al., 1999], welche auf Chromosom 4, Cytoband A2 lokalisiert ist [Narimatsu, 2002]. Der Nachweis der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX ist in Gehirn (*in toto*), Nieren, Placenta, Pankreas sowie Milz, Magen und Leukozyten bereits erfolgt [Cailleau-Thomas et al., 2000]. Die α (1,3) Fucosyltransferase IX beeinflusst über die Synthese von CD 15 die Selektin abhängige Leukozytenadhäsion [Buffone et al., 2013] (siehe Abbildung 3 und Kapitel 1.1.1). Hierbei ist die α (1,3) Fucosyltransferase IX bisher aber nur in Zusammenhang mit der CD 15 induzierten Selektin abhängigen Zelladhäsionen von Granulozyten bekannt [Nakayama et al., 2001]. Auch sie besitzt Funktionen bei Zell-Zell Interaktionen während der Hirnentwicklung [Nishihara et al., 2003]. Sie ist jedoch nicht essentiell für die normale Embryogenese [Kudo et al., 2004; Shimoda et al., 2002].

Im Gegensatz dazu stellt die α (1,3) Fucosyltransferase IX für die Neurogenese einen wichtigen Faktor dar, da eine verminderte Expression die neuronale Entwicklung durch ein reduziertes Neuritenwachstum negativ beeinflusst [Gouveia et al., 2012]. Auch wurde ein Zusammenhang von Verhaltensauffälligkeiten wie vermehrte Angstzustände, Unruhe und der Expressionsrate von α (1,3) Fucosyltransferase IX aufgezeigt [Kudo et al., 2007]. Sie wird dementsprechend vor allem in Gehirngewebe exprimiert und ist quantitativ im heranreifenden und erwachsenen Gehirn, sowohl im Gewebe von *Mus musculus* als auch *Homo sapiens* am höchsten [Baboval et al., 2000; Kaneko et al., 1999]. Von der Arbeitsgruppe Nishihara et al. wurden Untersuchungen der Genexpression von der α (1,3) Fucosyltransferase IX an

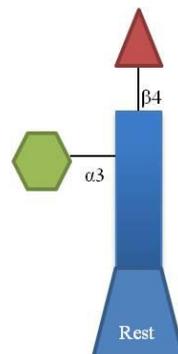
Mäusen der Altersstufe P0, P7, P30 und P100 durchgeführt. Als Gewebeproben dienten das entnommene Cerebrum und das Cerebellum (einschl. Mesencephalon) der präparierten *Mus musculus*. Die ermittelte Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX war für das Cerebrum zwischen P0 und P100 stetig abnehmend. Das Cerebellum (einschl. Mesencephalon) wies im Gegensatz zwischen der Altersstufe P0 und P7 eine temporäre Erhöhung der Genexpression auf. Ab P7 konnte erneut eine stetige Abnahme der Genexpression für die α (1,3) Fucosyltransferase IX festgestellt werden. Im Vergleich zur α (1,3) Fucosyltransferase IV wurden für das Cerebrum 30- bis 80-mal höhere Expressionsraten der α (1,3) Fucosyltransferase IX ermittelt. Die Genexpressionsraten des Cerebellum (inkl. Mesencephalon) waren 15- bis 100-mal so hoch wie die der α (1,3) Fucosyltransferase IV [Nishihara et al., 2003].

Eine weitere detaillierte Überprüfung der unterschiedlichen Hirnareale mit Bezug auf ein mögliches zeitliches Muster entlang unterschiedlicher Altersstufen liegt nicht vor.

1.2 Das Glykokonjugat (Gal β 1,4(Fuca1,3)GlcNAc): CD 15, FAL, Lewis (x)

CD 15 repräsentiert eine terminale (α 1,3)-fucosyl-N-acetyl-lactosamin Sequenz auf Glykoproteinen [Montreuil, 1980; Urdal et al., 1983] und Glykolipiden [Hakomori and Siddiqui, 1974; Kannagi et al., 1982; Magnani et al., 1984], die Adhäsions- oder Dishäsions – Prozesse [Feizi, 1991; Kerr and Stocks, 1992] vermitteln. Diese Sequenz wird auch als lacto-N-fucopentose III, X-hapten, Lex or stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) genannt [Marani and Mai, 1992]. Es wurde auf Blastomeren von Mausembryonen und in embryonalen Karzinomzellen entdeckt [Knowles et al., 1978]. Es ist sowohl in Glykoproteinen und Glykolipiden in Form einer Sauerstoff- oder Stickstoffverbindung vorzufinden (siehe auch Kapitel 1.1 und Abbildung 4). Die Funktionen des Glykokonjugats CD 15 beziehen sich auf Zell-Zell Interaktionen [La Fuente et al., 2005]. Für die Adhäsion der Zellen miteinander sind aber auch noch sogenannte Selektine erforderlich (siehe auch Kapitel 1.1.1). Für die CD 15 vermittelte Adhäsion sind E-, P- und L-Selektine verantwortlich. E-Selektin ist auf endothelialen Zellen, P-Selektin in Granula von Thrombozyten sowie Endothelzellen und L-Selektin auf Leukozyten nachgewiesen [Kobayashi et al., 2010]. Essentiell für eine Verbindung zwischen dem CD 15 und dem Selektin

sind die Liganden, welche spezifisch für jedes Selektin vorliegen [Vestweber, 2007b; Vestweber and Blanks, 1999] (siehe Kapitel 1.1.1 und Abbildung 3).



CD 15

Abb. 4: Schematische Darstellung des Glykokonjugats CD 15

unsialysierte Form des CD 15; blaues Rechteck: N-acetyllactosamin, blaues Trapez: Rest in Form einer Kohlenhydratkette mit einer O- oder N-Verknüpfung an ein Glykoprotein oder -lipid, grünes Hexagon: Fucose, rotes Dreieck: Galaktose.

1.2.1 CD 15 – Vorkommen und differenzierte Funktionen

Bereits im Morula-Stadium können CD 15 Epitope im Zusammenhang mit der Entstehung der Blastozyste durch Zell-Zell Interaktionen nachgewiesen werden [Bird and Kimber, 1984; Solter and Knowles, 1978]. In vielen Geweben wie dem Gastrointestinal-Trakt [Mollicone et al., 1985], dem Gehirn [Morres et al., 1992] und Zellen wie Leukozyten [Clarke and Watkins, 1996; Hession et al., 1990] ist CD 15 weit verbreitet. Auch ist es in Zellen des peripheren als auch des zentralen Nervensystems, vorzufinden [Gocht et al., 1994; Mai et al., 1995; Oudega et al., 1992]. Es ist bekannt, dass CD 15 in Zusammenhang mit der Einwanderung von Leukozyten in entzündliches Gewebe [Rosen, 1999] (siehe Abbildung 3), sowie pathologischen Prozessen wie Neoplasien und Metastasenbildung [Lowe, 2002; Nakamori et al., 1997] aber auch mit der Embryogenese [Eggens et al., 1989; Fenderson et al., 1984], Neurogenese [Ashwell and Mai, 1997b; Gotz et al., 1996; Marani and Mai, 1992] und Angiogenese [Koch et al., 1995; Nguyen et al., 1993] steht.

Einige Funktionen von CD 15 innerhalb der Neurogenese sind bereits detailliert beschrieben. So wurde CD 15 bereits in Gliazellen und Neuronen

nachgewiesen [Mai and Reifenberger, 1988; Reifenberger et al., 1987]. Auch wird eine altersabhängige Genexpression des Epitop CD 15 während Entwicklung, Erwachsenenalter und Alterung vermutet. Die Expression beginnt bereits pränatal während der cerebralen Hirnentwicklung. Postnatal findet sich die Expression von CD 15 in Neuronen und der folgenden Reifung des Cerebrums wieder. Zu einem noch späteren Zeitpunkt findet man die Genexpression des Epitops CD 15 in Astrozyten vermehrt vor [Bartsch and Mai, 1991]. Die Untersuchungen lassen Rückschlüsse auf die Bedeutung der Zelladhäsion bzw. – dishäsion von CD 15 während des postnatalen Hirnfaserwachstums zu. Demzufolge kann CD 15 mitverantwortlich für die Ausprägung und Reifung der Hirnmorphologie und Ausformung spezifischer zentralnervöser Strukturen wie Cerebellum, Nucleus geniculatus laterale oder Vorderhirn sein [Mai and Schonlau, 1992; Marani and Mai, 1992; Morres et al., 1992]. Bereits 1987 wurde von Tetteroo et al. eine Wechselwirkung zwischen α (1,3) Fucosyltransferasen und der Präsenz von Chromosom 11 in murinen Hybrid-Zellen vermutet. Glykokonjugate wie das CD 15 sind mit dem Chromosom 11 assoziiert und erste Untersuchungen zeigten eine Wechselwirkung der α (1,3) Fucosyltransferase IV und der Synthese von CD 15 [Couillin et al., 1991; Tetteroo et al., 1987]. Das Vorkommen von CD 15 steht in Relation mit der Expression der α (1,3) Fucosyltransferase und spiegelt sich in einem entsprechend erhöhten oder erniedrigten Angebot von CD 15 Epitopen im Gewebe wieder. Für Granulozyten, Monozyten und Promyelocyten wurde ein Zusammenhang zwischen Expression von CD 15 und α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX festgestellt [Nakayama et al., 2001]. Entsprechend der Regulation des CD 15 durch die α (1,3) Fucosyltransferasen können auch Metastasenbildung oder kanzerogene Prozesse beeinflusst werden. So wurde eine erhöhte Bildung von CD 15 durch die Überexpression von α (1,3) Fucosyltransferasen im Zusammenhang mit Metastasenbildung festgestellt [Kłopocki et al., 1998].

1.3 Regulation der CD 15 Expression - Zelluläre Signaltransduktion

Der Bildung des Glykokonjugats (Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc) geht ein zellulärer Signalweg voraus. Dies setzt die Kommunikation der Zellen untereinander, mit dem Nukleus und mit der Zelloberfläche voraus. Eine Möglichkeit die

Genexpression zu induzieren ist nach bisherigen Befunden die Aktivierung von speziellen Botenstoffen. Nach der Arbeitsgruppe von Leonard et al. zählen hierzu die sog. STATs. STATs (*signal transducers and activators of transcription*) gehören zu einer Familie von Transkriptions-Faktoren, welche auf verschiedene freigesetzte Zytokine wie Interferon α reagieren [Leonard and O'Shea, 1998]. Sie werden über einen Tyrosinkinase-Rezeptor aktiviert (siehe Abbildung 5). So sorgt die Bindung eines Zytokins an den entsprechenden Rezeptor für eine Oligomerisierung an die sich eine spezielle Thyrosinkinase, die sog. JAKs (*Janus Kinase*) anheften kann. Sowohl die JAKs als auch die STATs befinden sich zunächst ungebunden im Zytosol der jeweiligen Zelle. Sobald die JAKs aktiviert sind kommt es zu einer Phosphorylierung der STATs. Per SH2-Domäne wird eine Dimerisierung beider phosphorylierter STATs ermöglicht. Danach erfolgt eine Translokation des STATs-Dimers in den Zellkern, wo es durch DNA-Bindung zu einer Zytokin-getragenen Aktivierung der Gentranskription führt [Aaronson and Horvath, 2002; Heim et al., 1995]. Bisher sind sieben verschiedene STATs bekannt. Innerhalb dieser Arbeit fanden Untersuchungen der STAT 2 statt, da sie primär über das Zytokin Interferon α aktiviert wird, welches von den Leukozyten selbst sezerniert werden kann [Nadeau et al., 1999].

Ein Zusammenhang zwischen der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV, IX und der Aktivierung von STAT 2 wurde von der Arbeitsgruppe um Schwarz-Herzke et al. initial dargestellt. Eine Überexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX führten zu einem Anstieg der STAT 2 [Schwarz-Herzke, 2010b, a], so dass eine Wechselwirkung zwischen den α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX, CD 15 und dem STAT 2 nicht auszuschließen ist. Die Hypothese besteht, dass die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX durch STAT 2 induziert wird und so einen Einfluss auf die Synthese von CD 15 hat.

1.3.1 STAT 2 (Signal transducers and activators of transcription)

STAT 2 benötigt zur Aktivierung die Bindung von Interferonen des Typ I wie z.B. Interferon α . Wie in Kapitel 1.3 beschrieben kommt es zur Dimerisierung der STAT 2 und zur Translokation in den Zellkern. STAT 2 ist einzigartig unter den

STATs, da es nach der Phosphorylierung einen trimeren, komplexen Verbund mit IRF-9 (*Interferon regulatory factor-9*) und einem STAT 1 Monomer eingeht. Dieser Komplex wird auch ISGF3 (*IFN-stimulated gen factor 3*) genannt, welcher an einen spezifischen Promoter des Gens andockt und die Transkription beeinflusst (siehe Abbildung 5) [Lau et al., 2000; Levy and Darnell, 2002; Park et al., 2000a]. Die mögliche Regulation der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX durch STAT 2 und der folgenden Synthese von CD 15 läßt weitere Rückschlüsse auf die Bedeutung von STAT 2 während der Neurogenese zu. Ferner ist die ISGF3 abhängige Genexpression essentiell für eine funktionierende und erfolgreiche Abwehrreaktion. So haben Untersuchungen mit Mäusen, die unter einem Defizit von STAT 1, STAT 2 oder IRF-9 litten, demonstriert, dass die betroffenen Tiere nicht in der Lage waren eine Infektion zu vermeiden oder langfristig zu überleben [Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996; Park et al., 2000b].

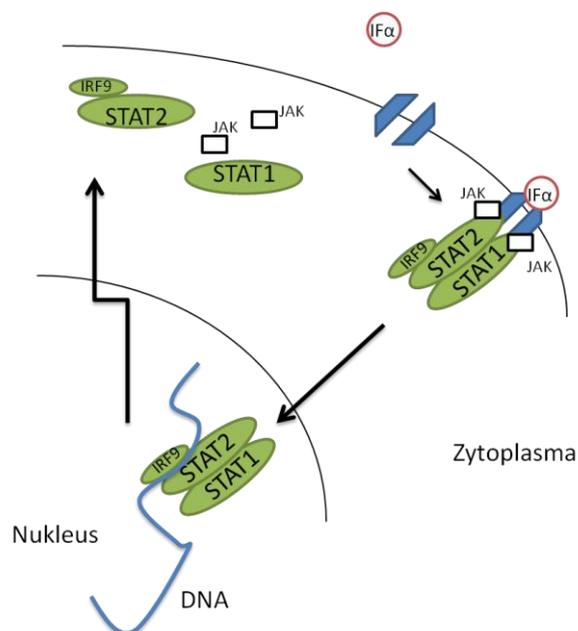


Abb. 5: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsmechanismus STAT 2
 Grün: STAT 1, STAT 2, IRF9; blau: DNA; schwarz: JAKs; rot: Interferon α ; man erkennt die Bindung des Interferons an den Rezeptor auf der Zelloberfläche, welche eine Phosphorylierung der JAKs und der STATs zur Folge hat. Daraufhin bildet sich der trimerische Komplex ISGF3, welcher aus IRF9, STAT 1 und STAT 2 besteht. Dieser transloziert in den Zellkern und dockt an einen spezifischen Promotor der DNA an und aktiviert die Genexpression.

Die mögliche Beziehung zwischen der Genexpression von den α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX und CD 15 einerseits und STAT 2 andererseits, lassen die Hypothese zu, dass deren Wechselwirkung für inflammatorische Prozesse mitverantwortlich sein kann.

1.3.2 Inflammatorische Prozesse im Körper - Leukozytenantwort

Schon lange ist bekannt, dass Entzündungsprozesse für die Intakthaltung des physiologischen Systems verantwortlich sind. Sofern möglich, werden Fremdkörper isoliert, Bakterien und sonstige schädliche Eindringlinge abgetötet oder unschädlich gemacht. Eine tragende Rolle spielen hierbei Leukozyten (siehe Kapitel 1.1). Leukozyten lassen sich in drei Untergruppen aufteilen: Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten. Je nach Tageszeit und Zustand des physiologischen Systems schwankt ihre vorhandene Anzahl im Körper. Jedoch befinden sich >50% der existierenden Leukozyten im extravasalen, interstitiellen Raum. Rund $\geq 30\%$ sind im Knochenmark lokalisiert. Als bevorzugter Transportweg während der Zirkulation werden die Blutgefäße genutzt [Zacharowski, 2007]. Sind die Leukozyten am erwünschten Ort angekommen, penetrieren sie die Gefäßwand (siehe Kapitel 1.1) mittels Selektinen und gelangen so auf die abluminale Seite der Gefäßwand (Leukodiapedese). Zur kontrollierten Steuerung der Leukozyten und kontrollierten Bekämpfung der Noxen dient die Chemotaxis. Durch bakterielle und körpereigene Stoffe werden Leukozyten mobilisiert und manövriert. Zu den chemotaktisch wirkenden Stoffen zählen z.B. Zytokine wie Interleukin-8 oder Interferon α . Diese Zytokine werden auch von den Leukozyten selbst ausgeschüttet um weitere Leukozyten „anzulocken“ (Chemotaxis). Leukozyten dienen der Phagozytose, dh. sie sind in der Lage Fremdkörper in sich aufzunehmen und mit Hilfe von Enzymen, wie Peptidasen, Lipasen und Proteasen abzubauen. Damit keine körpereigenen Zellen oder Organe als fremd detektiert und abgebaut werden dienen Rezeptoren als Erkennungsmerkmal. Diese sog. Toll-ähnlichen Rezeptoren dienen den Leukozyten als „Trigger“. Sobald eine Adhäsion an den Rezeptor erfolgt, löst dies einen Abwehrmechanismus aus [Fitzner et al., 2008]. Liegt hier ein Defekt oder eine Dysfunktion vor kommt es zum Abbau körpereigenen Gewebes, da eigen als fremd markiert und behandelt wird.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX in ausgewählten Hirnarealen zu verschiedenen Zeitpunkten. Ferner fand die Bestimmung von STAT 2 und des Epitops CD 15 in den untersuchten Hirnarealen zu vergleichbaren Zeitpunkten statt um etwaige Beziehungen zu ermitteln. Die Expression von CD 15 im Gehirn wurde bereits in verschiedenen Spezies, einschließlich des Menschen, untersucht. Die Arbeitsgruppen um Kudo, Klopocki, Nakamori, Nishihara, Takahashi et al. stellten bereits Speziesunterschiede, Altersunterschiede und Beziehungen zu Krankheitsprozessen fest.

Anhand dieser Studie sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Ist die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX in den untersuchten Hirnarealen vergleichbar und besteht eine Parallelität oder Wechselwirkung zwischen beiden α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX?
2. Lassen die Ergebnisse Rückschlüsse auf eine Wechselwirkung zwischen dem Glykokonjugat CD 15 und STAT2 mit den Expressionsraten von den α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX zu?
3. Lassen sich Rückschlüsse auf die Signaltransduktion durch STAT 2 ziehen?
4. Korrelieren die Untersuchungsergebnisse mit der Zunahme der altersbedingten inflammatorische Prozesse im Gehirn?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende molekularbiologische Methoden angewendet: PCR (Polychain-Reaction), qPCR (Reverse-Transcription-Polychain-Reaction) und Western-Blots.

2. Material

2.1 Tiere

2.1.1 verwendete Mauslinie

Mus musculus Stamm C57Bl/6 - Organisationsnummer des ZETT: O/62/1991

2.1.2 Haltung und Zucht

Die Mäuse waren eigene Nachzuchten der zentralen Tierversuchsanstalt der Heinrich- Heine Universität Düsseldorf. Die C57Bl/6 Mäuse wurden in der zentralen Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf unter standardisierten Bedingungen in Edelstahl/Kunststoffkäfigen und in Gruppen von maximal vier Individuen gehalten. Ad libitum standen den Versuchstieren entkeimtes Wasser und Futterpellets zur Verfügung. Die Jungtiere wurden mit dem jeweiligen Muttertier einzeln gehalten. Die Tiere standen unter tierärztlicher Kontrolle.

2.1.3 Einteilung der Versuchstiere

Insgesamt wurden 60 C57Bl/6 Mäuse für die Untersuchung herangezogen. Die Gruppeneinteilung erfolgte geschlechtsunspezifisch nach Alter. Hierbei wurden die Gewebeproben anhand von drei Altersstufen eingeteilt. Die erste Gruppe (n= 16) bildeten Versuchstiere der Altersstufe P0 (=Tag 0) deren Gewebeproben direkt nach der Geburt entnommen wurden und nur wenige Stunden alt waren. Die zweite Gruppe (n= 20) beinhaltete 6 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse (Altersstufe P42). Versuchstiere der Altersstufe P365 (Tag= 365) bildeten die dritte Gruppe (n= 24).

2.2 Enzyme

2.2.1 Kits

BCA™ Protein Assay Kit

Pierce, Rockford, USA

Omniscript RT Kit	Quiagen, Hilden, Germany
QuantiTect SYBR®Green Kit	Quiagen, Hilden, Germany
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Germany

2.2.2 Primer

Mm_Fut4_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Quiagen, Hilden, Germany
Mm_Fut9_1_SG QuantiTect® Primer Assay	Quiagen, Hilden, Germany
Mm_Gapdh3_SG QuantiTect® Primer Assay	Quiagen, Hilden, Germany

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Anti- β -Tubulin II, Clone 7B9	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CD15 (By87a): sc-53290	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Rb ₂ A544 2 anti FUT IX	Genosphere Biotechnologies, Paris, France
Stat2 (A-9): sc-166201	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2.3.2 Sekundärantikörper

Goat Anti-Mouse IgG-HRP: sc-2064	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
----------------------------------	---

Goat Anti-Mouse IgM-HRP: sc-2064	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Peroxidase-conj. AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno- Research, West Baltimore, USA
2.4 Chemikalien	
Acrylamidlösung, Rotiphorese® Gel A	Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Ammoniumperoxidisulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua bidest	B.Braun, Melsungen, Germany
β-Mercaptoethanol	Merck OHG, Hohenbrunn, Germany
Bisacrylamidlösung, Rotiphorese® Gel B	Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Bromphenolblau	SERVA GmbH, Heidelberg, Germany
Entwicklerlösung, Dental Readymatic Developer	Kodak Health Inc., Bagnolet Cedex, France
Essigsäure 100 % wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Fixierer, Agifix	AGFA Photo GmbH, Leverkusen, Germany

Glycerin 87 %	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Glycin (Analyse)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Salzsäure 25 %	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Sodiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodiumdodecylsulfat approx. 99 % (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TEMED (N,N,N',N – Tetramethylethylendiamine)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TitriplexIII (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Trizma®base, min. 99,9 % Titration	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween®20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.5 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen wurde immer doppelt destilliertes Wasser, welches aus einer *Millipore-Super-Q*-Filtrationsanlage entnommen wurde, verwendet.

APS Lösung (10 %)	100 mg Ammoniumperoxi- disulfat auf 1 ml <i>Aqua bidest</i>
Blotpuffer (25x Stocklösung)	18,2 g Tris Base 90 g Glycin auf 500 ml <i>Aqua bidest</i>
Blotpuffer (1x)	40 ml 25x <i>Stock</i> 760 ml <i>Aqua bidest</i> 200 ml Methanol
Bromphenolblau Lösung 0,1 %	10 mg Bromphenolblau auf 1 ml <i>Aqua bidest</i> , diese Lösung nochmals 1:10 verdünnen mit <i>Aqua</i> <i>bidest</i>
Elektrophorese Puffer (10x)	29 g Tris Base 144 g Glycin 10 g SDS auf 1 l <i>Aqua bidest</i>
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ auf 1 l <i>Aqua bidest</i>

Proteinladepuffer	<p>2,05 ml <i>Aqua bidest</i> + 100 μl Proteinaseinhibitor</p> <p>1,25 ml Tris-HCl (pH: 6,8)</p> <p>2 ml Glycerin</p> <p>4 ml 10 % SDS</p> <p>0,5 ml 0,1 % Bromphenolblau</p> <p>β-Mercaptoethanol (2 μl auf 20 μl Probe)</p>
SDS Lösung 10 %	<p>10 g SDS</p> <p>auf 100 ml <i>Aqua bidest</i></p>
1x SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 4 %)	<p>16,6% Acrylamid (30 %)</p> <p>6,8% Bisacrylamid (2 %)</p> <p>12,3% Tris-HCl pH: 6,8</p> <p>1,0% SDS (10 %)</p> <p>61,5% <i>Aqua bidest</i></p> <p>0,2% TEMED</p> <p>1,6% APS (10 %)</p>
1x SDS-Polyacrylamidgel (Trenngel 10 %)	<p>32,7% Acrylamid (30 %)</p> <p>6,6% Bisacrylamid (2 %)</p> <p>36,5% Tris-HCl pH: 8,7</p> <p>1% SDS (10 %)</p> <p>22,5% <i>Aqua bidest</i></p> <p>0,1% TEMED</p> <p>0,6% APS (10 %)</p>
TBS (10x)	100 mM Tris Base

(Blot-Waschpuffer)	1,5 M NaCl Auf 1 l <i>Aqua bidest</i>
TBS (1x) (Blot-Waschpuffer)	100 ml 10x <i>Stock</i> 900 ml <i>Aqua bidest</i>
TE	1 mM Tris-HCl (pH: 8,0) 10 mM EDTA auf 1 l <i>Aqua bidest</i>
Tris-HCl (pH: 8,7 und 6,8)	12,1 g Tris Base auf 100 ml <i>Aqua bidest</i>

2.6 Sonstige Reagenzien

Halt™ Protease Inhibitor Single-Use Cocktail	Pierce, Rockford, USA
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Plus Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockford, USA
Ponceau S Lösung	SERVA GmbH, Heidelberg, Germany
Präimmunserum Rb ₂ A544	Jackson ImmunoResearch, West Baltimore, USA
Quiagen® RNase Inhibitor	Quiagen, Hilden, Germany
RNase AWAY®	Carl Roth, Karlsruhe, Germany

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
StartingBlock™ Blocking Buffers	Pierce, Rockford, USA
SuperSignal®West Pico Chemiluminescent	Pierce, Rockford, USA
T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, USA

2.7 Laborgeräte

Gerätschaften, die im folgenden Abschnitt nicht aufgeführt werden, entsprechen einer Standard-Laboraausstattung.

AbiPrism 7900HT Sequenz Detection System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Belly-Dancer -4.702.610-	Stovall Life Science Inc., Greensboro, USA
Centrifuge 4-15C	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Germany
Flexcycler, PCR Thermocycler	Analytik Jena, Jena, Germany
FLOUstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Germany
Hypercassette™ -RPN 11642-	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Mikroprozessor pH-mV-Meter pH 526	WTW, Weilheim, Germany

Nanodrop 2000c Spectrophotometer	ThermoScientific, Wilmington, USA
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
Sonifier B-12® Cell Disruptor	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Wasserbad	Dinkelberg Labortechnik, Gablingen, Germany
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Carlsbad, USA
XCell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.8 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Advanced TC™ Zellkultur Schale	Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
CL-XPosure™ Film 5x7 inches	Pierce, Rockford, USA
Einwegskalpelle	B.Braun, Melsungen, Germany
Eppendorf PCR Gefäße 0,5 ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
Eppendorf Safe-Lock Gefäße 0,5 ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
Eppendorf Safe-Lock Gefäße 1,5 ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
Eppendorf Safe-Lock Gefäße 2,0 ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany

epT.I.P.S.® Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
Falcon™ Conical Tubes 50 ml	Becton Dickinson, Oxnard, USA
Falcon™ Conical Tubes 15 ml	Becton Dickinson, Oxnard, USA
Invitrolon™ PVDF Membran	Invitrogen, Carlsbad, USA
MicroAmp -Optical 96-Well-Plate-	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Novex® Blotting Pads	Invitrogen, Carlsbad, USA
Novex® Kassetten und Kämmen	Invitrogen, Carlsbad, USA
Optical Adhesive Cover -4360954-	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Präparationsbesteck	Bayha, Tuttlingen, Germany
RNeasy MinElute Spin Columns	Qiagen, Hilden, Germany
RNeasy MinElute Collection Tubes 1,5 ml	Qiagen, Hilden, Germany
UV-Star 96-Well Microplates	Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Whatman™ Filterpapier	Whatman plc, Maidstone, UK

3. Methoden

Die Versuche wurden im Institut für Anatomie I in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Jürgen Konrad Mai in Zusammenarbeit mit dem Biologisch-Medizinischem Forschungsinstitut (BMFZ) an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (HHU) und im Institut für Anatomie II (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall) der HHU durchgeführt.

3.1 Präparation der Versuchstiere

Die Tötung der Versuchsmäuse (Stamm C57Bl/6) der Altersstufen P42 und P365 erfolgte regelkonform nach §4 des Tierschutzgesetzes mittels CO₂-Atmosphäre nach Anästhesie mittels Inhalationsnarkotikums (Äther). Versuchsmäuse (Stamm C57Bl/6) der Alterstufen P0 wurden nach §4 des Tierschutzgesetzes durch Dekapitation getötet.

Die nachfolgenden Schritte fanden alle unter ständiger Kühlung des Gewebes zur Vermeidung von Denaturierungen statt.

Bei der Präparation der Versuchsmäuse der Altersstufen P42 und P365 erfolgte *post mortem* die Dekapitation. Anschließend wurde die Haut und das Bindegewebe sagittal durchtrennt und die Schädeldecke freipräpariert. Die Kalotte wurde vorsichtig mittels einer scharfen Schere eröffnet. Der Schnitt erfolgte ausgehend vom *Foramen magnum* beidseits lateral entlang der Kalotte bis zum Seitenrand der *Bulbi oculi*. Nach behutsamer Entfernung der Kalotte und Freilegung der Dorsalfläche des Gehirns wurden die *Bulbi olfactorii* als erste zu untersuchende Probeneinheit entnommen. Nun wurden die Hirnnerven mittels eines scharfen Skalpells durchtrennt und das Hirn *in toto* in eine mit kühlem PBS gefüllte Petrischale gelegt und gewaschen. Die weitere Präparation der zu untersuchenden Hirnareale erfolgte freihand unter Verwendung eines Stereomikroskops und 3-facher Vergrößerung. Zur Hilfe wurde die Präparationsanleitung „Mouse Brain Gross Anatomy Atlas“ des Neurogenetics UT Health Science Center genommen. Das *Cerebellum* wurde an den *Pedunculi cerebelli* durchtrennt und entnommen und anschließend das verbliebene Gehirn entlang der *Fissura longitudinalis cerebri* geteilt. Nach beidseitiger Freilegung und Entnahme der *Hippocampi* wurden beide lateralen

Anteile des zerebralen *Cortex* nach Präparation und Entfernung der *Thalami* und *Mesencephali* zur Untersuchung erstellt. Die Abtrennung des Mesencephalon erfolgte oberhalb der *Pons* und unterhalb des *Diencephalons*. Als Hilfe zur Präparation und Entnahme der beiden *Thalami* dienten Fornix, Corpus callosum und Ventrikel (siehe auch Abbildung 6).

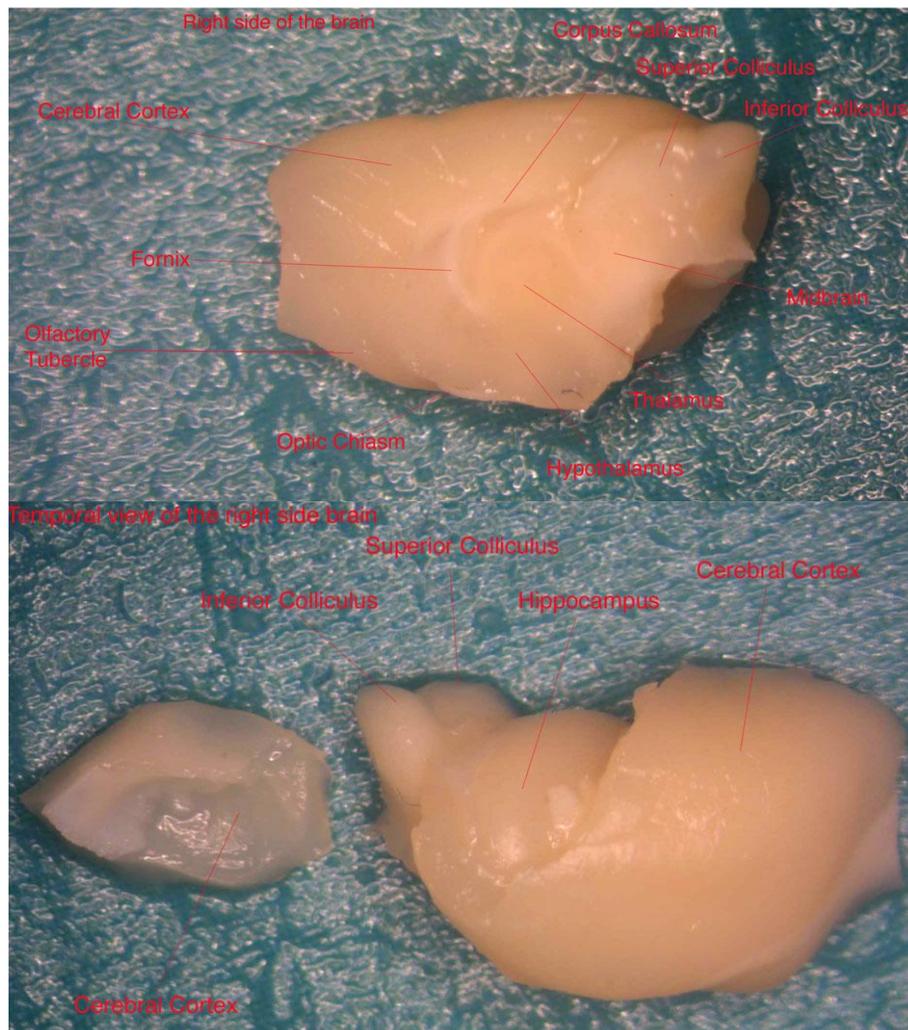


Abb. 6: Präparation murines Gehirn und anatomische Strukturen

Quelle: http://www.mbl.org/anatomy_images/fixated/mba_3.html (abgerufen am 25.08.2010)

Bei der Präparation der Versuchsmäuse der Altersstufe P0 wurden aufgrund anatomischer Besonderheiten und wegen des hohen Schwierigkeitsgrads der Präparation lediglich der laterale zerebrale *Cortex* (beidseits), das *Cerebellum*, beide *Bulbi olfactorii* und das *Mesencephalon* entnommen. Die Entnahme des *Mesencephalons* erfolgte auch hier oberhalb der *Pons* und unterhalb des *Diencephalons*. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Gewebeprobe in 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Gefäße bei -80 °C eingefroren.

3.2 RNA Extraktion aus murinem Gewebe

Zur Isolierung der RNA wurde das *RNeasy® Mini Kit* von Quiagen (Hilden, Germany) verwendet. Um eine Kontaminierung mit RNAsen zu vermeiden wurde der Arbeitsbereich desinfiziert und zuletzt mit *RNase AWAY®* von Carl Roth (Karlsruhe, Germany) aufbereitet.

Buffer RLT
Buffer RW1
Buffer RPE
RNase-free Wasser
β-Mercaptoethanol
Ethanol (96-100 %)
Ethanol (70 %)

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.

Alle Arbeitsschritte fanden unter ständiger Kühlung des zu untersuchenden Materials statt. Nach dem Standard-Protokoll für tierisches Gewebe wurde der RLT *Buffer* mit 1% β-Mercaptoethanol als Anti-Oxidans angesetzt. Auch dem Konzentrat des RPE *Buffer* wurde zur Aktivierung 20 ml Ethanol (96-100 %) hinzugefügt (siehe auch Tabelle 1).

Die Proben wurden mit 600 µl RLT *Buffer* versetzt und mittels dem *Sonifier B-12® Cell Disruptor* von Branson Sonic Power Company (Danbury, USA) homogenisiert und anschließend bei max. Umdrehungszahl und 2 °C für 3 Min. zentrifugiert. Dem Lysat wurden 600 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde das Lysat samt Ethanol behutsam mit Hilfe einer Pipette vermischt ohne das gebildete Zellpellet aufzuwirbeln. Durch das beigemengte Ethanol kam es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den RNA-Molekülen und der Silikagel-Membran der verwendeten Röhrchen von Quiagen (Hilden, Germany). Es wurden 700 µl von der Lösung in ein *RNeasy*

mini Spin Column abpipettiert, das in einem *RNeasy mini Collection Tube* positioniert wurde. Im Anschluss wurde das Lysat für 30 Sek. bei 13.000 rpm und 2 °C zentrifugiert. Der Durchfluss von Zelldetritus und Proteinen wurde verworfen. Nach Hinzufügen von 700 µl *RW1 Buffer* auf die Silikagel-Säule der *RNeasy mini Spin Column* wurde der oben beschriebene Vorgang wiederholt.

Als nächstes wurden nun 500 µl *RPE Buffer* auf die Membran pipettiert, das Röhrchen samt Silikagel-Säule wurde wiederum bei 13.000 rpm und 2 °C für 30 Sek. zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Diesmal betrug die Zentrifugationsdauer jedoch 2 Min. bei max. Umdrehungszahl um die Entfernung des verwendeten Ethanol zu gewährleisten. Das *RNeasy mini Spin Column* wurde nun in ein neues *RNeasy mini Collection Tube* inseriert und 50 µl RNase-freies Wasser vorsichtig direkt auf die *RNeasy mini* Silikagel-Membran pipettiert. Durch die anschließende zweiminütige Zentrifugation bei max. Umdrehungszahl und 2 °C wurde die RNA eluiert.

3.2.1 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Quantifizierung der gewonnenen RNA erfolgte mit Hilfe des *Nanodrop 2000c Spectrophometer* der Firma ThermoScientific (Wilmington, USA). Hierzu wurde die optische Dichte der Proben bei 260 nm Wellenlänge bestimmt (siehe Abbildung 7). Als Referenzpunkt fungierte der ermittelte Messwert von *Aqua destillata*. Zur Überprüfung einer möglichen Kontamination mit Proteinen wurde der Absorptionsquotient von A_{260} zu A_{280} erfasst. Dieser Wert musste in einem Bereich zwischen 1,6 und 2,0 liegen um die benötigte Reinheit der Proben zu garantieren.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ μ l	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280
Bo 10 J	Default	28.09.2010	14:16	198,14	4,953	2,656	1,87
Mes 10 J	Default	28.09.2010	14:17	267,13	6,678	3,623	1,84
Cb 10 J	Default	28.09.2010	14:18	3258,08	81,452	47,684	1,71
Hc 11 J	Default	28.09.2010	14:19	651,15	16,279	8,505	1,91
Bo 11 J	Default	28.09.2010	14:20	169,51	4,238	2,261	1,87
Th 11 J	Default	28.09.2010	14:20	283,70	7,093	3,756	1,89
Cb 11 J	Default	28.09.2010	14:21	250,93	6,273	3,074	2,04
Cx 11 J	Default	28.09.2010	14:22	1043,24	26,081	12,758	2,04
Mes 11 J	Default	28.09.2010	14:22	158,30	3,958	2,094	1,89

Abb. 7: Konzentration der extrahierten RNA

Beispielauszug von einer Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop 2000c (Versuchsmäuse e10j und e11j). Aufgeführt sind von links nach rechts: die Proben (Sample ID), der Benutzername (User ID), das Datum, die Uhrzeit, die Konzentration in ng/ μ l, die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm und der Absorptionsquotient von A₂₆₀ zu A₂₈₀. Abk.: Bo = Bulbus olfactorius, Mes = Mesencephalon, Cb = Cerebellum, Hc = Hippocampus, Th = Thalamus, Cx = Cortex.

3.2.2 Reverse Transkription der RNA

Damit die Proben für die nachfolgende quantitative PCR (qPCR) verwendet werden konnten, erfolgte zunächst die reverse Transkription der RNA in cDNA mit dem *Omniscript RT Kit* von Quiagen (Hilden, Germany). Vor Beginn wurde der Arbeitsplatz mit Ethanol (70%) desinfiziert und mittels *RNase AWAY*® von Carl Roth (Karlsruhe, Germany) aufbereitet um eine Kontamination der angefertigten RNA-Proben zu vermeiden. Auch wurden alle Arbeitsschritte unter Kühlung durchgeführt um einer vorzeitigen Degradation der RNA entgegenzuwirken.

Zur reversen Transkriptase Reaktion wurde jeweils 1 μ g RNA eingesetzt. Für jede Probe musste die Menge an μ l bestimmt werden, die benötigt wurde um diese 1 μ g RNA zu erhalten. Dies geschah mit Hilfe der vorangegangenen Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 3.4) der RNA und folgender Formel:

$$1000 \text{ ng/Wert} \times \text{ng}/\mu\text{l} = \text{Wert} \times \mu\text{l}$$

Zunächst wurden für alle Probeneinheiten *Mastermixe* erstellt (siehe Tabelle 2). Der *Mastermix* für einen Ansatz enthielt jeweils 10% 10x RT *Buffer*, 0,5 mM dNTP, 1µM Oligo dT Primer und 10 units RNase Inhibitor. 1 µg RNA wurde den jeweiligen Ansätzen hinzugefügt.

Falls ein Gesamtvolumen von 20 µl nicht erreicht wurde, konnte die Differenz mit RNase freiem Wasser ausgeglichen werden. Zum Schluss wurden noch vier units *Omniscrypt Reverse Transcriptase* appliziert und mittels des *Flexcyclers*

10x RT Buffer
dNTP Mix
Oligo dT Primer
RNase Inhibitor
Omniscrypt Reverse Transkriptase
RNase freies Wasser

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.

PCR Thermocycler Analytik Jena (Jena, Germany) wurde die Umwandlung der RNA in cDNA gestartet. Die reverse Transkriptase Reaktion verlief 60 Min. lang bei 37 °C. Die verwendete reverse Transkriptase beinhaltet eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und eine RNase H (Exoribonuclease). Im ersten Schritt der Transkription kam es zur Anlagerung (*Annealing*) des Poly-A-Schwanzes des Oligo dT Primers an den mRNA Strang und zur Erstellung der cDNA mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Im zweiten Schritt kam es durch die RNase H (Exoribonuklease) zur Degenerierung der nicht mehr benötigten RNA. Durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase folgte die nachgeschaltete cDNA Amplifikation.

Die erstellte cDNA wurde als *Template* für die nachfolgende *qPCR* verwendet. Die Lagerung der angefertigten Proben erfolgte bei -20 °C.

3.3 Quantitative PCR (qPCR)

Um die Expressionsrate der α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX in den jeweiligen Probenansätzen zu ermitteln, wurde das *quantitative PCR (qPCR)* Verfahren des *Abi Prism 7900HT Sequenz Detection Systems* von Applied Biosystems (Carlsbad, USA) benutzt. Die benötigten Arbeitsschritte erfolgten unter Kühlung und für die qPCR wurde das *QuantiTect SYBR®Green Kit* von Quiagen (Hilden, Germany) verwendet. Die *Primer Assays* wurden auch von QuantiTect® Quiagen (Hilden, Germany) bezogen (siehe Tabelle 3).

2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix RNase freies Wasser QuantiTect® Primer Assay Fut 4 QuantiTect® Primer Assay Fut 9 QuantiTect® Primer Assay GAPDH
--

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.

Für die qPCR wurde ein System gewählt, bei der die Reverse Transkriptase Reaktion gesondert vor der quantitativen PCR stattfand um eine höhere Sensitivität der untersuchten Transkripte zu erreichen. Zuerst wurden die *Mastermixe* für die jeweiligen Ansätze vorbereitet. Der *QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix* enthielt bereits fast alle benötigten Lösungen (siehe Tabelle 4), so dass lediglich RNase-freies Wasser und die spezifischen Primer hinzugefügt werden mussten. Die Ansätze wurden für alle Proben - *Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Thalamus, Hippocampus und Mesencephalon* - erstellt. Pro Versuchsreihe wurden 12,5 μ l des *Mastermix* mit 2,5 μ l des jeweiligen Primers und 7 μ l RNase-freiem Wasser versetzt, anschließend noch 100 ng cDNA hinzugefügt und mittels Pipette die Lösung vorsichtig vermischt. Das Gesamtvolumen eines einzelnen Ansatzes betrug ca. 25 μ l. Die Genexpression der zu untersuchenden α (1,3) Fucosyltransferase IV, IX und GAPDH wurde für jede Probe ermittelt. GAPDH diente hierbei als Referenzgen.

HotStarTaq® DNA Polymerase QuantiTect SYBR Green PCR Buffer dNTP Mix, inklusive dUTP SYBR Green ROX (passiver Referenzfarbstoff) 5 mM MgCl ₂

**Tabelle 4: Inhalt 2x QuantiTect®
SYBR Green PCR Master Mix**

Von jeder Reihe wurden zwei Ansätze angefertigt und zusätzlich noch für jeden Primer Leerproben erstellt, um etwaige Verunreinigungen festzustellen. Die gesamten Ansätze wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert, welche mit einem *Optical Adhesive Cover* verschlossen wurde. Bevor die qPCR mittels *AbiPrism 7900HT* startete, wurde die 96-Well-Platte zentrifugiert, um auftretende Bläschen vom Grund der einzelnen *Slots* zu entfernen und eine homogene Verteilung aller Bestandteile zu gewährleisten.

In der ersten Phase der qPCR kam es zur Elimination von dUMP-haltigen PCR Produkten durch die Uracil-N-Glycosylase (UNG) bei 50 °C über zwei Minuten. Hierbei entfernte die UNG das Uracil von den dUMP-haltigen Restprodukten der PCR und leitete deren Hydrolyse ein um eine Verfälschung der Resultate durch Kontamination zu vermeiden. Dann folgte der initiale Schritt der qPCR bei 95 °C mittels Aktivierung der *HotStarTaq* DNA Polymerase für 10 Minuten. Es startete die eigentliche PCR über 40 Zyklen. Die PCR beinhaltete drei Phasen: die *Denaturierung*, das *Annealing* und die *Extension*. Die Denaturierung beinhaltete die Zerlegung der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge. Dieser Schritt erfolgte bei 95 °C für 15 Sekunden. Im Anschluss kam es zur Anlagerung (*Annealing*) des Primers an den entsprechenden flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereichs. Es folgte die Neubildung der doppelsträngigen DNA mittels der Polymerase und den vorhandenen Desoxyribonukleotiden. Während der *Extension* bei 60 °C wurde die durch die

Expressionsrate entstehende Fluoreszenz gemessen. Anschließend erfolgte die erneute *Denaturierung*, *Annealing* und *Extension* über insgesamt 40 Zyklen. Für weitere Details bezüglich Dauer und Temperatur der einzelnen Phasen siehe Abbildung 8.

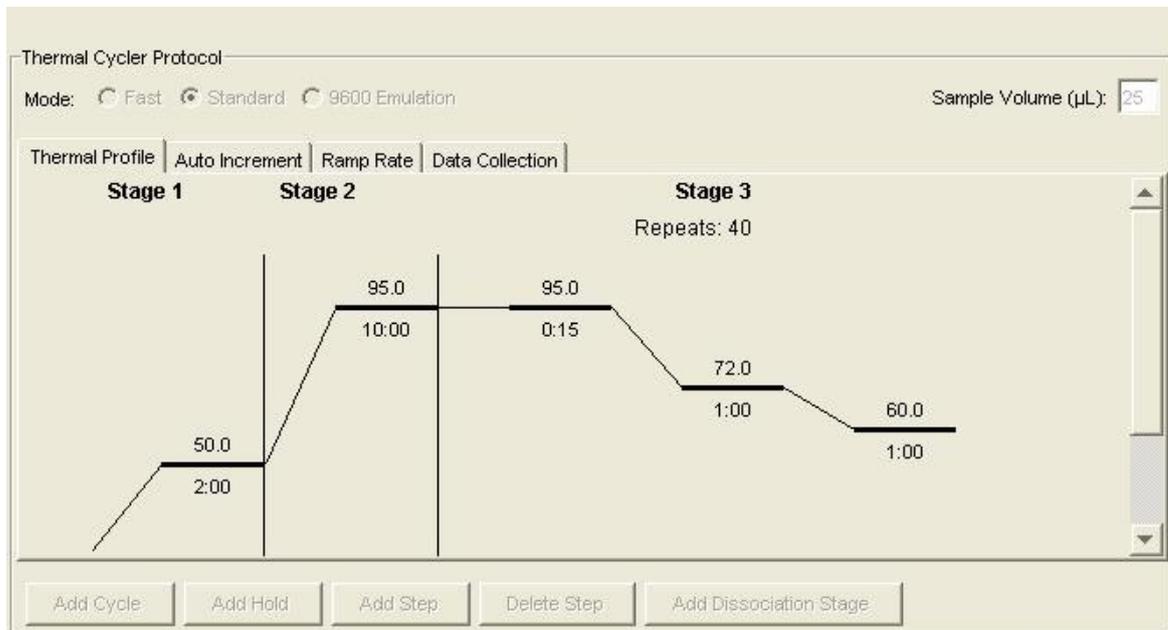


Abb. 8: Thermocyclerprogramm für die qPCR

Temperatur- und Zeitverlauf der qPCR; oberhalb der Verlaufslinie werden die Temperaturen in °C angegeben, unterhalb der Linie ist die Dauer der einzelnen Stufen in Minuten bzw. Sekunden dargestellt.

Die Fluoreszenz wurde durch den interkalierenden Farbstoff *SYBR Green I* verursacht. *SYBR Green I* lagerte sich zwischen den Basenpaaren an die vorhandene cDNA an und emittierte grünes Licht (λ max. = 520 nm). Mit zunehmender Zyklenanzahl verstärkte sich das Signal, welches in der Extensionsphase gemessen wurde. Repräsentativ für die Fluoreszenz stand der angegebene Cycle-Threshold-Wert (C_t -Wert). Dieser markierte den Punkt an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über das vorhandene Hintergrundrauschen stieg (siehe Abbildung 9) und spiegelte den Anfang des exponentiellen Wachstums wieder. Mit Hilfe der erfassten Werte konnte so für α (1,3) Fucosyltransferase IV, IX und GAPDH in den unterschiedlichen Hirnarealen ein Amplifikationsplot erstellt werden. Auch wurden durch die unter Umständen gemessene Fluoreszenz in der Leerprobe Verunreinigungen aufgedeckt. Mittels komparativer $2^{-\Delta C_t}$ Methode wurde die relative Genexpression ermittelt. Da jede Probe doppelt angesetzt wurde, musste als

nächstes der Mittelwert des C_T -Wertes berechnet werden. Um die relative Quantität zu ermitteln wurde dieser C_T -Wert des untersuchten Gens von dem C_T -Wert des Referenzgens subtrahiert (Abbildung 10).

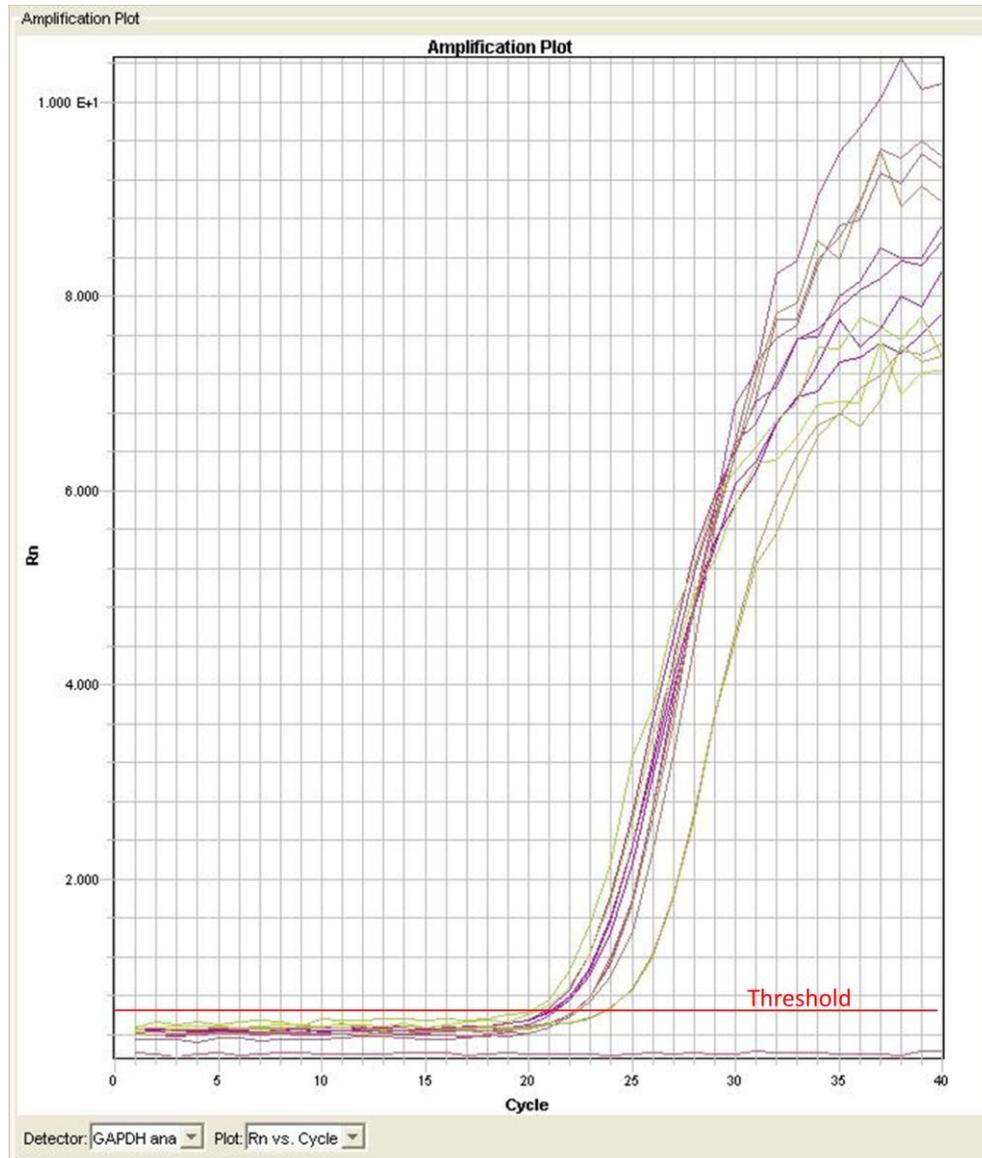


Abb. 9: Beispiel Amplifikationsplot (Versuchsmaus: e9j) für die untersuchten Gene Fluoreszenzänderung während der qPCR von GAPDH, Abszissenachse: Zyklen, Ordinatenachse: Rn-Wert, Rn stellt die Differenz der gemessenen Fluoreszenz des SYBR Green I zum passiven Farbstoff ROX dar, die Leerprobe zeigt keine Fluoreszenz und ist negativ. Die in rot eingezeichnete Linie/Horizontale bildet den festgelegten Schwellwert.

Der so erhaltene ΔC_T -Wert spiegelt die relative Expressionsrate von gesunden, nicht modifizierten Gehirnproben wieder. Da es sich bei dem C_T um einen exponentiellen Wert handelt muss dieser zur korrekten Darstellung in seine lineare Form umgewandelt werden. Dies erfolgt mit der Umrechnungsformel $R = 2^{-\Delta C_T}$. Die so berechnete n-fache Genexpression von der α (1,3)

Fucosyltransferase IV und IX der Alterstufen P0, P42 und P365 wurden gegenüber gestellt. Die Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit *Microsoft Office Excel 2007* und *GraphPadPrism 6*. Zur statistischen Auswertung fand *ANOVA* samt *post hoc Test nach Tukey* Anwendung.

$$C_{t \text{ Probe}} - C_{t \text{ Referenzgen}} = \Delta C_t$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta C_t}$$

Abb. 10: Relative Quantifizierung mittels $2^{-\Delta C_t}$ Methode

3.3.1 Primer

Die Primer-Ansätze von Quiagen (Hilden, Germany) wurden lyophilisiert erhalten. Vor Nutzung wurden sie mit 1,1 ml TE (pH: 8,0) versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

Im Folgenden sind die einzelnen Primer von Quiagen (Hilden, Germany) dargestellt:

1. Mm Fut4 1 SG (QT00263970)

Entrez GenID: 14345

Amplikon: 80 bp

ReferenzSequenz: NM_010242

2. Mm Fut9 1 SG (QT00171885)

Entrez GenID: 14348

Amplikon: 85 bp

Referenzsequenz: NM_010243

3. Mm Gapdh 3 SG (QT01658692)

Entrez GenID: 14433

Amplikon: 144 bp

Referenzsequenz: NM_008084

3.4 Proteinisolation aus murinem Gewebe

Für die relative Quantifizierung mittels Western Blot Analyse mussten zunächst die Proteine aus den entnommenen Proben extrahiert werden. Dies erfolgte mittels des *T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent* von Pierce (Rockford, USA) (siehe Tabelle 5).

T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent
Halt™ Protease Inhibitor Single-Use Cocktail

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

<u>Inhibitor</u>	<u>Konzentration</u>
AEBSF	1mM
Aprotinin	800nM
Bestatin	50µM
E64	15µM
Leupeptin	20µM
Pepstatin A	10µM

Tabelle 6: Bestandteile des Protease Inhibitor Cocktails

Um eine vorzeitige Denaturierung der benötigten Proteine zu vermeiden, erfolgten alle Arbeitsschritte unter Kühlung und es wurde zum *T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent* noch 15% Protease Inhibitor hinzugefügt (siehe Tabelle 6). Die Proben wurden mit 600 µl T-PER und 100 µl Protease Inhibitor

versetzt und mit Hilfe des *Sonifiers B-12® Cell Disruptor* homogenisiert. Das Lysat wurde nun für 5 Min. bei max. Umdrehungszahl zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden vorsichtig abpipettiert und in ein neues 2,0 ml Eppendorf Safe-Lock Gefäß überführt. Das entstandene Gewebepellet wurde samt dem alten Gefäß verworfen. Die Lagerung der erstellten Probenansätze erfolgte bei -80 °C.

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben fand mit dem *BCA™ Protein Assay Kit* von Pierce (Rockford, USA) statt. Der Standard- und Probenansatz wurde nach dem Herstellerprotokoll angesetzt. Zuerst erfolgte die Erstellung der Eichreihe (siehe Tabelle 7). Der Standardansatz beinhaltete auch einen *Blank*: Standard (BI-1) als Negativkontrolle. Für den *Blank*: Standard wurden 200 µl T-PER® *Tissue Protein Extraction Reagent* ohne Zusatz verwendet. Die Proben wurden 1:10 mit *T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent* verdünnt und unter Kühlung gelagert. Nun erfolgte die Herstellung der Arbeitslösungen. Der Arbeits-Rekonstitutionspuffer (ARP) wurde 1:1 mit *Aqua bidest* auf ein Gesamtvolumen von 2 ml versetzt. Dem Kompatibilitätspuffer (*Single-Use Tube*) wurde 1 ml von dem zuvor angesetzten ARP hinzugefügt und alles gut vermischt. In neuen 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Gefäßen wurden

Vial	Puffervolumen	BSA Source + Volumen µl	Konzentration µg/ml
A	0	Rest von BSA Stock	2000
B	125 µl	375 µl von BSA Stock	1500
C	200 µl	200 µl von BSA Stock	1000
D	200 µl	200 µl von Vial B	750
E	200 µl	200 µl von Vial C	500
F	200 µl	200 µl von Vial E	250
G	200 µl	200 µl von Vial F	125

Tabelle 7: Eichreihe

nun jeweils 25 µl der zu untersuchenden Proben, *Blank* bzw. Standardansätze pipettiert und pro Ansatz noch 25 µl des erstellten Kompatibilitätspuffer hinzugefügt. Die Lösung wurde behutsam homogenisiert und für 15 Min. bei 37

°C im Wasserbad inkubiert. Währenddessen wurde der Bedarf an Assay-Arbeits-Reagenz (AAR) ermittelt:

$$\text{Zahl (Blank: Standard)} + \text{Zahl (Standards)} + \text{Zahl (Proben)} \times 3 \text{ (Ansätze)}$$

Pro Versuchsreihe wurden 2 (*Blank*: Standard) + 7 (Standards) x 2 (Ansätze) + 6 (Proben) x 3 (Ansätze) = 34 ml AAR benötigt. Das Assay-Arbeits-Reagenz bestand aus zwei Komponenten und das Verhältnis der Mischung dieser beiden Reagenzien betrug 50 Teile Reagenz A zu 1 Teil Reagenz B. Um Pipettierfehler auszugleichen wurden für die Ansätze nun 36 ml Reagenz A mit 720 µl Reagenz B vermischt. Nach der 15 minütigen Inkubation der Probeneinheiten wurden diese nun mit jeweils 1 ml AAR versetzt und nach vorsichtigem *vortexen* für weitere 30 Min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend kühlten die Ansätze für ca. 10 Min. ab und wurden dann bei Raumtemperatur in eine *UV-Star 96-Well Microplatte* pipettiert. Für jede Probe wurden drei Ansätze erstellt um eine möglichst genaue Konzentration der Proteine zu erhalten.

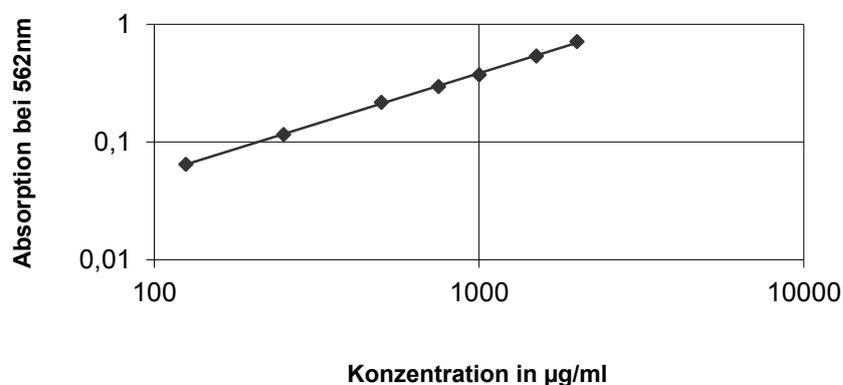


Abb. 11: Beispiel-Standardgerade der Proteinbestimmung (Versuchsmaus e5j)
 Ordinate: Absorption bei 562nm, Abszisse: Konzentration der Proteine in µg/ml.

Mit Hilfe der FLOUstar OPTIMA von BMG Labtech GmbH (Ortenberg, Germany) wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt. Anhand der erhaltenen OD_{562} Messwerte wurden die Konzentrationen der Proteine ermittelt und durch die Erstellung einer Standardgeraden (siehe Abbildung 11) eine valide Qualität der Proben sichergestellt.

3.5 Quantifizierung der Proteine durch Western Blot-Analyse

Die Quantifizierung der Proteine CD15, Fut IX und STAT 2 erfolgte mittels Western Blot. Diese Immunochemische Methode ermöglichte die Detektion der Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper. Als Referenz diente β -Tubulin II. Auf einen *Blot* wurden jeweils alle Gehirnareale einer Versuchsm Maus (Stamm: C57Bl/6) dargestellt um einen direkten Vergleich der verschiedenen Abschnitte zu ermöglichen.

3.5.1 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels PAGE und einem 10%igen Polyacrylamid-Gel mit SDS. Das vorgeschaltete 4%ige Sammelgel hat die Aufgabe die Proteine zum 10%igem Trenngel hin zu konzentrieren, damit das gesamte Protein möglichst gleichzeitig aufgeteilt wird. Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgt nach dem Molekulargewicht. Die SDS-Gele wurden immer frisch nach Standard-Protokoll (siehe unten) erstellt und bei Bedarf bei 4°C feucht gelagert.

Zusammensetzung des 4%igem Sammelgels:

30 % Acrylamid	425 μ l
2 % Bisacrylamid	175 μ l
Tris-HCl (pH: 6,8)	312,4 μ l
10 % SDS	25 μ l
Aqua bidest	1,575 ml

TEMED	6,25 µl
10 % APS	37,5 µl

Zusammensetzung des 10%igem Trenngels:

30 % Acrylamid	2,5 ml
2 % Bisacrylamid	0,5 ml
Tris-HCl (pH: 8,7)	2,8 ml
10 % SDS	75 µl
Aqua bidest	1,65 ml
TEMED	6,25 µl
10% APS	37,5µl

Die angefertigten Polyacrylamid-Gele wurden in eine *XCell SureLock®* Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt und die Kammer mit gekühltem Elektrophorese-Puffer befüllt. Für die weitere Kühlung wurde diese in ein mit Eis gefülltes Behältnis gestellt. Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können wurden zwei Marker verwendet. Der *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard* Marker diente zur Visualisierung und Einordnung des Molekulargewichts der Proteine während der Gel-Elektrophorese, da es sich um einen aus der Spezies Maus gewonnener Antikörper handelte (siehe Abbildung 12). Der *MagicMark™ XP Western Protein Standard* Marker sorgte für eine Visualisierung der Protein-Standardbanden auf dem anzufertigenden *Blot* (siehe Abbildung 13). Beide Marker sind kompatibel und wurden 1:1 gemischt. 10 µl von dem erstellten Marker-Mix wurde in einen *Slot* des SDS-Gels aufgetragen. Mit Hilfe der vorausgegangenen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nun berechnet wieviel µl Probe benötigt wurde um zu gewährleisten, dass in jeder Probe die gleiche Menge (15 µg) an Proteinen enthalten ist.

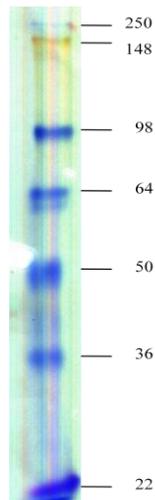


Abb. 12: SeeBlue® Plus2 Marker Darstellung des verwendeten Markers; links jeweils die selbst erstellten Bandenabbildungen, rechts die zugehörigen Molekulargewichte in Kilodalton.

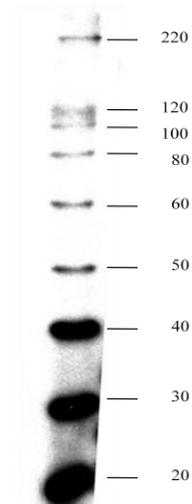


Abb. 13: MagicMark™ XP Marker Darstellung des verwendeten Markers; links die selbst erstellten Bandenabbildungen, rechts die zugehörigen Molekulargewichte in Kilodalton.

Die so erhaltenen Mengen wurden sowohl 1:1 mit dem vorher angefertigten Proteinladepuffer (siehe Tabelle 8) als auch mit jeweils 2 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Die Ansätze wurden gut vermischt und für 5 Min. bei 85 °C im Wasserbad inkubiert. Nachdem die Proteine durch das Wärmebad bei 85 °C denaturiert wurden, erfolgte nun die Applikation der Ansätze in die dafür vorgesehenen *Slots* im SDS-Gel.

Aqua bidest	2,05 ml
Proteinaseinhibitor	100 µl
Tris-HCl (pH: 6,8)	1,25 ml
Glycerin	2 ml
10 % SDS	4 ml
0,1 % Bromphenolblau	0,5 ml

Tabelle 8: Zusammensetzung Proteinladepuffer

Es wurden 22 µl der einzelnen Proben vorsichtig in die *Slots* des Sammelgels pipettiert. Anschließend erfolgte die Gel-Elektrophorese bei 125 V und einer Dauer von ca. 100 Minuten.

3.5.2 Western Blotting

Nach Abschluss der Gel-Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine positiv geladene PVDF-Membran mittels elektrischer Spannung übertragen. Zur Transferierung wurde das *XCell II™ Blot Module* (Invitrogen) verwendet. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol 30 Sek. lang aktiviert, mit *Aqua bidest* kurz gewaschen und in *Blot*-Puffer gelegt. Um eine ausreichende Quantität der zu übertragenden Proteine zu gewährleisten, wurde folgender Aufbau (siehe Abbildung 14) für das *Blot-Sandwich* gewählt:

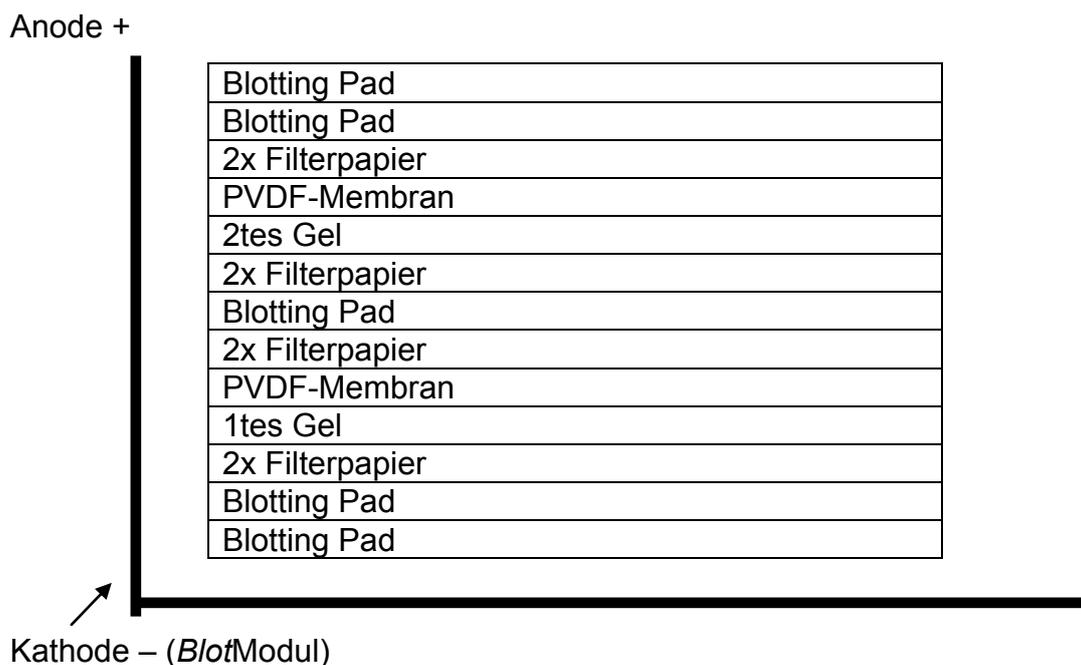


Abb. 14: Aufbau des *Blot-Sandwich*
dargestellt ist das *BlotModul*, welches die Kathode beinhaltet samt den unterschiedlichen Bestandteilen des *Blot-Sandwiches*.

Die *Blotting Pads* und Filterpapiere wurden vorher in *Blot*-Puffer getränkt und die oben genannten Materialien (siehe Abbildung 13) luftblasenfrei übereinander gelegt. Das Western Blot Modul wurde in die *XCell SureLock®* Gel-Elektrophorese eingespannt und die innere *Blot*-Kammer mit *Blot*-Puffer

und die äußeren Kammern der *Blot*-Kammer zur Kühlung mit kaltem *Aqua dest.* befüllt. Der *Blot* lief bei 25 V für ca. 75 Minuten. Zur Kontrolle, ob Proteine auf die Membran übertragen wurden, wurden diese nach dem *Blotten* für 5 Min. in Ponceau-Lösung inkubiert (siehe Abbildung 15) und danach in *Aqua bidest* gewaschen. Die angefärbten Proteine wurden eingescannt und archiviert.

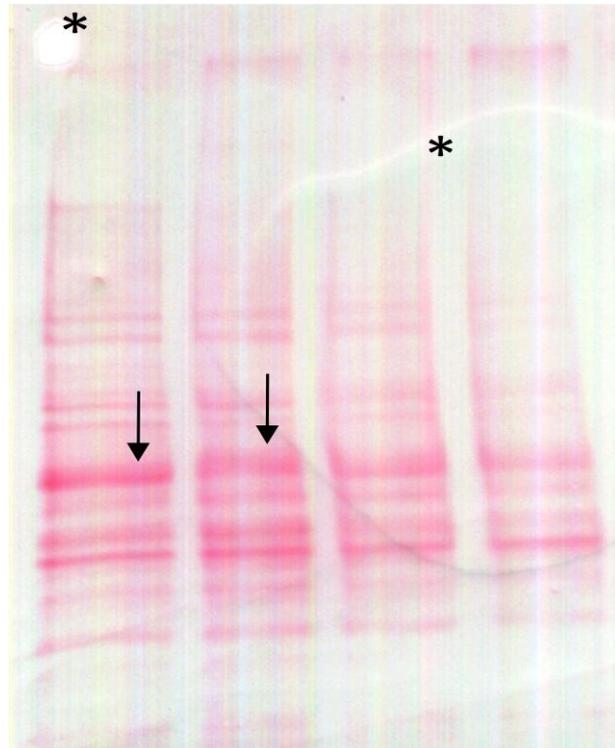


Abb. 15: Beispiel Ponceau-Färbung der PVDF-Membran

Aufgetrennte Proteine mittels Ponceau-Färbung dargestellt, die Farbverteilung ist innerhalb der verschiedenen Lanes regelmäßig (siehe Pfeile), so dass von 15µg Protein pro Lane ausgegangen werden kann. Während des Scanvorgangs sind Luftblasen entstanden, die als Artefakte auf dem Bild zu erkennen sind (siehe).*

3.5.3 Immunochemische Detektion

Die PVDF-Membranen wurden nach dem Protein-Transfer für 30 Min. bei Raumtemperatur in den Blockierungs-Puffer *StartingBlock™ Blocking Solution* (Pierce) inkubiert um vorhandene unspezifische Bindungen der Antikörper an die Proteine zu blockieren. Um alle Bereiche der PVDF-Membran gleichmäßig zu erreichen, wurden sämtliche Inkubationsschritte auf einem Schüttler (*Belly Dancer*, Stovall Life Science Inc.) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die

Inkubation der Membranen mit den jeweiligen Primärantikörpern (siehe Tabelle 9). Nach Inkubation mit dem 1. Antikörper (AK) wurde die Membran 5 x 5 Min. in *Blot*-Waschpuffer + 0,05 % Tween20 gewaschen.

Antikörper	Hersteller	Inkubationsdauer	Inkubationstemperatur	Verdünnung
Anti-β-Tubulin II, Clone 7B9	Sigma-Aldrich	über Nacht	Raumtemperatur	1:30.000 in BlockPuffer + 0,05 % Tween20
CD15 (By87a): sc-53290	Santa Cruz Biotechnology	über Nacht	Raumtemperatur	1:500 in BlockPuffer + 0,05 % Tween20
Rb ₂ A544 2 anti FUT IX	Genosphere Biotechnologies	über Nacht	4 °C	1:1000 in BlockPuffer + 0,05 % Tween20
Stat 2 (A-9): sc-166201	Santa Cruz Biotechnology	über Nacht	Raumtemperatur	1:500 in BlockPuffer + 0,05 % Tween20

Tabelle 9: verwendete Primärantikörper

2.AK	Hersteller	Inkubationsdauer	Inkubationstemperatur	Verdünnung
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1 Stunde	Raumtemperatur	1:100.000 in BlockPuffer + 0,05 % Tween20
Goat Anti-Mouse IgM-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1 Stunde	Raumtemperatur	1:10.000 in BlockPuffer + 0,05 % Tween20
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	1 Stunde	Raumtemperatur	1:100.000 in BlockPuffer + 0,05 % Tween20

Tabelle 10: verwendete Sekundärantikörper

Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit den jeweiligen Sekundär-Antikörpern (siehe Tabelle 10). Die verwendeten Sekundär-Antikörper enthielten die *Horseradish-Peroxidase (HRP)*, welche essentiell für die Luminol-Chemilumineszenz Reaktion war (siehe unten). Für STAT 2 und Anti-β-Tubulin II wurde der *HRP*-gekoppelte *Goat anti Mouse IgG* Sekundär-Antikörper verwendet. Der *Rabbit* anti FUT IX wurde in Kombination mit dem 2. AK *Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG* inkubiert. Für den 1. AK CD15

(By87a) wurde der Sekundärantikörper *Goat Anti-Mouse* IgM-HRP benutzt. Nach der 2. AK Inkubation wurde die Membran 5 x 5 Min. in *Blot*-Waschpuffer ohne Tween20 gewaschen. Die immunochemische Darstellung der angefertigten Membranen erfolgte mit Hilfe des *SuperSignal®West Pico* Chemilumineszenz Kits. Das im Kit enthaltene Luminol oxidierte aufgrund der Enzym-Substrat Reaktion mit der *HRP* und setzte als oxidiertes Luminolmolekül Chemilumineszenz frei. Der Nachweis erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

Antikörper	Belichtungszeit
Anti- β -Tubulin II, Clone 7B9	15 Sek.
CD15 (By87a): sc-53290	60 Min.
Rb ₂ A544 2 anti FUT IX	15 Sek.
Stat2 (A-9): sc-166201	60 Min.

Tabelle 11: Belichtungszeiten der Antikörper

Die nachfolgenden Arbeitsschritte fanden alle im abgedunkelten Raum einer Dunkelkammer statt. Die vorgegeben Reagenzien A und B wurden 1:1 vermischt und vorsichtig auf die Membran pipettiert. Die Membran wurde vorher mittels Filterpapier von grober Nässe befreit. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 5 Min. im Dunklen. Anschließend wurde die Membran in die *Hypercassette™* positioniert. In der Dunkelkammer wurde ein *CL-XPosure™* Röntgenfilm auf die Membran gelegt und entsprechend der Signalstärke der Antikörper belichtet (siehe Tabelle 11). Die Entwicklung der Röntgenfilme geschah manuell auf einer dafür vorgesehenen Arbeitsfläche der Dunkelkammer. Der Film wurde zuerst für 5 Min. in die Entwicklerlösung inkubiert. Dann für ca. 5 Sek. in 2%iger Essigsäure gewaschen und im Anschluss für 5 Min. in Fixierlösung inkubiert. Der fertig entwickelte Film wurde gut in einem Wasserbecken gespült und an der Luft getrocknet. Die Röntgenfilme wurden eingescannt und archiviert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels *ImageJ-Software*, *Microsoft Office Excel 2007* und *GraphPad Prism 6*. Als erstes wurden die detektierten Banden eines *Blots* mit Hilfe der *Software* ausgeschnitten und markiert. Die Dichteverteilung der

Banden innerhalb des zugeschnittenen Feldes stellte das Programm eigenständig als *Plot*-Diagramm dar. Die Maxima spiegeln dabei die einzelnen Banden wieder (siehe Abbildung 16).

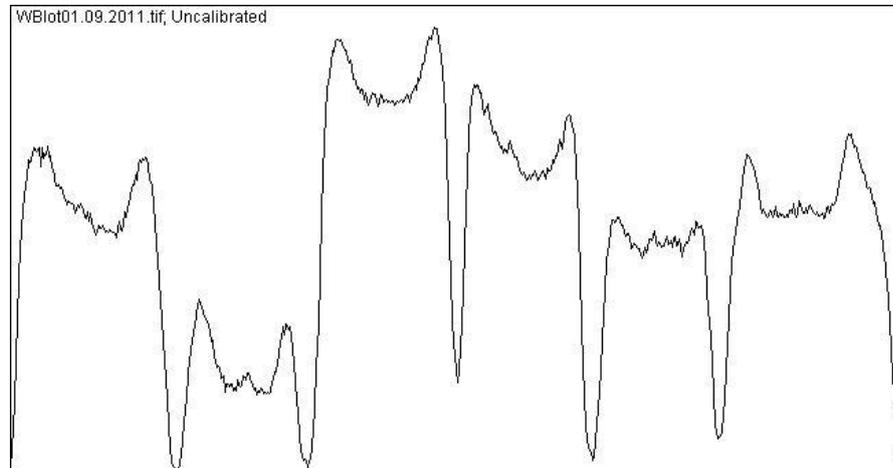


Abb. 16: Beispielplot des Western Blots CD15 (Versuchsmaus e5j)

Die nach oben gerichteten Maxima spiegeln die ermittelte Dichteverteilung innerhalb der Banden auf dem Blot wieder, jeder Peak stellt ein untersuchtes Hirnareal dar (von links nach rechts: Cerebellum, Bulbus olfactorius, Hippocampus, Thalamus, Mesencephalon und Cortex).

	Area	Percent
1	18.406.439	19.205
2	5.526.054	5.766
3	23.933.681	24.972
4	17.025.196	17.764
5	11.035.418	11.514
6	19.913.945	20.778

Abb. 17: Ein Beispiel der Ergebnisse der densitometrischen Analyse (Versuchsmaus e5j).

Die linke Spalte stellt die verschiedenen Hirnareale dar (1= Cerebellum, 2= Bulbus olfactorius, 3= Hippocampus, 4= Thalamus, 5= Mesencephalon, 6= Cortex), die mittlere Spalte zeigt die Dichteverteilung innerhalb der Areale, die rechte Spalte gibt diese Werte in Prozent an.

Die Areale wurden voneinander separiert und das Programm berechnete die Dichtewerte jedes einzelnen Abschnittes (siehe Abbildung 17).

Die ermittelten Werte wurden in *Microsoft Office Excel 2007* kopiert. Um eine ausreichende Qualität zu gewährleisten, wurde nun die relative Densität der einzelnen Proben bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe der angefertigten *Blots* des *housekeeping*-Proteins β -Tubulin II und folgender Formel:

$$\frac{\text{Wert x (untersuchtes Protein)}}{\text{Wert y (housekeeping-Protein)}}$$

Die Werte der relativen Densität, die in den unterschiedlichen Proben gemessen wurden, wurden für die Beurteilung der unterschiedlichen Proteinvorkommen in den verschiedenen Hirnarealen samt statistischer Auswertung der Ergebnisse mittels *ANOVA* und *post hoc Test nach Tukey* verwendet.

3.5.4 Entfernung der gebundenen Antikörper

Die Proteinmengen von CD15, α (1,3) Fucosyltransferase IX und STAT 2 eines Versuchstieres sollten verglichen werden. Dazu wurden die vorhandenen Membranen in *Stripping*-Puffer inkubiert. Durch den verwendeten *Strip*-Puffer wurden die zuvor gebundenen Antikörper von der PVDF-Membran entfernt ohne die transferierten Proteine massiv zu beeinflussen. Zuerst wurden die Membranen für 4 x 5 Min. mit *Blot*-Waschpuffer ohne Tween20 gewaschen und anschließend für 20 Min. bei Raumtemperatur in *Plus Western Blot Stripping Buffer* (Pierce) inkubiert. Um die gelösten Antikörper samt *Strip*-Lösung zu entfernen, wurde die PVDF-Membran nochmals 4 x 5 Min. mit *Blot*-Waschpuffer ohne Tween20 gewaschen. Um zu gewährleisten, dass alle Antikörper entfernt wurden, erfolgte die erneute Belichtung eines Röntgenfilms mit der Membran für 10 Min.. Waren keine Chemilumineszenzen mehr zu erfassen, konnte die aufbereitete Membran erneut für 30 Min. bei Raumtemperatur in Block-Lösung inkubiert werden, um die wieder frei gewordenen unspezifischen

Proteinbindungen abzusättigen. Im Anschluss wurde die Methode der Immunochemische Detektion für das nächste zu untersuchende Protein angewandt.

3.5.5 Methodenspezifität

Da es sich bei der α (1,3) Fucosyltransferase IX um einen polyklonalen Antikörper handelte, wurde zur Absicherung der Spezifität des Primärantikörpers (siehe Kapitel 3.8.3) eine Negativkontrolle durchgeführt. Hierfür wurde das Präimmunserum Rabbit verwendet. Nach Entfernung der Antikörper (siehe Kapitel 3.9.4) fand die Inkubation der Membran mit dem Präimmunserum Rabbit statt. Die Inkubation dauerte eine Stunde und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Präimmunserum wurde vorher 1:1000 mit BlockPuffer + 0,05 % Tween20 verdünnt. Im Anschluss wurde die Membran für 5 x 5 Min. in *Blot*-Waschpuffer + 0,05 % Tween20 gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (2. AK) Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) über Nacht bei Raumtemperatur. Nach der 2. AK Inkubation wurde die Membran 5 x 5 Min. in *Blot*-Waschpuffer ohne Tween20 gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Immunochemische Detektion (siehe Kapitel 3.5.3).

4. Ergebnisse

Die α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX katalysieren die Synthese des Glykokonjugats CD 15, welches in Verbindung mit P-, E- und L-Selektinen für die Ausbildung von Zell-Zellkontakten von entscheidender Bedeutung ist.

Es ist unklar, ob die Expression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX mit der Produktion des Glykokonjugats CD 15 in Zusammenhang steht, schließlich ist die Möglichkeit einer Beeinflussung der Signaltransduktion durch STAT 2 bislang nicht untersucht worden. Bisher ist wenig über das korrelierende Vorkommen der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX und dem CD 15 in differenzierten Hirnarealen bekannt. Auch eine Veränderung der Expression zu unterschiedlichen Altersstufen ist für die prä- und postnatale Entwicklung nur limitiert beschrieben. Eine mögliche Wechselwirkung zwischen den beiden α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX untereinander ist fraglich.

Anhand der ermittelten Ergebnisse, konnte festgestellt werden, dass die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX innerhalb der untersuchten Hirnareale zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich war. Der ontogenetische Vergleich beider α (1,3) Fucosyltransferasen zeigte für die α (1,3) Fucosyltransferase IV arealübergreifend eine stetige Abnahme der Expression, während für die α (1,3) Fucosyltransferase IX zunächst eine Abnahme zwischen P0 und P42 festgestellt wurde, welche von einer signifikanten Zunahme der Expression zwischen P42 und P365 gefolgt wurde.

Im Vergleich zu der Produktion des Glykokonjugats CD 15 konnte keine Wechselwirkung bzw. Parallelität mit der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX festgestellt werden. Jedoch war ein annähernd paralleler Verlauf zwischen CD 15 und STAT 2 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten arealübergreifend erkennbar.

4.1 Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX

Die Bestimmung der Expressionsraten der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX erfolgte mittels der qPCR in Gehirnprouben von genetisch untransfizierten Mäusen (Stamm: C57B1/6). Diese Proben waren zu unterschiedlichen Zeitpunkten und aus mehreren Regionen präpariert worden. Als Altersstufen

wurden die Tage P0, P42 und P365 gewählt und die Proben umfassten den *Bulbus olfactorius*, das *Cerebellum*, den *Cortex*, den *Hippocampus*, das *Mesencephalon* und den *Thalamus*. Bei den Versuchstieren der Altersstufe P0 wurden nur Proben aus dem *Bulbus olfactorius*, dem *Cerebellum*, dem *Cortex* und dem *Mesencephalon* entnommen (siehe Kapitel 3.1).

4.1.1 Quantität der Genexpression muriner Hirnareale in toto

Aus den mit der qPCR erhaltenen ΔC_t Werten wurde die relative Expression (rE) des murinen Hirns für die α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV ermittelt (Abbildung 18) (siehe auch Kapitel 3.3, Seite 33-35). Die Gesamtexpression bildete hierbei die Summe der ermittelten Regionalwerte. Dies wurde zur Beurteilung der Verteilung in den unterschiedlichen Altersstufen in toto herangezogen.

Die α (1,3) Fucosyltransferase IX wies signifikante Unterschiede zwischen den Altersstufen P0, P42 und P365 auf (Abbildung 18). So verzeichnete sie zunächst eine signifikante Abnahme der Genexpression von P0 (rE = 1,0) zu P42 (rE = 0,5), während es zwischen der Altersstufe P42 (rE = 0,5) und P365 (rE = 1,6) zu einem signifikanten Anstieg der ermittelten Expression kam, welcher auch signifikant höher als die bestimmte Genexpression der Altersstufe P0 (=1,0) war.

Die α (1,3) Fucosyltransferase IV wies einen tendenziell abnehmenden Verlauf zwischen den Altersstufen auf (Abbildung 18). Die relative Expression der Altersstufe P0 (rE = 1,8) war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu der Altersstufe P42 (rE = 1,9). Erst P365 (rE = 1,5) war signifikant niedriger als P0 und P 42.

Im Vergleich der α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV waren die Altersstufen P0 und P42 signifikant unterschiedlich. Die Altersstufe P0 der α (1,3) Fucosyltransferase IX (rE = 1,0) war signifikant niedriger als die P0 der α (1,3) Fucosyltransferase IV (rE = 1,8). Auch P42 der α (1,3) Fucosyltransferase IX war signifikant erniedrigt (rE = 0,5) im Vergleich zur P42 der α (1,3) Fucosyltransferase IV (rE = 1,9). Die relative Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV in der Altersstufe P365 waren nicht signifikant abweichend. Eher wiesen die P365 der α (1,3) Fucosyltransferase IX (rE = 1,6)

und der α (1,3) Fucosyltransferase IV ($rE = 1,5$) fast identische relative Expressionswerte auf.

Genexpression α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV der Altersstufen P0, P42 und P365 in toto (Summe Regionalwerte)

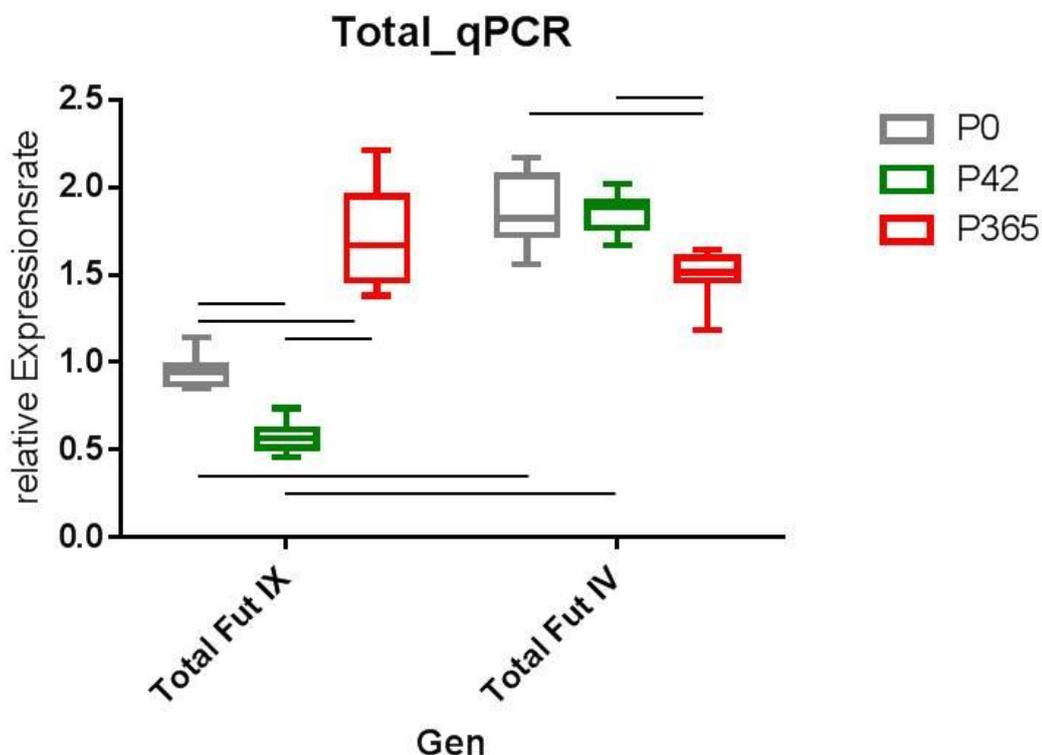


Abb. 18: Genexpression α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV der Altersstufen P0, P42 und P365 in toto (Summe Regionalwerte)

Abszissenachse: Gen α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV, Ordinatenachse: relative Genexpression, grau = P0, grün = P42, rot = P365; Box Plots mit Median, Quartilen, Max und Min; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit Querbalken markiert; $n=30$.

4.1.2 Quantität der Genexpression in den unterschiedlichen murinen Hirnarealen

Um die Expression innerhalb des murinen Hirns zu bestimmen wurden Gewebeproben aus unterschiedlichen Arealen entnommen (siehe Kapitel 3.1; 4.1). Die relative Expression der verschiedenen Gehirnareale der Altersstufe P0 waren bezogen auf die α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV heterogen.

Die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX in den Arealen Bulbus olfactorius ($rE = 0,19$), Cerebellum ($rE = 0,24$) und Mesencephalon ($rE = 0,2$)

war annähernd gleich. Lediglich der Cortex wies eine signifikant höhere Genexpression ($rE = 0,35$) auf (siehe Abbildung 19).

Die relative Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IV war arealübergreifend kaum unterschiedlich. Der Cortex wies die höchste Expression ($rE = 0,55$) zusammen mit Bulbus olfactorius ($rE = 0,5$) und Mesencephalon ($rE = 0,5$) auf. Im Gegensatz dazu wies das Cerebellum eine signifikant niedrigere relative Expression ($rE = 0,35$) auf.

Zu beachten war, dass die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV im Vergleich zur (1,3) Fucosyltransferase IX in allen Hirnarealen höher war. Mit Ausnahme des Cerebellums waren diese Ergebnisse signifikant. Tendenziell zeigt aber auch das Cerebellum eine höhere Genexpression für die α (1,3) Fucosyltransferase IV als für die α (1,3) Fucosyltransferase IX (Abbildung 19). In der Altersstufe P42 zeigte sich ein stark heterogenes Bild der Expressionsrate in den unterschiedlichen Hirnarealen (siehe Abbildung 20).

Genexpression Altersstufe P0

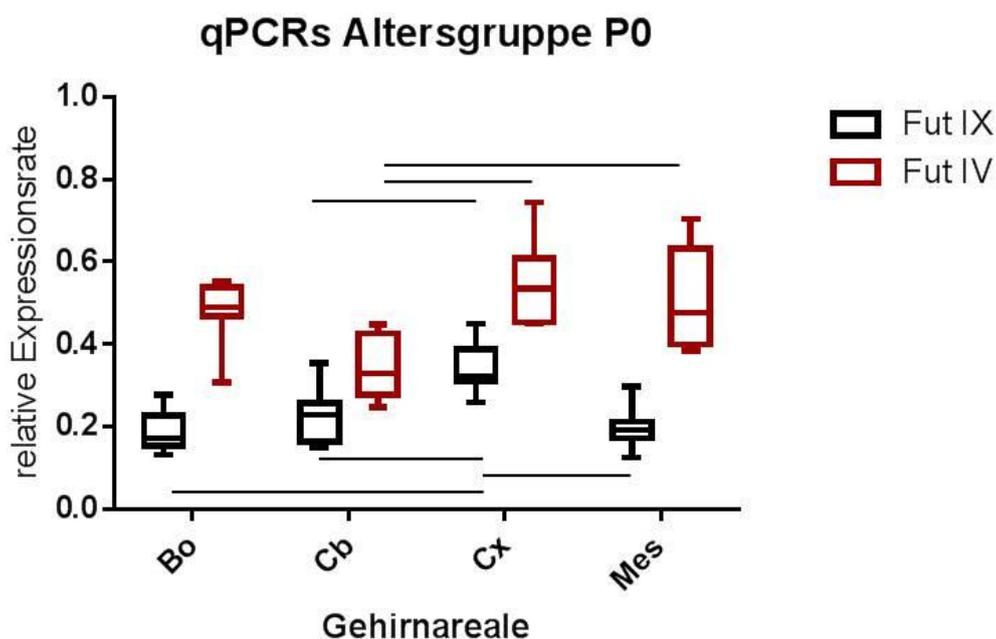


Abb. 19: Genexpression Altersstufe P0

Abszissenachse: die unterschiedlichen Hirnareale, Ordinatenachse: Genexpressionsrate, rot = Fucosyltransferase IV, schwarz = Fucosyltransferase IX, Box Plots mit Median, Quartilen, Max und Min; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit Querbalken markiert; $n=8$.

Auch war innerhalb der einzelnen Hirnabschnitte keine einheitliche Expression erkennbar, jedoch wurde gegenüber der Altersstufe P0 in allen Bereichen ein Abfall der relativen Expression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX ermittelt. Die relative Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV war im Vergleich zur α (1,3) Fucosyltransferasen IX in allen Regionen, mit Ausnahme des Cerebellums, signifikant erhöht. Wie zum Zeitpunkt P0 war für das Cerebellum lediglich eine Tendenz der erhöhten Genexpression für die α (1,3) Fucosyltransferase IV erkennbar.

Genexpression Altersstufe P42

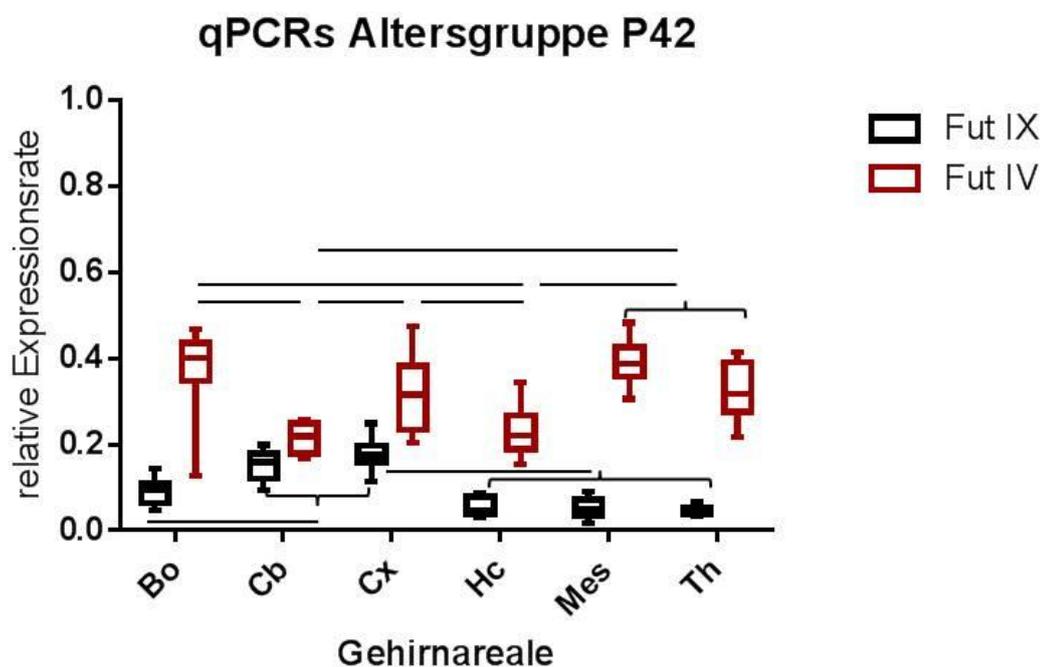


Abb. 20: Genexpression Altersstufe P42

Abszissenachse: die unterschiedlichen Hirnareale, Ordinatenachse: Genexpressionsrate, rot = Fucosyltransferase IV, schwarz = Fucosyltransferase IX, Box Plots mit Median, Quartilen, Max und Min; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit Querbalken markiert; geschweifte Klammern fassen Areale mit gleichen signifikante Unterschiede zusammen; $n=10$.

Die α (1,3) Fucosyltransferase IV zeigte innerhalb der Hirnareale eine heterogene Genexpression. Die höchste relative Expression wies der Bulbus olfactorius ($rE = 0,4$) und abnehmend Mesencephalon ($rE = 0,38$), Thalamus ($rE = 0,3$) und Cortex ($rE = 0,3$) auf. Die niedrigste Genexpression wurde für den Hippocampus ($rE = 0,2$) und Cerebellum ($rE = 0,2$) ermittelt.

Die relative Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX wies nicht signifikante Unterschiede in den Regionen Hippocampus ($rE = 0,05$), Mesencephalon ($rE = 0,05$) und Thalamus ($rE = 0,05$) auf. Zu dieser

Arealgruppe war die Gruppe mit den Regionen Bulbus olfactorius ($rE = 0,1$), Cerebellum ($rE = 0,18$) und Cortex ($rE = 0,18$) in der Genexpression signifikant erhöht.

Genexpression Altersstufe P365

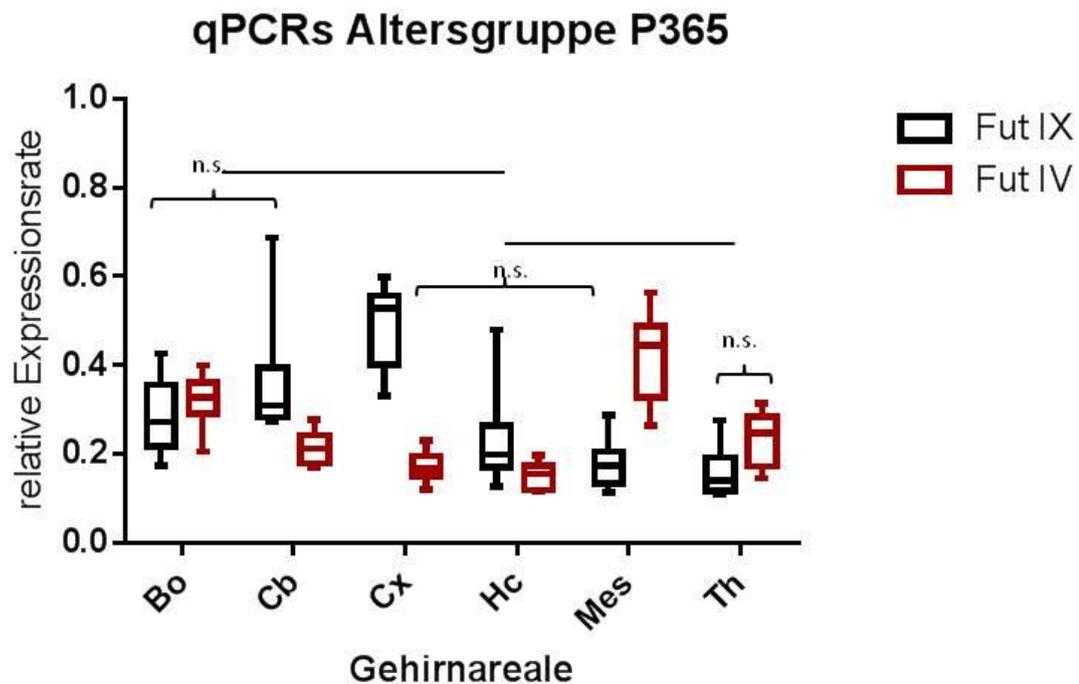


Abb. 21: Genexpression Altersstufe P365

Abszissenachse: die unterschiedlichen Hirnareale, Ordinatenachse: Genexpressionsrate, rot = Fucosyltransferase IV, schwarz = Fucosyltransferase IX, Box Plots mit Median, Quartilen, Max und Min; nicht signifikante Unterschiede sind mit Querbalken markiert (n.s.) und mit geschweiften Klammer zur Vereinfachung zusammengefasst; alle restlichen Hirnareale weisen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) auf; $n=12$.

Das auffallendste Ergebnis hinsichtlich der Genexpression in der Altersstufe P365 betraf die gestiegene Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IX (siehe Abbildung 21). Im Vergleich zur Altersstufe P42 stieg die Expressionsrate in fast allen Fällen um mindestens das Doppelte an und die Expressionsraten näherten sich die der α (1,3) Fucosyltransferase IV. So war die relative Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX im Cerebellum ($rE = 0,3$) und Cortex ($rE = 0,5$) sogar signifikant höher als die der α (1,3) Fucosyltransferase IV. Durch den Anstieg der Expression waren die Werte im Bulbus olfactorius, Hippocampus und Thalamus nicht mehr signifikant unterschiedlich. Als einziges Areal wies das Mesencephalon eine signifikant höhere Genexpression für die α (1,3) Fucosyltransferase IV ($rE = 0,45$) als für die α (1,3) Fucosyltransferase IX ($rE = 0,18$) auf.

Bei Betrachtung der Expressionswerte innerhalb der Hirnareale fiel für die α (1,3) Fucosyltransferase IX auf, dass die Tendenzen im Vergleich zur Altersstufe P42 ähnlich waren. So konnten auch hier innerhalb Hippocampus, Mesencephalon und Thalamus zwischen der α (1,3) Fucosyltransferase IX und α (1,3) Fucosyltransferase IV keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden. Die Werte der α (1,3) Fucosyltransferase IV waren leicht erniedrigt und sehr heterogen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die relative Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX in der Altersstufe P0 mit Ausnahme des Cortex nahezu gleich war. Zum Zeitpunkt P42 waren mit Ausnahme des Cortex und Cerebellums die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX nicht signifikant unterschiedlich. Die Altersstufe P365 wies bei der relativen Expression ein heterogenes Bild auf. Tendenziell war die Genexpression im Cortex und Cerebellum im Vergleich zu den anderen Regionen aber auch erhöht. Die relative Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX war mit Ausnahme der Altersstufe P365 immer niedriger als die relative Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IV.

Die relative Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV war in der Altersstufe P0 mit Ausnahme des Cerebellums nicht signifikant unterschiedlich jedoch stets höher als die Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IX. Auch zum Zeitpunkt P42 war die relative Genexpression stets höher als die der α (1,3) Fucosyltransferase IX. Auch hier war die ermittelte Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IV bis auf Cerebellum und Hippocampus nicht signifikant unterschiedlich. In der Altersstufe P365 stellte sich ein heterogenes der relative Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV dar. Die Expression war nun im Bulbus olfactorius, Hippocampus und Thalamus nicht mehr signifikant unterschiedlich zu der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX und im Cerebellum und Cortex und sogar niedriger. Nur das Mesencephalon wies eine höhere Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IV im Vergleich zur α (1,3) Fucosyltransferase IX auf.

4.1.3 Veränderungen während der Altersentwicklung

Im Vergleich der einzelnen untersuchten Gehirnareale entlang der zeitlichen Entwicklungsphasen der Versuchsmäuse wurde ein ähnliches Muster im Verlauf der relativen Genexpression festgestellt (siehe Abbildung 22 und 23). Da für die Altersstufen P0 keine Proben aus dem *Hippocampus* und dem *Thalamus* entnommen wurden, konnten für diese beiden Bereiche nur die Entwicklung der Genexpression zwischen P42 und P365 zum Vergleich herangezogen werden. Bei Betrachtung der Verläufe fiel auf, dass es unabhängig von dem untersuchten Gewebeabschnitt zwischen den Altersstufen P0 und P42 zu einem deutlichen Abfall der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX kam. In der weiteren Entwicklung konnte ein erneuter deutlicher Anstieg der Expressionsrate der α (1,3) Fucosyltransferase IX zwischen den Altersstufen P42 und P365 beobachtet werden (siehe Abbildung 22).

Ontogenetischer Vergleich α (1,3) Fucosyltransferase IX vs. α (1,3) Fucosyltransferase IV

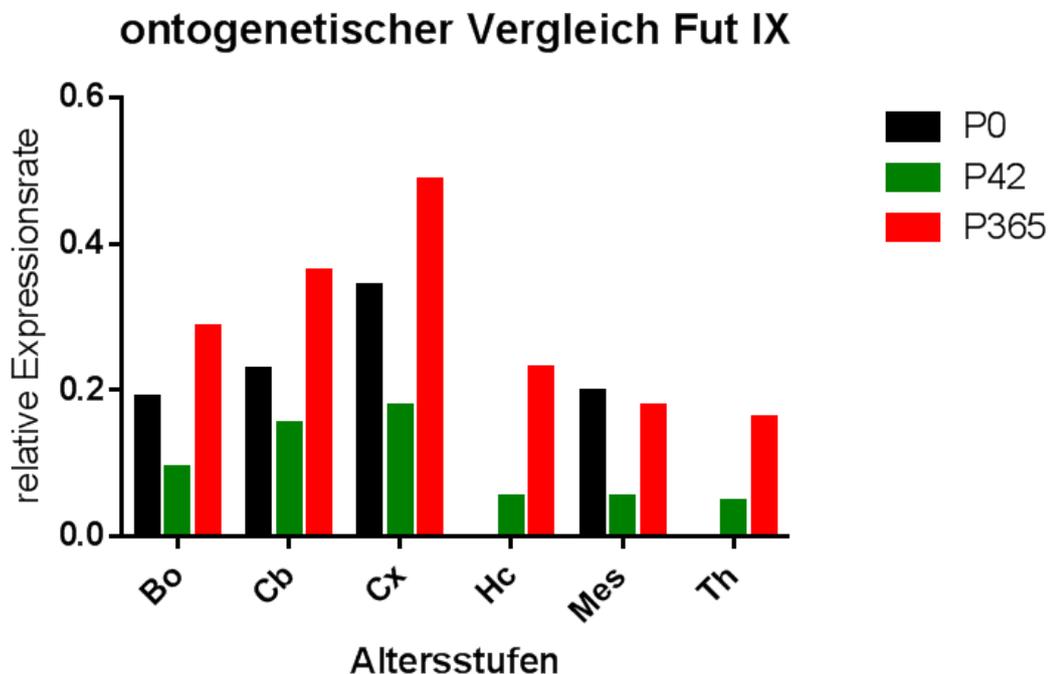


Abb. 22: Vergleich der Genexpression von Fut IX der Altersstufen P0, P42, P365
 Abszissenachse: Hirnareale samt Altersstufen, Ordinatenachse: Genexpressionsrate (Mittelwert), Farberläuterungen bezüglich der unterschiedlichen Altersstufen siehe Legende (rechts); gut erkennbar der deutliche Abfall zwischen P0 und P42 und der deutliche Anstieg zwischen P42 und P365.

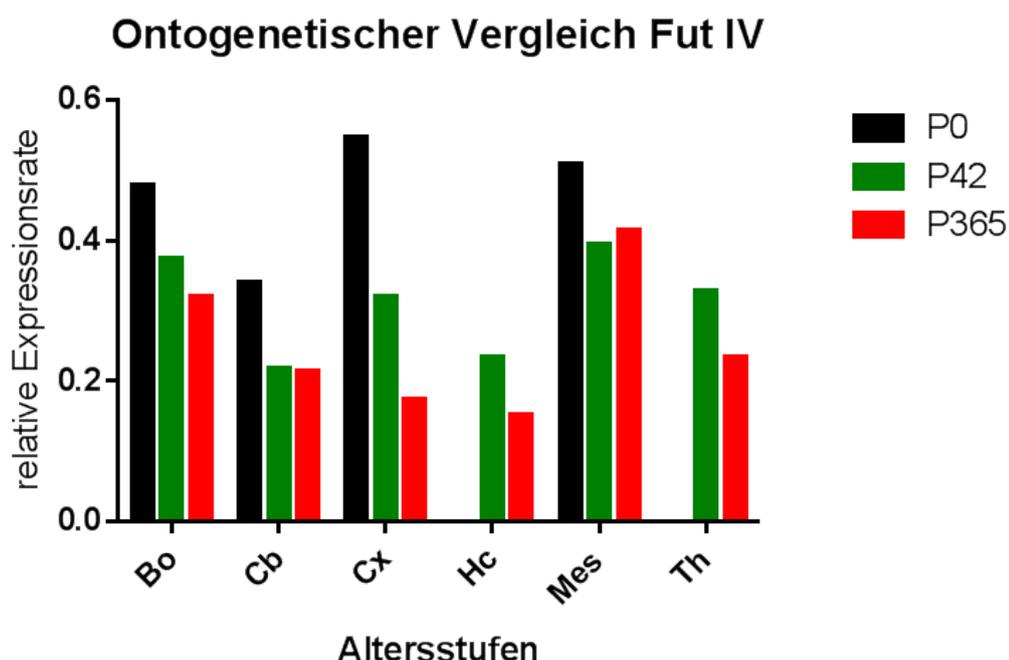


Abb. 23: Vergleich der Genexpression von Fut IV der Altersstufen P0, P42, P365.
 Abszissenachse: Hirnareale samt Altersstufen, Ordinatenachse: Genexpressionsrate (Mittelwert), Farberläuterungen bezüglich der unterschiedlichen Altersstufen siehe Legende (rechts); gut erkennbar ist der deutlicher Abfall mit zunehmendem Alter (Ausnahme Mesencephalon).

Im Vergleich zur relativen Genexpression in den verschiedenen Gehirnabschnitten der α (1,3) Fucosyltransferase IV stellte sich eine deutliche Abnahme der Expression dar (siehe Abbildung 23).

So kam es zwischen den Altersstufen P0 und P42 zu einem Abfall der ermittelten Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV. In P365 konnte eine erneute leichte Abnahme der relativen Genexpression festgestellt werden. Einzige Ausnahme war das Mesencephalon. Dort wurde ein leichter Anstieg der Genexpression ermittelt. Jedoch blieb die Expression deutlich unter den Werten der Altersstufe P0.

4.2 Immunochemische Detektion der Proteine

In dem zweiten Teil dieser Dissertation wurde mittels Western Blot Analyse die Quantität von CD15, der α (1,3) Fucosyltransferase IX und STAT 2 bestimmt. Hierfür wurden Gewebeproben von genetisch unveränderten Versuchsmäusen (Stamm: C57B1/6) der Altersstufen P42 und P365 aus folgenden Gehirnarealen entnommen: *Bulbus olfactorius*, *Cerebellum*, *Cortex*, *Hippocampus*, *Mesencephalon* und *Thalamus*. Für die Altersstufe P0 wurden Gewebeproben

aus dem *Cerebellum*, *Cortex* und *Mesencephalon* erstellt. Um ein valides Ergebnis zu erhalten wurden die *Blots* mittels densitometrischem Verfahren analysiert. Als *housekeeping-Protein* wurde β -Tubulin II verwendet (siehe Abbildung 24). Der entwickelte *Blot* zeigte gleichmäßige Banden, welche die Beladung von ca. 15 μ g Protein pro *Lane* bestätigten. Auftretende Beladungsfehler der erstellten *Blots* von CD15, α (1,3) Fucosyltransferase IX, STAT 2 und β -Tubulin II wurden durch die densitometrische Analyse mit der *Software ImageJ* ausgeglichen. Die berechneten Proteinmengen wurden erst untereinander verglichen und später altersübergreifend gegenübergestellt.

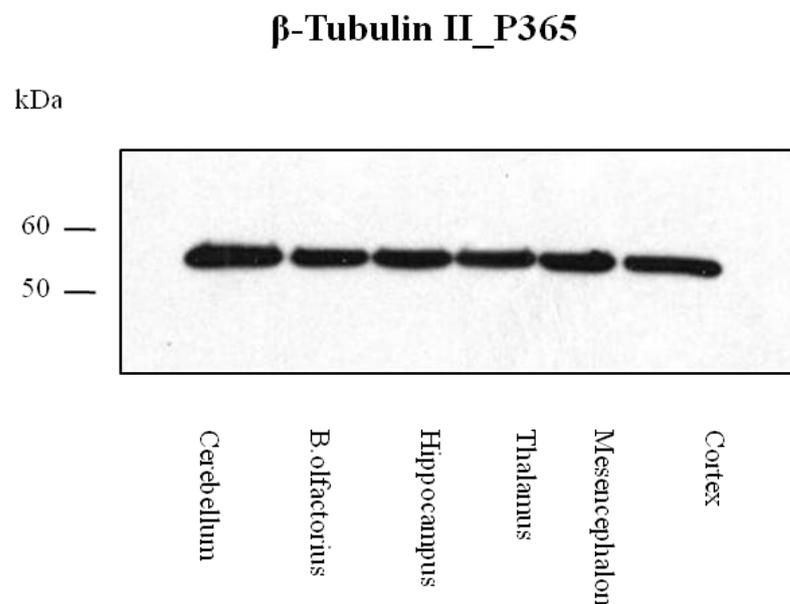


Abb. 24: Beispiel Western Blot: β -Tubulin II Alterstufe P365 (Versuchsm Maus e2j)
 Abszisse: Probenentnahmeorte, Ordinate: Molekulargewicht in kiloDalton, die erkennbare Bande auf Höhe von **55 kDa** stellt β -Tubulin II in den verschiedenen Arealen dar, pro Lane wurden 15 μ g Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 15 Sek., $n=20$.

4.2.1 Quantität der Proteinmengen in der Altersstufe P0

Die PVDF-Membranen wurden nach dem Proteintransfer zuerst mit dem Primärantikörper Rb₂ A544 2 anti FUT IX (Genosphere Biotechnologies) und dem passendem Sekundärantikörper Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) für die Detektion der α (1,3) Fucosyltransferase IX inkubiert (siehe Kapitel 3.5.3). Da es sich um einen

polyklonalen Antikörper handelte, lagerte sich der Antikörper nicht nur an der α (1,3) Fucosyltransferase IX an sondern auch an unspezifischen Proteinfragmenten. Zur Absicherung wurde jeder *Blot* in Präimmunserum inkubiert (siehe Abbildung 25).

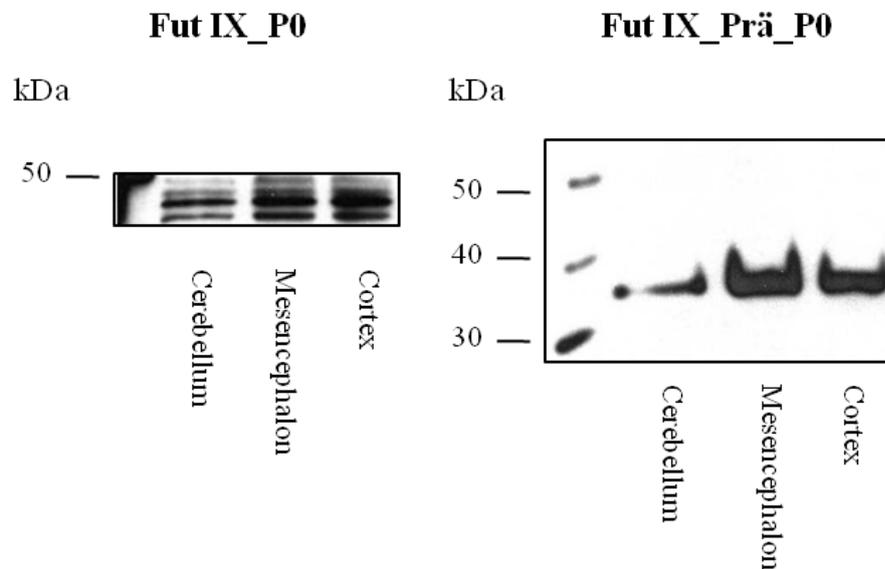


Abb. 25: Western Blot: Fut IX Alterstufe P0 (Versuchsmaus eprot) (siehe Abb. links) samt Präimmunserum Rb₂ (Versuchsmaus eprot) (siehe Abb. rechts)

Abszisse: Probenentnahmeorte, Ordinate: Molekulargewicht in kiloDalton, die erkennbare Bande auf Höhe von 41.900 Da stellt Fut IX in den verschiedenen Arealen dar; da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelt sind Artefakte im Sinne von Fehlbanden zu erkennen, welche mittels Präimmunserum Rb₂ (siehe Abb. rechts) bestätigt wurden, pro Lane wurden 15 μ g Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 15 Sek., n=8.

Die Spezifität der Signale wurde so durch die Negativkontrolle bestätigt und der *Blot* wurde für die weitere Auswertung verwendet (siehe Kapitel 3.5.5). Die Bande auf Höhe von ca. 35 kDa stellte kein Problem dar. Sie war auf jedem mit Präimmunserum Rb₂ inkubierten *Blot* auf der gleichen Höhe präsent. Bei der densitometrischen Analyse wurde nur die Bande verwendet, die auf Höhe von 41.900 Da erkennbar war. Da der Marker *MagicMarkTM XP Western Protein Standard* (Invitrogen) eine hohe Affinität zu der Spezies Kaninchen aufwies, aus welcher der Antikörper gewonnen wurde, konnten die Banden eindeutig zugeordnet werden. Nachdem die PVDF-Membran mittels der *Stripping* Methode von den verwendeten Antikörpern und der *ECL*-Lösung befreit worden war, fand die Inkubation mit den passenden Antikörpern für die Detektion von CD15 statt (siehe Abbildung 26). Die immunochemischen Detektionen der untersuchten Proteinmengen wurden nacheinander durchgeführt um die

Banden sicher zuordnen zu können, da das Molekulargewicht von CD15 (44 kDa), Fucosyltransferase IX (41.900 Da) und β -Tubulin II (55 kDa) engmaschig beieinander lagen. Auch verhinderten die zu unterschiedlichen Belichtungszeiten eine gemeinsame Inkubation (siehe Kapitel 3.9.3).

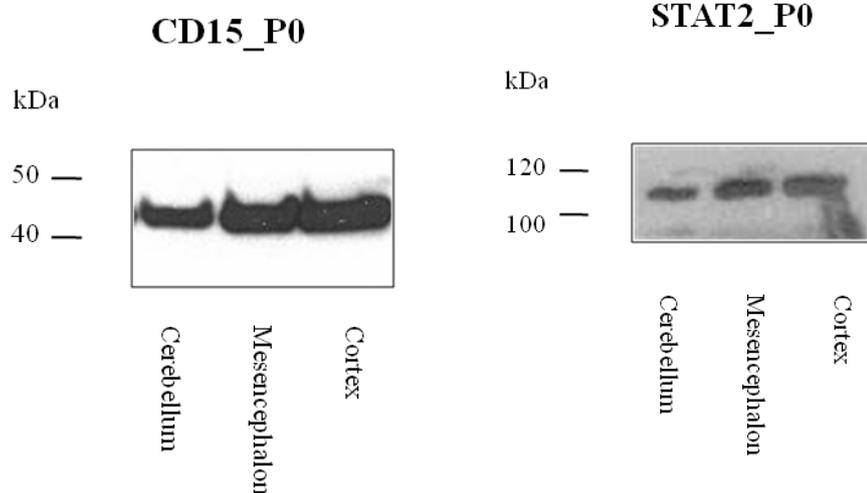


Abb. 26: Western Blot: CD15
Alterstufe P0 (Versuchsmaus eprot)
 Abszisse: Probenentnahmeorte,
 Ordinate: Molekulargewicht in kiloDalton,
 die erkennbare Bande auf Höhe von **44 kDa** stellt CD15 in den verschiedenen Arealen dar, pro Lane wurden 15 μ g Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 60 Min., **n=8**.

Abb. 27: Western Blot: STAT 2
Alterstufe P0 (Versuchsmaus eprot)
 Abszisse: Probenentnahmeorte,
 Ordinate: Molekulargewicht in kiloDalton,
 die erkennbare Bande auf Höhe von **113 kDa** stellt STAT 2 in den verschiedenen Arealen dar, pro Lane wurden 15 μ g Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 60 Min., **n=8**.

Zuletzt wurde die Protein-beladene Membran mit den passenden Antikörpern für STAT 2 inkubiert und der *Blot* entwickelt (siehe Kapitel 3.5.2 und Abbildung 27). Nun erfolgte die densitometrische Analyse der angefertigten *Blots* der Altersstufe P0 mit Hilfe der *Software ImageJ*. Um die Sensitivität zu erhöhen wurde für jede Probe die relative Densität mit Hilfe des *Housekeeping-Proteins* β -Tubulin II berechnet. Die Werte der unterschiedlichen Gehirnareale für die untersuchten Proteine wurden nun altersbezogen auf P0 verglichen (siehe Abbildung 28). Bei Betrachtung der einzelnen Hirnareale fiel die relative Densität sehr heterogen aus.

Während der Cortex keine signifikanten Unterschiede in der Proteinmenge von α (1,3) Fucosyltransferase IX, dem Epitop CD 15 und STAT 2 aufwies, konnten für das Cerebellum und das Mesencephalon signifikante Abweichungen in der relativen Densität bezogen auf die untersuchten Proteine bzw. Epitop festgestellt werden.

Relative Densität der Altersstufe P0

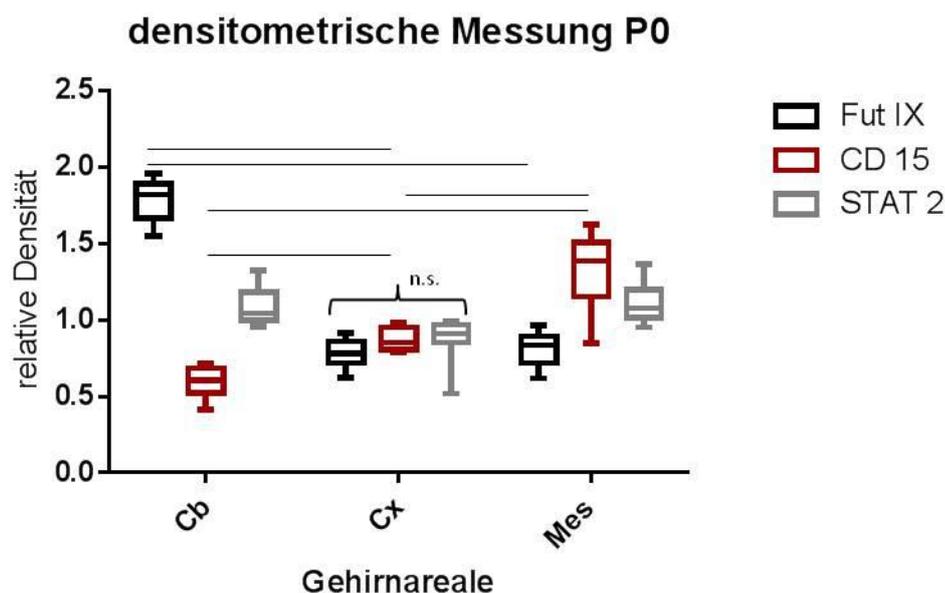


Abb. 28: Proteinmenge Altersstufe P0

Abszissenachse: Hirnareale, Ordinatenachse: relative Densität, schwarz = Fut IX, rot = CD 15, grau = STAT 2, Box Plots mit Median, Quartilen, Max und Min; **nicht** signifikante Unterschiede sind mit Querbalken markiert (n.s.) und mit geschweiften Klammer zur Vereinfachung zusammengefasst; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit Querbalken markiert; $n=8$.

Für die α (1,3) Fucosyltransferase IX konnte ein signifikant erhöhter Wert der relativen Densität für das Cerebellum im Vergleich zu Cortex und Mesencephalon festgestellt werden. Für CD 15 wurden wiederum signifikant erhöhte Proteinmengen im Mesencephalon verglichen mit Cortex und Cerebellum ermittelt. Abweichend davon waren die Werte der relativen Densität für die STAT 2 in den unterschiedlichen Regionen (Cerebellum, Cortex und Mesencephalon) tendenziell gleich. Eine systematische Beziehung konnte nicht festgestellt werden.

4.2.2 Quantität der Proteinmengen in der Altersstufe P42

Auch die Proben der Altersstufe P42 wurden zuerst mit den passenden Antikörpern für die α (1,3) Fucosyltransferase IX inkubiert. Aufgrund des polyklonalen Primärantikörpers (siehe auch Kapitel 4.2.1) wurde wiederum zur Absicherung eine Inkubation mit Prä-Immunsereum Rb₂ durchgeführt (siehe Abbildung 32). Auf dem entwickelten *Blot* (Präimmunsereum) waren auf Höhe der Bande der α (1,3) Fucosyltransferase IX (41.900 Da) keine Signale zu erkennen. Die mit den Antikörpern inkubierten *Blots* wiesen, die für einen polyklonalen Antikörper typische, „falschen“ Banden auf (siehe Abbildung 29).

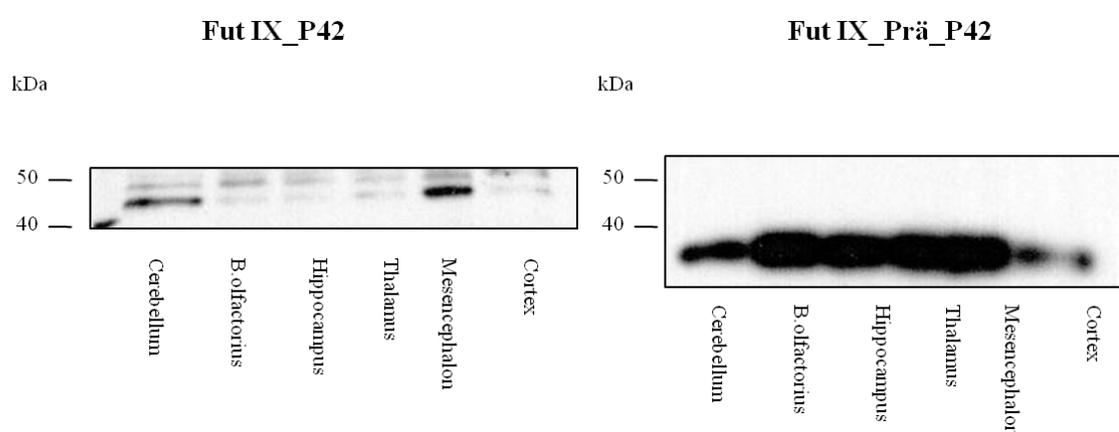


Abb. 29: Western Blot: Fut IX Alterstufe P42 (Versuchsmaus e5j) (siehe Abb. links) samt Präimmunsereum Rb₂ (Versuchsmaus e5j) (siehe Abb. rechts)

Abszisse: Probenentnahmeorte, Ordinate: Molekulargewicht in kiloDalton, die erkennbare Bande auf Höhe von 41.900 DA stellt Fut IX in den verschiedenen Arealen dar, da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelt sind Artefakte zu erkennen, welche mittels Präimmunsereum Rb₂ (siehe Abb. rechts) bestätigt wurden, pro Lane wurden 15 μ g Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 15 Sek., n=10.

Für die densitometrische Auswertung wurde abermals nur die Bande mit dem spezifischen Molekulargewicht von 41.900 Da verwendet. Wie auch schon mit den Proben der Altersstufe P0 wurden nun die *Blots* für die Inkubation mit den nächsten passenden Antikörpern für CD15 aufbereitet. Dies erfolgte mittels *Stripping*-Methode (siehe Kapitel 3.5.4).

Nach Immunochemischer Detektion der CD15 Proteine wurde auf Höhe der erwarteten Bande von 44 kDa eine Doppelbande ersichtlich (siehe Abbildung 30).

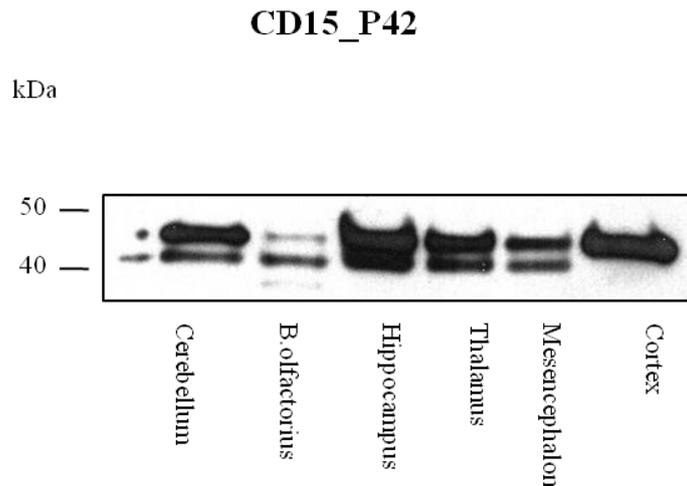


Abb. 30: Western Blot: CD15 Alterstufe P42 (Versuchsmaus e6j)

*Abszisse: Probenentnahmeorte, Ordinate: Molekulargewicht in KiloDalton; die erkennbare Bande auf Höhe von **44 kDa** stellt CD15 in den verschiedenen Arealen dar, gut erkennbar ist das Artefakt der Doppelbande aufgrund glykolisierter Proteinanteile, pro Lane wurden 15 µg Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 60 Min., n=10.*

Diese Artefakte kamen durch glykolisierte Proteinfragmente des untersuchten CD15 zustande, welche auf allen angefertigten *Blots* der Altersstufe P42 für CD15 zu erkennen waren. Für die densitometrische Analyse wurde die Bande auf Höhe von 44 kDa samt den glykolisierten Proteinfragmenten genommen. Zuletzt fand die Inkubation zur Untersuchung der STAT 2 statt (siehe Abbildung 31).

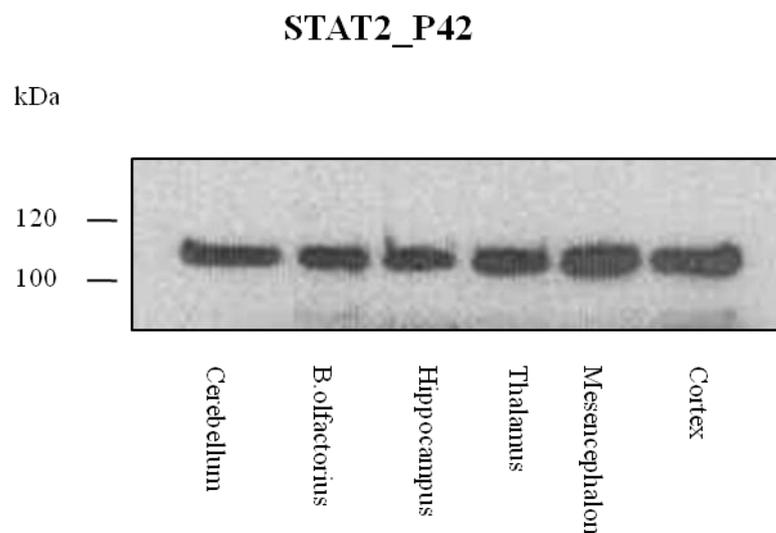


Abb. 31: Western Blot: STAT 2 Alterstufe P42 (Versuchsmaus e5j)

*Abszisse: Probenentnahmeorte, Ordinate: Molekulargewicht in kiloDalton, die erkennbare Bande auf Höhe von **113 kDa** stellt STAT 2 in den verschiedenen Arealen dar, pro Lane wurden 15 µg Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 60 Min., n=10.*

Der weitere Ablauf gestaltete sich wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Die densitometrische Analyse der Proben der Altersstufe P42 ergab im Vergleich zur Altersstufe P0 ein unterschiedliches Verteilungsmuster (siehe Abbildung 32).

Auffällig war, dass für *Bulbus olfactorius* und *Thalamus* keine signifikanten Unterschiede in der relativen Densität für die α (1,3) Fucosyltransferase IX, CD 15 und STAT 2 erhoben wurden. Auch wiesen Cortex und Mesencephalon keine signifikanten Unterschiede für CD 15 und STAT 2 auf. Lediglich Cerebellum und Hippocampus wiesen signifikante Unterschiede in allen ermittelten Proteinmengen auf. Die höchsten Werte der untersuchten α (1,3) Fucosyltransferase IX, CD15 und STAT 2 waren alle im *Cerebellum* vorzufinden. Auch waren die geringsten Mengen der α (1,3) Fucosyltransferase IX, CD15 und STAT 2 alle im selben Gehirnareal - dem *Bulbus olfactorius* - lokalisiert.

Relative Densität der Altersstufe P42

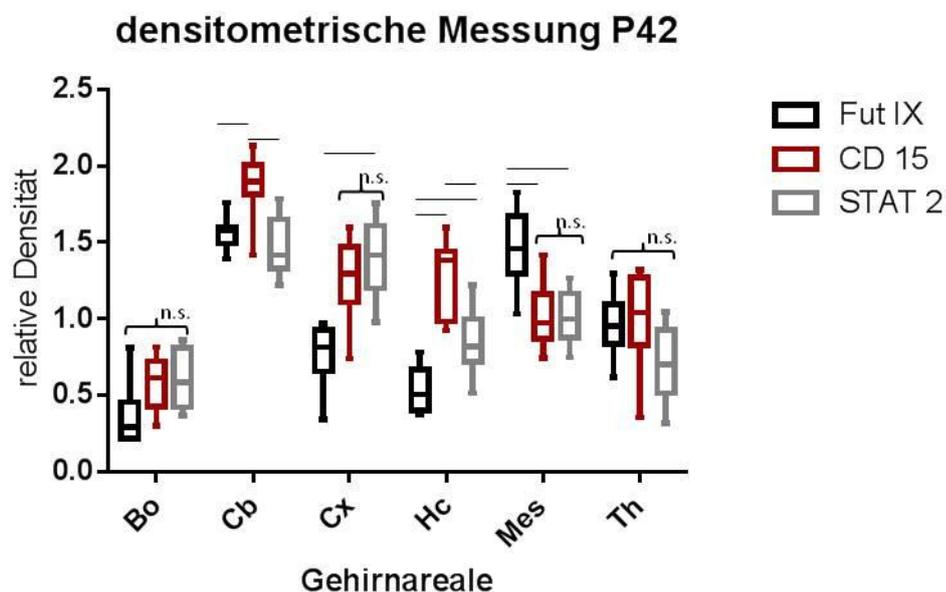


Abb. 32: Proteinmenge Altersstufe P42

Abszissenachse: Hirnareale, Ordinatenachse: relative Densität, schwarz = Fut IX, rot = CD 15, grau = STAT 2, Box Plots mit Median, Quartilen, Max und Min; **nicht** signifikante Unterschiede sind mit Querbalken markiert (n.s.) und mit geschweiften Klammer zur Vereinfachung zusammengefasst; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit Querbalken markiert; $n=10$.

Tendenziell konnte für das Cerebellum, den Cortex und das Mesencephalon im Vergleich zur Altersstufe P0 ein allgemeiner Anstieg der relativen Densität der

untersuchten α (1,3) Fucosyltransferase IX, CD15 und STAT 2 festgestellt werden. Die Verteilung bzw. der Vergleich innerhalb der Hirnareale des Zeitpunktes P42 wies keine erkennbaren Beziehungen auf und war äußerst heterogen.

4.2.3 Quantität der Proteinmengen in der Altersstufe P365

Die Proben der Altersstufe P365 wurden identisch im Ablauf (siehe Kapitel 4.2.2) wie in den anderen Altersstufen P0 und P42 inkubiert und ausgewertet.

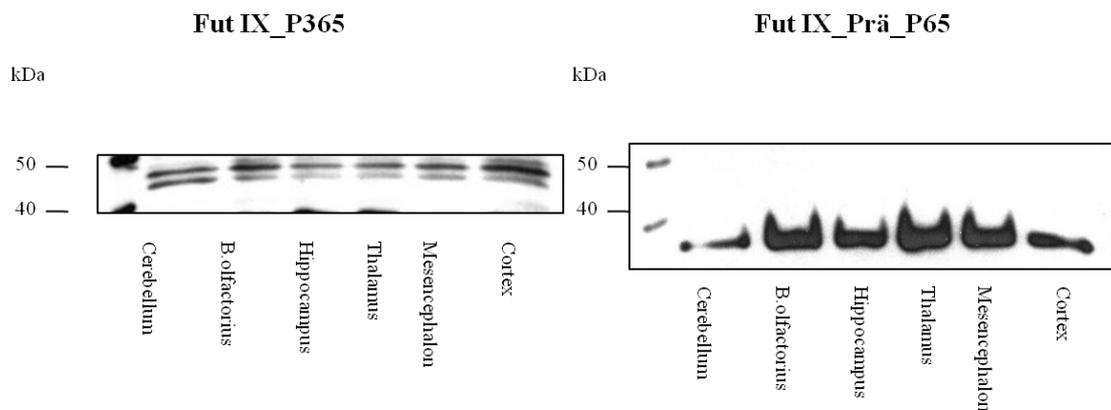


Abb. 33: Western Blot: Fut IX Altersstufe P365 (Versuchsmaus e12j) (siehe Abb. links) samt Präimmunserum Rb₂ (Versuchsmaus e12j) (siehe Abb. rechts)
 Abszisse: Probenentnahmeorte, Ordinate: Molekulargewicht in KiloDalton; die erkennbare Bande auf Höhe von **41.900 DA** stellt Fut IX in den verschiedenen Arealen dar; da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelt sind Artefakte zu erkennen, welche mittels Präimmunserum Rb₂ (siehe Abb. rechts) bestätigt wurden, pro Lane wurden 15 μ g Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 15 Sek., n=12.

Da sich der polyklonale Antikörper nicht nur an der α (1,3) Fucosyltransferase IX anlagert, wurde die Spezifität der Signale erneut durch die Negativkontrolle bestätigt und der *Blot* für die weitere Auswertung verwendet (siehe Kapitel 3.5.5 und Abbildung 33).

Für die nachfolgende Inkubation mit den passenden Antikörpern für CD15 musste mittels *Stripping*-Methode die PVDF-Membran wie schon bei den Altersstufen P0 und P42 aufbereitet werden. Anders als bei den Versuchsmäusen (Stamm: C57B1/6) der Altersstufe P42 konnte hier keine Doppelbande im Sinne von glykolisierten Proteinfragmenten festgestellt werden (siehe Abbildung 34).

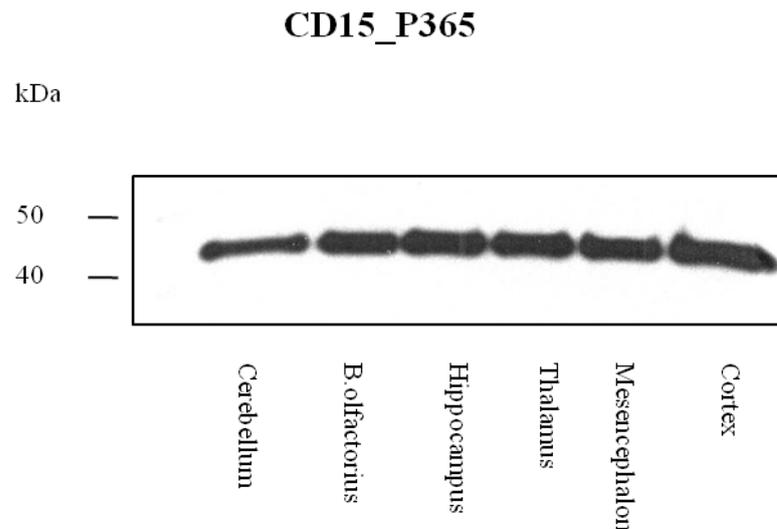


Abb. 34: Western Blot: CD15 Alterstufe P365 (Versuchsmaus e2j)

Abszisse: Probenentnahmeorte, Ordinate: Molekulargewicht in kiloDalton, die erkennbare Bande auf Höhe von 44 kDA stellt CD15 in den verschiedenen Arealen dar, pro Lane wurden 15 µg Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 60 Min., n=12.

Zuletzt fand nach abermaliger Aufbereitung der PVDF- Membran mit Hilfe des *Plus Western Blot Stripping Buffer* (Pierce) die Inkubation mit den Antikörpern für STAT 2 statt (siehe Abbildung 35). Die Banden befanden sich auf der erwarteten Höhe von 113 kDa und wurden für die folgenden Analysen verwendet.

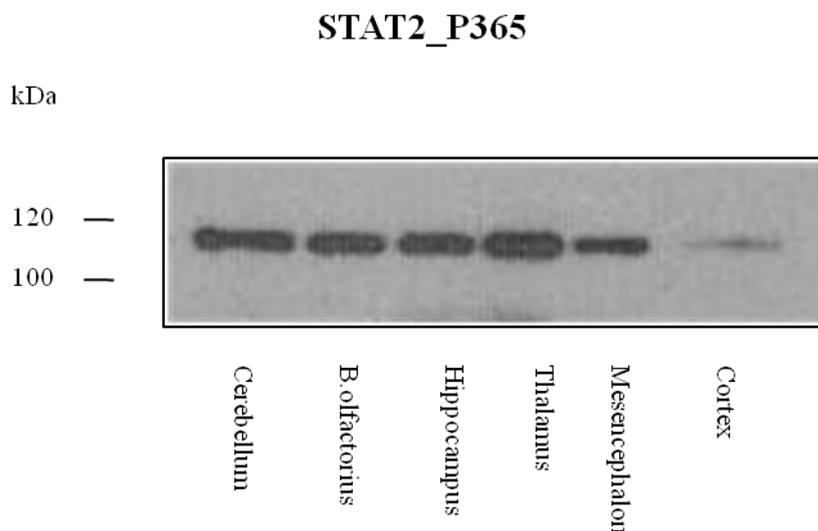


Abb. 35: Western Blot: STAT 2 Alterstufe P365 (Versuchsmaus e4j)

Abszisse: Probenentnahmeorte, Ordinate: Molekulargewicht in kiloDalton, die erkennbare Bande auf Höhe von 113 kDA stellt STAT 2 in den verschiedenen Arealen dar, pro Lane wurden 15 µg Protein aufgetragen, Belichtungszeit: 60 Min., n=12.

Nach der densitometrischen Auswertung mit der *Software ImageJ* wurden die Ergebnisse der Proben der Altersstufe P365 sich gegenübergestellt (siehe

Abbildung 36). Die Proteinmengen waren Areal umgreifend heterogen und wiesen arealbezogen nicht signifikante Unterschiede im Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Mesencephalon und Thalamus und Bulbus auf.

Relative Densität der Altersstufe P365

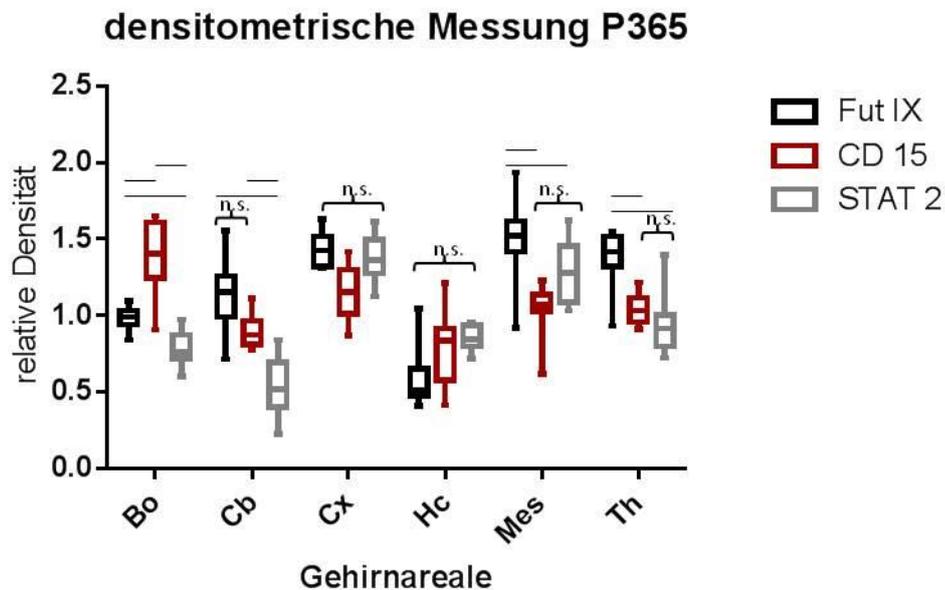


Abb. 36: Proteinmenge Altersstufe P365

Abszissenachse: Hirnareale, Ordinatenachse: relative Densität, schwarz = Fut IX, rot = CD 15, grau = STAT 2, Box Plots mit Median, Quartilen, Max und Min; nicht signifikante Unterschiede sind mit Querbalken markiert (n.s.) und mit geschweiften Klammer zur Vereinfachung zusammengefasst; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit Querbalken markiert; $n = 12$.

Jedoch gehörten die ermittelten Daten zu den höchsten Werten innerhalb der Altersstufen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass tendenziell zwischen P0 und P365 eine stetige Steigerung der relativen Densität der untersuchten Hirnareale zu erkennen war. Aber innerhalb der einzelnen untersuchten Regionen einer Altersstufe kein direkter Bezug oder ein homogenes Muster aus der densitometrischen Messung ermittelt werden konnte. Die Werte der relativen Densität waren im Vergleich der einzelnen Hirnareale Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Mesencephalon und Thalamus sehr unterschiedlich und ließen kein Muster erkennen.

4.2.4 Veränderung während der Altersentwicklung

Der altersübergreifende Verlauf der ermittelten relativen Densität *in toto* für die α (1,3) Fucosyltransferase IX, CD15 und STAT 2 spiegelte ein charakteristisches Muster wieder (siehe Abbildung 37).

Relative Densität Hirn gesamt

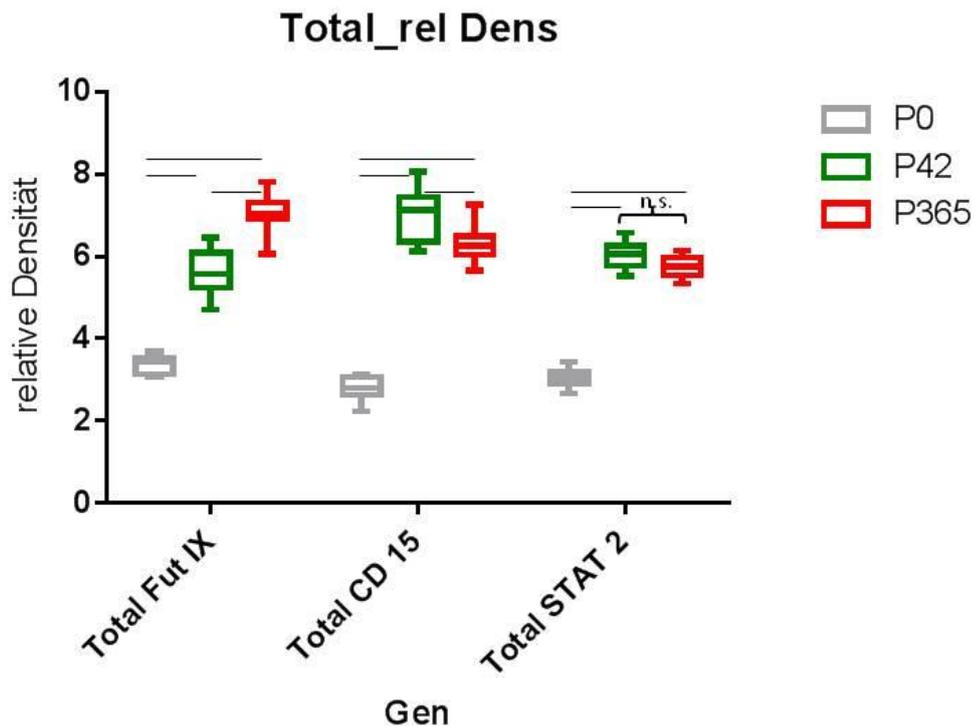


Abb. 37: Verlauf der relativen Densität entlang der Altersstufen

Abszissenachse: Proteinmengen der α (1,3) Fucosyltransferase IX, CD15 und STAT 2
 Ordinatenachse: relative Densität, schwarz = Fut IX, rot = CD 15, grau = STAT 2, Mittelwert und Max; **nicht** signifikante Unterschiede sind mit Querbalken markiert (n.s.) und mit geschweiften Klammer zur Vereinfachung zusammengefasst; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit Querbalken markiert; $n=30$.

In toto zeigten die densitometrischen Messungen der α (1,3) Fucosyltransferase IX einen signifikanten Anstieg innerhalb der Altersstufen P0, P42 und P365. Hierbei waren die Werte der relativen Densität von P365 annähernd doppelt so hoch wie die in P0. Im Gegensatz dazu wiesen CD 15 und STAT 2 einen abweichenden Verlauf auf. Zwar waren auch hier die geringsten Werte in der Altersstufe P0 ermittelt worden, jedoch kam es in P42 zu einem signifikanten Anstieg der relativen Densität. Darauf folgte ein nicht signifikanter, tendenzieller Abfall der ermittelten Werte in der Altersstufe P365. Sowohl CD 15

als auch STAT 2 wiesen einen annähernd kongruenten Verlauf innerhalb der Altersstufen auf. Hierbei waren die ermittelten Werte in der Altersstufe P0 für alle untersuchten Gruppen (α (1,3) Fucosyltransferase IX, CD15, STAT 2) am geringsten, P42 wies einen signifikanten Anstieg der relativen Densität auf, welches zum Zeitpunkt P365 von einem nicht signifikanten Abfall gefolgt wurde.

Bei Betrachtung der einzelnen Hirnareale ist anzumerken, dass aufgrund der Präparationen für die Altersstufe P0 keine Proben für den *Bulbus olfactorius*, *Hippocampus* und den *Thalamus* verglichen werden konnten. Die Entwicklung der Proteinmenge von der α (1,3) Fucosyltransferase IX (siehe Abbildung 38) wies einen starken Anstieg der relativen Densität in allen Bereichen (mit Ausnahme des *Cerebellums*) der Altersstufe P365 auf.

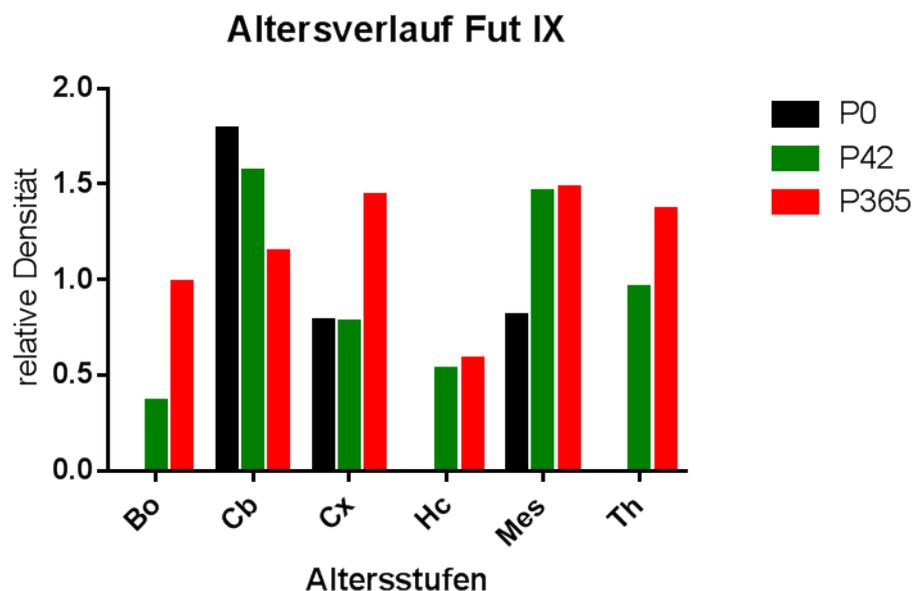


Abb. 38: Vergleich der Altersstufen Fucosyltransferase IX

Abszissenachse: Hirnareale samt Altersstufen, Ordinatenachse: relative Densität (Mittelwert), Farberläuterungen bezüglich der unterschiedlichen Altersstufen siehe Legende (rechts).

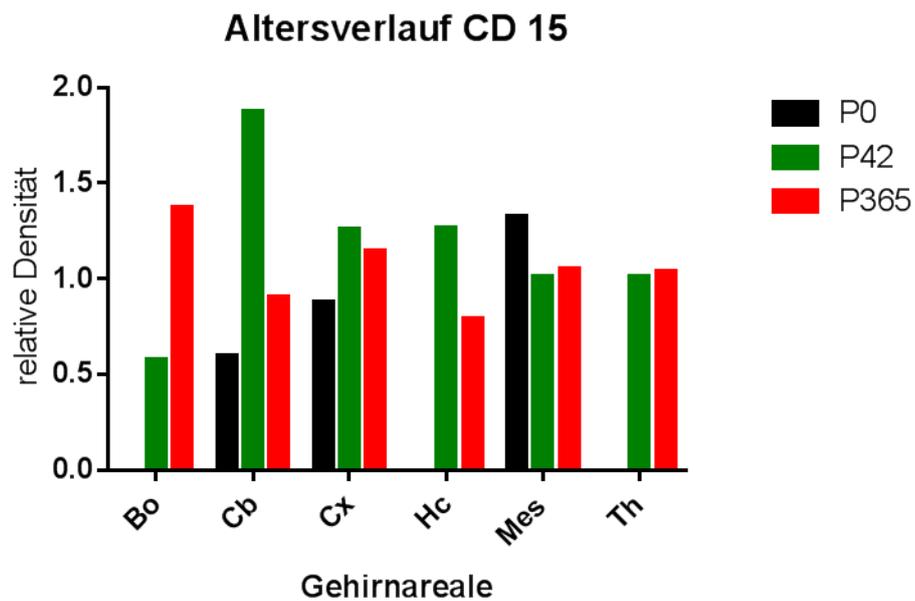


Abb. 39: Vergleich der Altersstufen CD15

Abszissenachse: Hirnareale samt Altersstufen, Ordinatenachse: relative Densität (Mittelwert), Farberläuterungen bezüglich der unterschiedlichen Altersstufen siehe Legende (rechts).

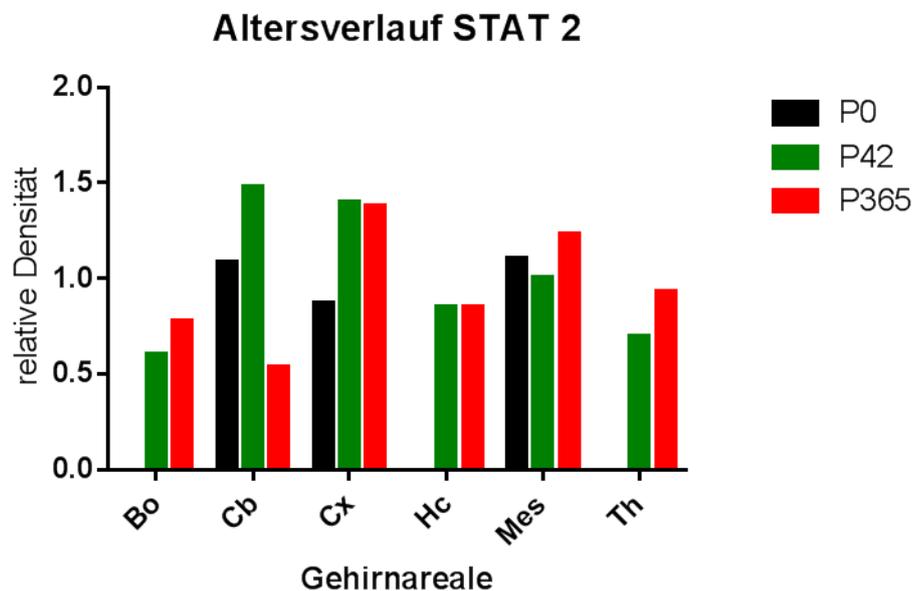


Abb. 40: Vergleich der Altersstufen STAT 2

Abszissenachse: Hirnareale samt Altersstufen, Ordinatenachse: relative Densität (Mittelwert), Farberläuterungen bezüglich der unterschiedlichen Altersstufen siehe Legende (rechts).

Im Cerebellum kam es zu einer stetigen Abnahme der relativen Densität. Im Gegensatz dazu zeigte die Aufstellung der CD 15 und STAT 2 Werte einen anderen Verlauf der relativen Densität entlang der Altersstufen (Abbildung 39 und 40). So waren die höchsten Proteinmengen vermehrt in der Altersgruppe

P42 zu finden. Ausnahme waren für CD 15 und STAT 2 der *Thalamus*, *Mesencephalon* und der *Bulbus olfactorius*. Der *Bulbus olfactorius* und *Thalamus* wiesen für beide untersuchten Gruppen (CD15 und STAT 2) die höchsten Werte in der Altersstufe P365 auf. Das *Mesencephalon* hatte die höchste relative Densität im Alter von P0. Während die absoluten Werte von CD 15 und STAT 2 nicht identisch waren konnte dennoch ein ähnlicher Verlauf der Proteinentwicklung in den Altersstufen festgestellt werden. Im Vergleich zur α (1,3) Fucosyltransferase IX konnten aber keine ähnlichen Tendenzen festgestellt werden.

5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, anhand von qPCR und Western Blot Analysen die Genexpression und das Proteinvorkommen der α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX in unterschiedlichen Hirnarealen unterschiedlicher Altersstufen zu bestimmen. Ferner sollte untersucht werden, ob Korrelationen zur Produktion von CD 15 und STAT 2 bestehen.

Da CD 15 sowohl regional als auch zeitabhängig große Unterschiede innerhalb des Gehirns zeigt, war es notwendig beide Parameter für die Bestimmung der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IV und IX zu berücksichtigen. Um vergleichbare Aussagen treffen zu können wurden die im Kapitel 2 bereits beschriebenen Alterszeitpunkte und Gehirnregionen untersucht.

5.1 Die Versuchstiere – *Mus musculus* C57B1/6

Die Sequenz des Gens der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX weist nur eine geringe Abweichung der Nukleotidsequenz zwischen *Homo sapiens* und *Mus musculus* auf [Baboval and Smith, 2002; Kaneko et al., 1999; Kudo et al., 1998a; Ozawa and Muramatsu, 1996]. Durch die evolutionär bedingt, gut konservierten murinen Gene lassen sich womöglich Rückschlüsse auf die humanen Gene ziehen und die erhaltenen Daten als Grundlage für weitere Untersuchungen an humanen Proben dienen [Oriol et al., 1999]. Die Gewebeproben wurden anhand drei Altersstufen aufgeteilt.

Die erste Gruppe bildeten Spezies, deren Proben direkt nach der Geburt entnommen wurden und nur wenige Stunden alt waren (=P0); n=16. Die zweite Gruppe beinhaltete sechs Wochen (=P42); n=20 und die dritte Gruppe ein Jahr (=P365) alte *Mus musculi*; n=24. Von allen Altersstufen wurden Proben der Hirnabschnitte Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex und Mesencephalon erstellt. Zusätzlich wurden für die Altersstufen P42 und P365 noch Proben aus Thalamus und Hippocampus entnommen.

5.2 Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX – Methode qPCR

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Genexpressionsraten mittels quantitativer PCR ermittelt. Um Artefakte zu vermeiden wurden alle Proben identisch aufbereitet und gelagert (siehe auch Kapitel 3). Es fanden sensible, bereits etablierte Systeme (u.a. *AbiPrism 7900HT*) Anwendung um eine möglichst genaue Aussage treffen zu können. Jede Probe wurde unter reinen Bedingungen extrahiert und mit einem RNase Inhibitor versetzt um Verunreinigungen und Degenerationen zu vermeiden. Auch wurde der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} ermittelt und nur hochwertige, reine RNA mit einem Wert von $\geq 1,60 - \leq 2,0$ verwendet um Fehldaten zu vermeiden.

Nach Aufbereitung wurde aus jeder Probe 100 μg cDNA zur Ermittlung der Genexpression verwendet. Die verwendeten Primer wurden frisch angesetzt und nach Protokoll gehandhabt um Degenerationen zu vermeiden. Zur Absicherung wurde jeder Durchlauf mit einer Negativprobe durchgeführt um Verunreinigungen auszuschließen und Abweichungen auszugleichen (siehe auch Kapitel 3). Jede Probe wurde doppelt angesetzt und der erhaltene Mittelwert für die Datensammlung verwendet. Als Referenzgen fand GAPDH Verwendung. Es zählt zu den *Housekeeping*-Genen, welche unter nicht pathologischen Bedingungen zu den am konstantesten exprimierten gehören und daher zu den meist verwendeten Referenzgenen zählen [Barber et al., 2005]. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der relativen Quantifizierung und der komparativen $2^{-\Delta\text{Ct}}$ Methode [Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008].

Die relative Quantifizierung mittels qPCR stellt eine genaue Erfassung der mRNA Quantifizierung dar und gilt als Methode der Wahl für quantitative Expressionsanalysen [Pfaffl, 2001]. Sie bot die Möglichkeit, direkt das verwendete Referenzgen in Bezug zur Probe zu setzen. Ferner ermöglicht es in einem gewissen Rahmen Abweichungen in der RNA-Qualität auszugleichen. Damit bot diese Methode die beste Voraussetzung zur quantitativen Expressionsanalyse [Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008].

5.3 Vorkommen der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX in den unterschiedlichen Hirnarealen

Mit Hilfe der Gewebeproben aus unterschiedlichen Hirnregionen sollte zunächst überprüft werden, ob die für die Synthese von Lewis (x) essentielle Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX arealspezifisch im Gehirn vorhanden sind. Bisherige Untersuchungen trafen entweder nur Aussagen zur CD 15 in einzelnen Arealen oder dem gesamten Gehirn [Ashwell and Mai, 1997c, a; Kudo et al., 1998a; Marcus et al., 1999] oder zur Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen in unterschiedlichen Abschnitten oder zu verschiedenen Zeitpunkten. Ein direkter Vergleich der Daten von unterschiedlichen Hirnarealen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde nicht erhoben.

In dieser Arbeit wurde anhand von der relativen Expressionsrate festgestellt, dass die α (1,3) Fucosyltransferase IX zum Zeitpunkt P0 schwächer exprimiert wurde als die α (1,3) Fucosyltransferase IV, jedoch zum Zeitpunkt P365 annähernd gleich hohe Expressionsraten aufwies wie die α (1,3) Fucosyltransferase IV, welche die höchsten ermittelten Werte der Studie darstellten. Ein Anstieg der Expression der α (1,3) Fucosyltransferasen IX im Cortex zwischen 12 Tage alten Föten (E12) und 12 Tage alten Mäusen (P12) wurde bereits festgestellt [Ishii et al., 2007]. Jedoch ist der Expressionsverlauf zwischen den Zeitpunkten E12 und P12 und darüber hinaus nicht engmaschiger untersucht und keine weiteren Hirnareale sondern nur der Cortex mit einbezogen worden. Ishii et al. fanden aber im Gegensatz zu dieser Studie eine Korrelation zwischen dem Glykokonjugat CD 15 und der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferase IX heraus.

Die Rolle der Fucosyltransferasen in der Hirnentwicklung ist bereits beschrieben und die α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX sind maßgeblich an der Embryogenese beteiligt [Cailleau-Thomas et al., 2000]. Jedoch liegen auch Untersuchungen vor, die trotz fehlender α (1,3) Fucosyltransferase IX eine normale Embryogenese nachwiesen [Kudo et al., 2004]. Diese Untersuchung steht jedoch im Widerspruch anderen Studien, welche entweder geistige Defizite oder Fehlentwicklungen bei fehlender α (1,3) Fucosyltransferase IX

feststellten [Kudo et al., 2007; Nishihara et al., 2003; Noro et al., 2015]. Die detektierten Mengen der α (1,3) Fucosyltransferasen IX haben die der α (1,3) Fucosyltransferasen IV überstiegen. So haben [Nishihara et al., 2003] für das Cerebellum und Cerebrum in diversen Altersstufen (P0, P7, P30, P100) 15-100mal so hohe Werte für die α (1,3) Fucosyltransferasen IX als für die α (1,3) Fucosyltransferasen IV festgestellt. Im Laufe der Entwicklung nahmen die Expressionswerte beider Fucosyltransferasen in den beiden untersuchten Proben Cerebellum und Cerebrum stetig ab bis es zu einer Stagnation zwischen P30 und P90 kam. Beide α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX sind im Gehirn bereits in der embryonalen Entwicklung vorhanden, jedoch lassen Untersuchungen den Rückschluss zu, dass die α (1,3) Fucosyltransferase IX in der Embryogenese überwiegt [Kudo et al., 2004; Nishihara et al., 2003]. Die genaue Rolle der α (1,3) Fucosyltransferase IX während der Embryogenese ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

In dieser Arbeit wurden Altersstufen ab P0 untersucht. Zu allen Zeitpunkten konnte auch hier eine unterschiedliche Expression beider α (1,3) Fucosyltransferasen festgestellt werden. Während die α (1,3) Fucosyltransferase IV der α (1,3) Fucosyltransferase IX in der Alterstufe P0 und P42 in jedem untersuchten Hirnareal überwog, kam es am Tag (P365) jedoch zu einem starken Anstieg der α (1,3) Fucosyltransferase IX, so dass die ermittelten Expressionswerte zu diesem Zeitpunkt annähernd gleich waren. In allen Hirnarealen fand sich mit zunehmendem Alter eine Abnahme der α (1,3) Fucosyltransferase IV. Für alle untersuchten Hirnareale wurden in dieser Arbeit voneinander abweichende Expressionsraten beider α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV bestimmt. Eine Tendenz der Expressionsratenentwicklung war jedoch erkennbar. So verlief die Expressionsrate der α (1,3) Fucosyltransferase IX mit einem temporären Tief in der Altersstufe P42, während die Expressionsraten P365 höher lagen als zu P0. Dies traf auf alle ermittelten Hirnarealen zu. Die α (1,3) Fucosyltransferase IV wies einen abnehmenden Verlauf der Expressionsrate während der Alterung auf. Die Abnahme war aber nicht signifikant und die Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IX hatte sich die der α (1,3) Fucosyltransferase IV in der Altersstufe P365 angenähert. In der Altersstufe P365 war die Expressionsrate beider α (1,3) Fucosyltransferasen zusammen am höchsten. Die ermittelten Expressionsraten der

unterschiedlichen Hirnareale wiesen keine Korrelation innerhalb der Altersstufen zueinander auf und waren äußerst variabel.

Die erhöhte Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV ließ Rückschlüsse auf die wichtige Rolle der α (1,3) Fucosyltransferase IV in Zell-Zell Interaktionen während der Embryogenese zu. Die Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX im Thalamus wurde für pränatale Gewebeproben bereits beschrieben. Anhand von immunochemischen Untersuchungen wurde die Rolle des CD 15 in Zell-Zell-Interaktionen während der Entwicklung und Reifung des Thalamus dargestellt [Forutan et al., 2001]. Durch die weiterhin stetig steigende Expressionsrate der α (1,3) Fucosyltransferasen IX bleibt es fraglich, ob es auch postnatal durch die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IX zu einer weiteren Hirnreifung im Zusammenspiel mit der Synthese des Glykokonjugates CD 15 kommt. Durch die erhöhten Expressionsraten der α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV zum Zeitpunkt P365 wurde aufgezeigt, dass auch postnatal die α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV weiterhin exprimiert werden und möglicherweise wichtige Funktionen innerhalb juveniler und adulter Hirnentwicklung, Leukozyteninfiltration und degenerativen Prozessen innehalten.

5.4 Quantifizierung der Proteine der α (1,3) Fucosyltransferase IX, CD 15 und STAT 2 – Methode Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots lassen sich Vorhandensein, Fehlen, Größe und/oder die Quantität von bestimmten Proteinen aus Homogenisaten bestimmen. Trotz der etablierten Anwendung seit 1979 handelt es sich hierbei um ein sensibles System mit erhöhter Anforderung an die Durchführung [Kurien and Scofield, 2006]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Proben identisch gelagert bzw. behandelt und stets gekühlt gelagert und mit einem Protease Inhibitor vermengt um Proteindegenerationen zu vermeiden. Mittels einer Proteinbestimmung wurde die Qualität der extrahierten Proteine bestätigt (siehe auch Kapitel 3).

Die Wahl der Antikörper fiel bis auf die α (1,3) Fucosyltransferase IX auf monoklonale Primär- und Sekundärantikörper aus. Ein monoklonaler Antikörper stand für die immunochemische Detektion der α (1,3) Fucosyltransferase IX aus

logistischen und monetären Gründen nicht zur Verfügung und so musste auf einen bereits vorhandenen polyklonalen Antikörper für die α (1,3) Fucosyltransferase IX zurückgegriffen werden. Der Antikörper für die α (1,3) Fucosyltransferasen IX stellte ein Problem dar, da er als polyklonaler Antikörper mit verschiedenen Epitopen und nicht nur mit dem Epitop der α (1,3) Fucosyltransferase IX reagierte. Eine Möglichkeit, Artefakte in Form von markierten Epitopen auszugrenzen bestünde in der Anwendung der Affinitätschromatographie. Hierauf musste aber aus Kostengründen verzichtet werden. Zur Absicherung der Immunreaktion wurde eine Negativkontrolle mit dem Präimmenserum Rabbit₂ durchgeführt um die Artefaktbanden von der eigentlichen α (1,3) Fucosyltransferasen IX Bande abzugrenzen. Auch fand die Anwendung eines Referenzgens als interne Kontrolle des Western Blots statt. Als *Housekeeping*-Gen wurde β -Tubulin II benutzt. Es stellt bis heute eines der meist genutzten Referenzgene im Western Blotting dar [Liu and Xu, 2006]. Damit die Quantitäten der einzelnen Proteine direkt verglichen werden konnten mussten die Membranen von den verwendeten Antikörpern gereinigt werden. Nach dem Stripping wurde auch hier eine Negativkontrolle mittels Fluoreszenzdetektion gemacht um sicherzustellen, dass alle Antikörper entfernt wurden. Bevor die gereinigte Membran für den nächsten Durchlauf benutzt wurde fand auch hier eine Ponceau-Färbung statt um die in der Membran übertragenen Proteine zu visualisieren.

Jede Membran konnte aufgrund des Proteinreichtums maximal dreimal gestrippt werden ohne dass es zu einem massiven Proteinverlust gekommen ist. Trotz bestehender Kritik [Elbaggari and 2008] wurden die Daten mittels densitometrischer Analyse ausgewertet, da die Bedingungen und Durchführung der Versuche zu keine Abweichungen in der Detektion der Proteine zur Folge hatten und homogene Bilder innerhalb einer Altersstufe entstanden [Taylor et al., 2013].

5.5 Korrelation zwischen den α (1,3) Fucosyltransferasen IX, IV und CD 15

In dieser Arbeit wurde ein erhöhtes Vorkommen der α (1,3) Fucosyltransferase IX entlang der Altersstufen samt einer in Relation stehenden mit dem Alter ansteigenden Bildung von CD 15 nachgewiesen. Mittels Western Blotting

wurden die Proteine von CD 15 und der α (1,3) Fucosyltransferase IX untersucht. Bei Betrachtung der Ergebnisse fiel auf, dass während des Alterungsprozesses auch hier ein Anstieg der ermittelten Proteine zu beobachten war. Eine Ausnahme bildete hier nur das Cerebellum, welches konstant geringere Proteinmengen zu allen bestimmten Zeitpunkten aufwies. Baboval et al. beschrieben, dass die α (1,3) Fucosyltransferase IV im Gehirn primär von den Purkinjezellen und die α (1,3) Fucosyltransferase IX von der Granularzellschicht im Cerebellum exprimiert werden [Baboval et al., 2000]. Während die Proliferation der Purkinjezellen postnatal bereits abgeschlossen ist, findet bis drei Wochen nach der Geburt noch eine Proliferation und Migration der Granularzellen statt [Matoba et al., 2000]. Im Laufe der Alterung wurde festgestellt, dass eine signifikante Abnahme der vorhandenen Purkinje- und Granularzellen zu verzeichnen ist [Andersen et al., 2003; Kennard et al., 2013; Rutten et al., 2007]. Die in dieser Studie erhobene Abnahme der Proteinmenge der α (1,3) Fucosyltransferase IX im Cerebellum lässt einen Zusammenhang mit dem Zellverlust von Purkinje- und Granularzellen im Alter vermuten.

Bei Betrachtung der Proteinmengen der erstellten Proben *in toto* (Gehirn gesamt) stellte sich ein heterogener Verlauf des CD 15 zur α (1,3) Fucosyltransferase IX heraus (Abb. 37). Während die α (1,3) Fucosyltransferase IX eine kontinuierliche Zunahme entlang der Altersstufen aufwies, konnte für CD 15 zwar auch ein Anstieg zwischen P0 und P365 festgestellt werden, jedoch waren die ermittelten Proteinmengen in der Altersstufen P42 am höchsten. Die höchsten Werte wurden auch hier wie in der ermittelten Genexpression für die α (1,3) Fucosyltransferase IX in der Altersstufe P365 erhoben.

Trotz sehr unterschiedlichen Werten der einzelnen unterschiedlichen Hirnareale, konnte für das gesamte Gehirn in dieser Studie für die α (1,3) Fucosyltransferase IX und das CD 15 eine zunehmende Expression entlang der Zeitpunkte P0, P42 und P365 festgestellt werden, welches auf eine physiologische Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferase IX samt CD 15 fernab der Embryogenese hinweisen könnte und die Bedeutung innerhalb der Maturation des Gehirns unterstreicht. Mit zunehmendem Alter verändert sich

die Morphologie des Gehirns und für diese „Umbauprozesse“ werden Zell-Zell-Kontakte erforderlich, welche die α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV durch die Synthese von CD 15 induzieren können [Gadhoun and Sackstein, 2008].

Auch zeigen andere Untersuchungen, dass die α (1,3) Fucosyltransferase IX nicht unabdingbar für die Embryogenese und v.a. Hirnentwicklung ist. Zwar geht das Fehlen der α (1,3) Fucosyltransferasen IX mit einem Verlust von CD 15 einher, allerdings wurde unter diesen Bedingungen eine normale Embryogenese beschrieben [Kudo et al., 2004]. Die Autoren vermuteten, dass bei Fut9⁻ / α (1,3) Fucosyltransferase IX Knock out - Mäusen und Fehlen von CD 15 ein alternativer Signalweg aktiviert wird und dadurch eine normale Hirnentwicklung stattfindet [Yagi et al., 2012]. Durch diese Arbeit wurde die Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferase IX für die Entstehung des CD 15 postnatal im murinen Gehirn untermauert; die alternativen Regulationswege sind aber völlig unklar.

Die im Alter zunehmend gestiegenen Expressionsraten der α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV und CD 15; wie in dieser Untersuchung gezeigt, lassen zwar auf eine wichtige Rolle im postnatalen murinen Hirn schließen, sind aber noch Gegenstand der Spekulation. Dennoch erscheint wichtig auf Verhaltensänderungen um Zusammenhang mit der α (1,3) Fucosyltransferase IX hinzuweisen. In einer Studie an Knock out - Mäusen (Fut9⁻) wurde ein auffallend ängstliches Verhalten samt emotionalem Defizit festgestellt [Kudo et al., 2007]. In diesem Zusammenhang ist der Nachweis von der α (1,3) Fucosyltransferase IX als einem relevanten Gen für die Entwicklung einer Schizophrenie interessant [Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, 2014]

5.6 Signaltransduktionsweg - STAT 2

Die *signal transducer and activator of transcription* (STAT) spielen eine zentrale Rolle in der Genexpression und Dysfunktionen sorgen nicht selten für Fehler im System und schließlich Erkrankungen des Körpers [Levy and Darnell, 2002]. Die sog. STATs beinhalten einen komplexen Signaltransduktionsweg (siehe auch Kapitel 1.3). Ein wichtiges Element stellt hierbei das auch von den Leukozyten produzierte Zytokin wie z.B. Interferon – α dar. Ob die STAT 2

einen direkten Einfluß auf die Genexpression von den α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV besitzt ist noch nicht bekannt. Jedoch ließen Vorversuche der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jürgen Konrad Mai einen möglichen Zusammenhang nicht ausschließen. So wurden in α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV transfizierten Mäusen erhöhte Werte der STAT 2 und STAT 1 festgestellt [Schwarz-Herzke, 2010a]. Auch konnte eine Korrelation zwischen CD 15 und STAT 2 ermittelt werden [Schwarz-Herzke, 2010b]. Innerhalb dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass im Laufe der Alterung die Expression der STAT 2 wie auch die der α (1,3) Fucosyltransferase IX zunahm (siehe auch Kapitel 4.2). So wurden für die STAT 2 in der Altersstufe P365 mehr als zweimal so hohe Werte wie in der Altersstufe P0 festgestellt. Ein äußerst interessanter Aspekt war hierbei die Korrelation mit den ermittelten CD 15. Die Werte waren in allen drei Altersstufen fast identisch. Bedenkt man, dass CD15 für die Leukozyteninfiltration von Bedeutung ist, so lässt dies auf eine Bedeutung der Zytokinausschüttung während Inflammation geschehen im Körper schließen. Leider ist bisher kein direkter Zusammenhang zwischen den STATs und der Genexpression von α (1,3) Fucosyltransferasen bestätigt.

5.7 Mögliche Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX und CD 15 im Gehirn während des Alterns

Entzündliche Prozesse können durch die α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX und der Synthese von CD 15 beeinflusst werden. So sind die α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX für die Selektin-abhängige Leukozytenadhäsion bzw. -infiltration verantwortlich [Buffone et al., 2013; Withers and Hakomori, 2000]. Nakayama et al. konnten feststellen, dass selbst innerhalb der Leukozyten unterschiedliche Fucosyltransferasen für die Expression von CD 15 verantwortlich sind [Nakayama et al., 2001]. So wurde in Granulozyten die α (1,3) Fucosyltransferase IX und sowohl in Monozyten als auch in Promyelozyten die α (1,3) Fucosyltransferase IV als bestimmende Fucosyltransferase ermittelt und festgestellt, dass CD 15 für die Mobilisierung von Leukozyten wie z.B. Monozyten verantwortlich ist [Withers and Hakomori, 2000]. Es ist bekannt, dass Leukozyten durch Freisetzung von Zytokinen in der Lage sind die Genexpression von α (1,3) Fucosyltransferasen zu regulieren und somit die Bildung von CD 15 beeinflussen können [Kaila and Thomas, 2002;

Kobzdej et al., 2002]. Auch wurde beschrieben, dass die Leukozyten selbst in der Lage sind durch die erhöhte Genexpression von α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX Selektine freizusetzen und so den Entzündungsprozess zu unterstützen [Kaila and Thomas, 2002; Kobzdej et al., 2002]. Die in dieser Studie festgestellte zunehmende Expression von α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX und dem Glykokonjugat CD 15 könnte auf die Funktion innerhalb Entzündungsprozesse im zunehmenden Alter hinweisen. Im Zusammenhang dazu stehen die Leukozyten-induzierten Entzündungsprozesse [Hauss-Wegrzyniak et al., 2000; Murray et al., 1998; Rogers et al., 1996]. Es wurde ein fortschreitender Anstieg von Entzündungsprozessen samt Leukozytenanstieg in nicht pathologischen, murinen Hirngewebe nach 12 und 24 Monaten festgestellt [Stichel and Luebbert, 2007]. Bei Betrachtung der Entwicklung der Genexpression beider α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX in dieser Studie fiel auf, dass in der Altersstufe P365 die Werte *in toto* am höchsten waren. Dies könnte für die Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX in Bezug auf Leukozyteninfiltration und den Studiendaten von Stichel et al. von Bedeutung sein, welche im Laufe der Alterung einen Anstieg von Inflammationsgeschehen feststellten und einen Zusammenhang zu Degenerationen von Gewebe vermuteten [Stichel and Luebbert, 2007].

Entzündungen, und in diesem Kontext auch Zelldegeneration, finden zeitlebens statt. Die Alterung des Gehirns ist ein komplexes Geschehen, welches sich auf alle Zellen samt zellulären Signalwegen auswirkt und mit degenerativen biologischen Vorgängen und erhöhtem Risiko z.B. für Alzheimer einhergehen kann [Landfield et al., 1992; Tanzi and Bertram, 2001]. Aber auch durch anderweitige pathologische Erkrankungen im Gehirn können inflammatorische Prozesse getriggert werden und so zu einer Degeneration führen [Wyss-Coray and Mucke, 2002].

Der genaue Beginn der Alterung ist jedoch noch nicht eindeutig definiert [Raz and Rodrigue, 2006]. Während der normalen Alterung des Gehirns kommt es zu leichten Abänderungen der Morphologie und Funktion in spezifischen neuronalen Schaltungen, zu Atrophie, Abnahme von Rezeptoren (z.B. Striale Dopamin-Rezeptoren) und pathologischen Reaktionen von Astrozyten und Mikroglia [Cevenini et al., 2010; Morrison and Hof, 1997]. Gerade bezüglich

inflammatorischer Prozesse im direkten Zusammenhang mit degenerativen Prozessen wie Alzheimer oder Parkinson ist bisher wenig bekannt.

Im Laufe des Alterungsprozesses nimmt auch die Anzahl der Entzündungsmediatoren wie u.a. Zytokine um das zwei bis vierfache zu [Krabbe et al., 2004]. Auch von anderen Autoren wurde ein altersabhängiger Anstieg von Zytokinen im alternden Hirn festgestellt [Lu et al., 2004; Terao et al., 2002]. Da Zytokine u.a. für die Signaltransduktion der Genexpression verantwortlich sind und auch von Leukozyten ausgeschüttet werden lässt sich ein Zusammenhang zwischen den in dieser Studie erhöhten Expressionsraten der α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV, CD 15 und STAT 2 in der Altersstufe P365 vermuten.

Ausgehend von der beschriebenen Rolle der Leukozyten im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen im alternden Gehirn [Lee et al., 2000] liegt der Verdacht nahe, dass die α (1,3) Fucosyltransferase IX durch die gestiegene Genexpression samt vermehrten CD 15 in der Altersstufe P365 auch eine tragende Rolle bei der verstärkten Leukozyteninfiltration im alternden Gehirn spielt. Unlängst wurde der Verdacht laut, dass durch Leukozyten-induzierte chronisch gesteigerte Inflammationsgeschehen die Degeneration des Hirngewebes begünstigt wird [Cevenini et al., 2010]. Dies steht auch im direkten Zusammenhang mit der Abnahme der kognitiven Leistung und dem Risiko an pathologischen degenerativen Prozessen wie Alzheimer zu erkranken [Lu et al., 2004].

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen noch einen anderen Rückschluss zu. Die zentrale Rolle des CD 15 bei Zell-Zell Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen ist ausführlich beschrieben [Munro et al., 1992; Rosen and Bertozzi, 1996]. Bisherige Studien belegen die Bedeutung des E-Selektins innerhalb Metastasegeschehen [Khatib et al., 1999]. Zirkulierende Tumorzellen können durch das CD 15 an das Endothel per E-Selektin andocken und dort zur Metastasenbildung führen. Auch belegte die Kannagi-Arbeitsgruppe detailliert den Zusammenhang erhöhter CD 15 Vorkommen mit Tumorprogression und schlechter Prognose [Kannagi, 1997; Kannagi, 2004; Kannagi et al., 2004]. Eine proportional steigende Malignität mit zunehmender

Anzahl von CD 15 Epitopen wurde in menschlichen Glioma bereits bestätigt [Reifenberger et al., 1992]. Durch die in dieser Studie belegten erhöhten Expressionsraten von CD 15 mit zunehmendem Alter könnten Tumormetastasen und Progression begünstigt werden. Inwiefern ausschlaggebend oder beteiligt die altersbedingte Entwicklung der Expression der untersuchten α (1,3) Fucosyltransferase IX und dem CD 15 für die Tumorprogression und Metastasenbildung ist, bedarf weiterer Abklärung.

Ferner wurden auch erhöhte Werte der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX innerhalb Apoptosegeschehen beschrieben [Azuma et al., 2007], welche auf eine weitere Funktion der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX innerhalb der körpereigenen Apoptose schließen könnte.

5.8 Schlussfolgerung

Die α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV sind für die Synthese des Glykokonjugates CD 15 verantwortlich. Ihre Funktionen sind experimentell beschrieben und nachgewiesen [Vries et al., 2001]. Im Fokus steht hierbei die Bedeutung innerhalb Zell-Zell Kontaktmechanismen. Ohne die von den α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX katalysierte Synthese von CD15 sind Ad- und Dishäsionsprozesse von Zellen per Selektine erschwert [Lowe, 1997; Lowe, 2002]. Ihre Bedeutung für die Embryogenese ist gefestigt und es liegen zahlreiche Studien für die Bedeutung innerhalb der Hirnentwicklung vor [Ashwell and Mai, 1997b, c, a; Bartsch and Mai, 1991; Forutan et al., 2001; Mai and Reifenberger, 1988; Mai and Schonlau, 1992; Marani and Mai, 1992; Morres et al., 1992]. Im Rahmen dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die Expression der α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV innerhalb der einzelnen Hirnabschnitte nicht identisch war und es areal- und zeitspezifische unterschiedliche Expressionsraten gab. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Werte innerhalb der untersuchten Hirnarealen ist die Bedeutung der α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV und dem Glykokonjugat CD 15 für die einzelnen Hirnarealen nur schwer abzuleiten. Jedoch konnte festgehalten werden, dass zu dem Zeitpunkt P0 die Werte der α (1,3) Fucosyltransferase IX niedriger waren als die der α (1,3) Fucosyltransferase IV. Dies änderte sich erst zum Zeitpunkt P42. Dort war die Expression der α (1,3) Fucosyltransferase IX nun

höher als die der α (1,3) Fucosyltransferase IV. Generell kam es entlang der Altersstufen zu einem Anstieg der Genexpression. Auch bei den ermittelten Proteinwerten waren die Daten unter den einzelnen Hirnarealen unterschiedlich und kein direkter Zusammenhang erkennbar. Eine Ausnahme bildete das Cerebellum, welches entlang der Altersstufen niedrigere Werte der ermittelten Proteinmengen aufwies. Diese Abnahme ließ einen Zusammenhang mit der physiologischen Abnahme der Purkinje- und Granularzellen im Cerebellum während des Alterns vermuten (siehe auch Kapitel 5.5).

Ein weiterer wichtiger Aspekt innerhalb Genexpression ist der Signaltransduktionsweg. Es kam zu einem fast identischen Anstieg der Proteinmengen von CD 15 und STAT 2 im Alterungsprozess. Sowohl in der Altersstufe P0, P42 und P365 waren die ermittelten Werte kongruent (siehe auch Kapitel 4.2). In Vorversuchen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Jürgen Konrad Mai und Dr. rer. nat. Beryl Schwarz-Herzke wurde in Fut4/Fut9 transfizierten Zellen ein erhöhtes Vorkommen von STAT 2 festgestellt [Schwarz-Herzke, 2010b, a]. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten bestätigen die Hypothese, dass STAT 2 eine Rolle bei der Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV und somit Synthese von CD 15 spielt.

Mit dieser Studie konnte nicht nur die Bedeutung der untersuchten Enzyme innerhalb der Embryogenese bestätigt sondern auch Vermutungen auf andere Funktionen der α (1,3) Fucosyltransferase IX und IV samt dem Glykokonjugat CD 15 im Alterungsprozess getätigt werden. Durch die untersuchten Altersstufen P0, P42 und P365 konnte eine Evaluation der erhöhten Expression in der Altersstufe P365 bezüglich ihrer Rolle im Alterungsprozess stattfinden (siehe auch Kapitel 5.5). Manche Studien sprechen vom sog. „inflamm –aging“, welches in Anbetracht der in dieser Arbeit ermittelten Daten untermauert wird [Cevenini et al., 2010; Franceschi et al., 2000]. Die zunehmende Genexpression in der Altersstufe P365 der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX spricht für eine erhöhte Synthese von CD15, welches durch die erhöhten Proteinmengen per Western Blot bestätigt wurde. Dies könnte im Alter zu einer erhöhten Anzahl adhärerender Leukozyten, welche inflammatorischen Prozesse induzieren, führen.

Aber auch andere degenerative Prozesse wie Apoptose [Azuma et al., 2007] und auch die Rolle des CD 15 innerhalb Metastasegeschehen [Kannagi, 1997] könnten durch eine gesteigerte Expressionsrate der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX begünstigt werden. Nicht nur Leukozyten adhäreren vermehrt an den Zellwänden, auch Tumorzellen können an exprimierten CD 15 Epitopen anlagern und Metastasen bilden.

Die vielschichtige Rolle von CD 15 konnte somit innerhalb dieser Arbeit weiter gefestigt werden. CD 15 ist nicht nur bedeutsam für die Embryogenese sondern hält weitere Funktionen in der Maturation, Neurogenese, Inflammation, Apoptose und anderen degenerativen Prozessen inne. Ob die gesteigerte Expression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX samt dem Lewis CD 15 im Alter allein für degenerative Prozesse verantwortlich sind bleibt fraglich. Vielmehr ist es ein multifaktorielles Geschehen, das durch die veränderte Genexpression positiv verstärkt wird.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bisherige Untersuchungen die Genexpression der α (1,3) Fucosyltransferasen IV und IX nur im Hirn *in toto* untersucht haben [Kudo et al., 1998a]. Die Vermutung lag nahe, dass die Genexpression innerhalb der Hirnareale jedoch variiert. In dieser Studie konnten variabel verteilte Genexpressionsraten festgestellt werden. Durch die festgestellte, im Alter zunehmende Synthese von CD 15 wird die Bedeutung und direkte Korrelation zwischen α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV und CD 15 deutlich und durch diese Arbeit bestätigt. Neben der Bedeutung von CD 15 in der Embryogenese, Neurogenese und Metastasierung, hat es Funktionen innerhalb Inflammationsgeschehen. Die Ergebnisse unterstützen das von Forschern bereits vermutete „Inflamm-aging“ [Cevenini et al., 2010; Franceschi et al., 2000].

Die Bedeutung der STAT 2 und der fast kongruente Entwicklungsverlauf von CD 15 zu den untersuchten Zeitpunkten lassen Vermutungen zu, dass STAT 2 innerhalb der Genexpression von den α (1,3) Fucosyltransferasen IX und IV als Signaltransduktor auch von Bedeutung ist. Dies sind jedoch zum heutigen Stand nur spekulative Vermutungen, welche weiterführende Untersuchungen benötigen.

6. Literaturverzeichnis

- Aaronson DS, Horvath CM: A road map for those who don't know jak-stat. *NY SCI J* **2002**;296:1653–1655.
- Allahverdian S, Wojcik KR, Dorscheid DR: Airway epithelial wound repair: Role of carbohydrate sialyl lewisx. *AJP LUNG* **2006**;291:L828-836.
- Andersen BB, Gundersen HJ, Pakkenberg B: Aging of the human cerebellum: A stereological study. *J COMP NEUROL* **2003**;466:356-365.
- Ashwell KW, Mai JK: Developmental expression of the cd15-epitope in the brainstem and spinal cord of the mouse. *EJAE* **1997a**;196:13–25.
- Ashwell KW, Mai JK: A transient cd15 immunoreactive sling in the developing mouse cerebellum. *INT J DEV NEUROSCI* **1997b**;15:883–889.
- Ashwell KW, Mai JK: Developmental expression of the cd15 epitope in the hippocampus of the mouse. *CELL TISSUE RES* **1997c**;289:17–23.
- Azuma Y, Kurusu Y, Sato H, Higai K, Matsumoto K: Increased expression of lewis x and y antigens on the cell surface and fut 4 mrna during granzyme b-induced jurkat cell apoptosis. *BIOL PHARM BULL* **2007**;30:655–660.
- Baboval T, Henion T, Kinnally E, Smith FI: Molecular cloning of rat alpha1,3-fucosyltransferase ix (fuc-tix) and comparison of the expression of fuc-tiv and fuc-tix genes during rat postnatal cerebellum development. *J NEUROSCI RES* **2000**;62:206–215.
- Baboval T, Smith FI: Comparison of human and mouse fuc-tx and fuc-txi genes, and expression studies in the mouse. *JME* **2002**;13:538–541.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ: Gapdh as a housekeeping gene: Analysis of gapdh mrna expression in a panel of 72 human tissues. *PHYSIOL GENOMICS* **2005**;21:389–395.
- Bartsch D, Mai JK: Distribution of the 3-fucosyl-n-acetyl-lactosamine (fal) epitope in the adult mouse brain. *CELL TISSUE RES* **1991**;263:353-366.
- Becker DJ, Lowe JB: Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *GLYCOBIOLOGY* **2003**;13:41R-53R.
- Bird JM, Kimber SJ: Oligosaccharides containing fucose linked alpha(1-3) and alpha(1-4) to n-acetylglucosamine cause decompaction of mouse morulae. *DB* **1984**;104:449–460.
- Buffone A, Mondal N, Gupta R, McHugh KP, Lau JTY, Neelamegham S: Silencing α 1,3-fucosyltransferases in human leukocytes reveals a role for fut9 enzyme during e-selectin-mediated cell adhesion. *J BIOL CHEM* **2013**;288:1620–1633.
- Cailleau-Thomas A, Coullin P, Candelier JJ, Balanzino L, Mennesson B, Oriol R, Mollicone R: Fut4 and fut9 genes are expressed early in human embryogenesis. *GLYCOBIOLOGY* **2000**;10:789–802.
- Cevenini E, Caruso C, Candore G, Capri M, Nuzzo D, Duro G, Rizzo C, Colonna-Romano G, Lio D, Di Carlo D, Palmas MG, Scurti M, Pini E, Franceschi C, Vasto S: Age-related inflammation: The contribution of different organs, tissues and systems. How to face it for therapeutic approaches. *CURR PHARM DES* **2010**;16:609–618.
- Clarke JL, Watkins W: Alpha1,3-l-fucosyltransferase expression in developing human myeloid cells. Antigenic, enzymatic, and mrna analyses. *J BIOL CHEM* **1996**;271:10317–10328.
- Coullin P, Mollicone R, Grisard MC, Gibaud A, Ravise N, Feingold J, Oriol R: Chromosome 11q localization of one of the three expected genes for the human alpha-3-fucosyltransferases, by somatic hybridization. *CYTOGENET CELL GENET* **1991**;56:108-111.
- Dupuy F, Petit JM, Mollicone R, Oriol R, Julien R, Maftah A: A single amino acid in the hypervariable stem domain of vertebrate alpha1,3/1,4-fucosyltransferases determines the type 1/type 2 transfer. Characterization of acceptor substrate specificity of the lewis enzyme by site-directed mutagenesis. *J BIOL CHEM* **1999**;274:12257–12262.

- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE: Targeted disruption of the mouse stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *CELL* **1996**;84:443–450.
- Eggens I, Fenderson B, Toyokuni T, Dean B, Stroud M, Hakomori S: Specific interaction between lex and lex determinants. A possible basis for cell recognition in preimplantation embryos and in embryonal carcinoma cells. *J BIOL CHEM* **1989**;264:9476–9484.
- Elbaggari AM, K., Albuero, A., Martin, C., : Imaging of chemiluminescent western blots: Comparison of digital imaging and x-ray film. *BIO-RAD TECH* **2008**;Note 5809.
- Feizi T: Carbohydrate differentiation antigens: Probable ligands for cell adhesion molecules. *TRENDS BIOCHEM SCI* **1991**;16:84-86.
- Fenderson BA, O'Brien DA, Millette CF, Eddy EM: Stage-specific expression of three cell surface carbohydrate antigens during murine spermatogenesis detected with monoclonal antibodies. *DB* **1984**;103:117–128.
- Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V: Human skin endothelial cells can express all 10 tlr genes and respond to respective ligands. *CVI* **2008**;15:138–146.
- Forutan F, Mai JK, Ashwell KW, Lensing-Höhn S, Nohr D, Voss T, Bohl J, Andressen C: Organisation and maturation of the human thalamus as revealed by cd15. *J COMP NEUROL* **2001**;437:476–495.
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G: Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY ACAD SCI* **2000**;908:244-254.
- Gadhoom SZ, Sackstein R: Cd15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *NAT CHEM BIOL* **2008**;4:751-757.
- Gersten KM, Natsuka S, Trinchera M, Petryniak B, Kelly RJ, Hiraiwa N, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Lowe JB: Molecular cloning, expression, chromosomal assignment, and tissue-specific expression of a murine alpha-(1,3)-fucosyltransferase locus corresponding to the human elam-1 ligand fucosyl transferase. *J BIOL CHEM* **1995**;270:25047–25056.
- Gocht A, Struckhoff G, Löhler J: The carbohydrate epitope 3-fucosyl-n-acetyllactosamine is region-specifically expressed in astrocytes of the rat brain. Light- and electron-microscopical observations. *ACTA ANAT* **1994**;150:205–216.
- Goelz SE, Hession C, Goff D, Griffiths B, Tizard R, Newman B, Chi-Rosso G, Lobb R: Elft: A gene that directs the expression of an elam-1 ligand. *CELL* **1990**;63:1349–1356.
- Gotz M, Wizenmann A, Reinhardt S, Lumsden A, Price J: Selective adhesion of cells from different telencephalic regions. *NEURON* **1996**;16:551–564.
- Gouveia R, Schaffer L, Papp S, Grammel N, Kandzia S, Head SR, Kleene R, Schachner M, Conradt HS, Costa J: Expression of glycogenes in differentiating human nt2n neurons. Downregulation of fucosyltransferase 9 leads to decreased lewis(x) levels and impaired neurite outgrowth. *BBA* **2012**;1820:2007–2019.
- Hakomori SI, Siddiqui B: Isolation and characterization of glycosphingolipid from animal cells and their membranes. *METHODS ENZYMOL* **1974**;32:345-367.
- Haus-Wegrzyniak B, Vannucchi MG, Wenk GL: Behavioral and ultrastructural changes induced by chronic neuroinflammation in young rats. *BRAIN RES* **2000**;859:157–166.
- Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE: Contribution of stat sh2 groups to specific interferon signaling by the jak-stat pathway. *NY SCI J* **1995**;267:1347–1349.
- Helenius A, Aebi M: Roles of n-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *ANNU REV BIOCHEM* **2004**;73:1019–1049.
- Hession C, Osborn L, Goff D, Chi-Rosso G, Vassallo C, Pasek M, Pittack C, Tizard R, Goelz S, McCarthy K: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: Direct expression cloning and functional interactions. *PNAS* **1990**;87:1673–1677.

- Huang M-C, Laskowska A, Vestweber D, Wild MK: The alpha (1,3)-fucosyltransferase fuc-tiv, but not fuc-tvii, generates sialyl lewis x-like epitopes preferentially on glycolipids. *J BIOL CHEM* **2002**;277:47786–47795.
- Ishii A, Ikeda T, Hitoshi S, Fujimoto I, Torii T, Sakuma K, Nakakita S-i, Hase S, Ikenaka K: Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of n-glycans in the mouse cerebral cortex. *GLYCOBIOLOGY* **2007**;17:261–276.
- Jaeken J, Matthijs G: Congenital disorders of glycosylation: A rapidly expanding disease family. *ANNU REV GENOM HUM G* **2007**;8:261–278.
- Kaila N, Thomas BE: Design and synthesis of sialyl lewis(x) mimics as e- and p-selectin inhibitors. *MED RES REV* **2002**;22:566–601.
- Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Ikehara Y, Nishihara S, Nakagawa S, Sasaki K, Shiina T, Inoko H, Saitou N, Narimatsu H: Alpha1,3-fucosyltransferase ix (fuc-tix) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human fuc-tix. *FEBS* **1999**;452:237–242.
- Kannagi R: Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *GLYCOCONJ J* **1997**;14:577–584.
- Kannagi R: Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl lewis x and sialyl lewis a expression-the warburg effect revisited. *GLYCOCONJ J* **2004**;20:353–364.
- Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N: Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *CANCER SCI* **2004**;95:377–384.
- Kannagi R, Levine P, Watanabe K, Hakomori S: Recent studies of glycolipid and glycoprotein profiles and characterization of the major glycolipid antigen in gastric cancer of a patient of blood group genotype pp (tja-) first studied in 1951. *CANCER RES* **1982**;42:5249-5254.
- Kennard JA, Brown KL, Woodruff-Pak DS: Aging in the cerebellum and hippocampus and associated behaviors over the adult life span of cb6f1 mice. *NEUROSCI* **2013**;247:335-350.
- Kerr MA, Stocks SC: The role of cd15-(le(x))-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *HISTOCHEM J* **1992**;24:811-826.
- Khatib AM, Kontogianna M, Fallavollita L, Jamison B, Meterissian S, Brodt P: Rapid induction of cytokine and e-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *CANCER RES* **1999**;59:1356–1361.
- Kłopotcki AG, Laskowska A, Antoniewicz-Papis J, Duk M, Lisowska E, Ugorski M: Role of sialosyl lewis(a) in adhesion of colon cancer cells--the antisense rna approach. *FEBS* **1998**;253:309–318.
- Knowles BB, Aden DP, Solter D: Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (ssea-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells. *CURR TOP MICROBIOL IMMUNOL* **1978**;81:51–53.
- Kobayashi MA, Watada H, Kawamori R, Maeda S: Overexpression of acetyl-coenzyme a carboxylase beta increases proinflammatory cytokines in cultured human renal proximal tubular epithelial cells. *CLIN EXP NEPHROL* **2010**;14:315-324.
- Kobzdej MMA, Leppänen A, Ramachandran V, Cummings RD, McEver RP: Discordant expression of selectin ligands and sialyl lewis x-related epitopes on murine myeloid cells. *BLOOD* **2002**;100:4485–4494.
- Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ: Angiogenesis mediated by soluble forms of e-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *NAT* **1995**;376:517–519.
- Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H: Inflammatory mediators in the elderly. *EXP GERONT* **2004**;39:687–699.
- Kudo T, Fujii T, Ikegami S, Inokuchi K, Takayama Y, Ikehara Y, Nishihara S, Togayachi A, Takahashi S, Tachibana K, Yuasa S, Narimatsu H: Mice lacking alpha1,3-fucosyltransferase ix demonstrate disappearance of lewis x structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *GLYCOBIOLOGY* **2007**;17:1–9.

- Kudo T, Ikehara Y, Togayachi A, Kaneko M, Hiraga T, Sasaki K, Narimatsu H: Expression cloning and characterization of a novel murine alpha1, 3-fucosyltransferase, mfuc-tix, that synthesizes the lewis x (cd15) epitope in brain and kidney. *J BIOL CHEM* **1998a**;273:26729–26738.
- Kudo T, Ikehara Y, Togayachi A, Morozumi K, Watanabe M, Nakamura M, Nishihara S, Narimatsu H: Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. *LAB INVEST* **1998b**;78:797–811.
- Kudo T, Kaneko M, Iwasaki H, Togayachi A, Nishihara S, Abe K, Narimatsu H: Normal embryonic and germ cell development in mice lacking alpha 1,3-fucosyltransferase ix (fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. *MOL CELL BIOL* **2004**;24:4221–4228.
- Kukowska-Latallo JF, Larsen RD, Nair RP, Lowe JB: A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase. *GENES DEV* **1990**;4:1288–1303.
- Kumar R, Potvin B, Muller WA, Stanley P: Cloning of a human alpha(1,3)-fucosyltransferase gene that encodes elft but does not confer elam-1 recognition on chinese hamster ovary cell transfectants. *J BIOL CHEM* **1991**;266:21777–21783.
- Kurien BT, Scofield RH: Western blotting. *METHODS* **2006**;38:283–293.
- La Fuente H, Mittelbrunn M, Sánchez-Martín L, Vicente-Manzanares M, Lamana A, Pardi R, Cabañas C, Sánchez-Madrid F: Synaptic clusters of mhc class ii molecules induced on dcs by adhesion molecule-mediated initial t-cell scanning. *MOL BIOL CELL* **2005**;16:3314–3322.
- Landfield PW, Thibault O, Mazzanti ML, Porter NM, Kerr DS: Mechanisms of neuronal death in brain aging and alzheimer's disease: Role of endocrine-mediated calcium dyshomeostasis. *J NEUROBIOL* **1992**;23:1247–1260.
- Lau JF, Parisien JP, Horvath CM: Interferon regulatory factor subcellular localization is determined by a bipartite nuclear localization signal in the DNA-binding domain and interaction with cytoplasmic retention factors. *PNAS* **2000**;97:7278–7283.
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA: Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *NAT GEN* **2000**;25:294–297.
- Leonard WJ, O'Shea JJ: Jaks and stats: Biological implications. *ANNU REV IMMUNOL* **1998**;16:293–322.
- Levy DE, Darnell JE: Stats: Transcriptional control and biological impact. *NAT REV MOL CELL BIOL* **2002**;3:651–662.
- Liu N-K, Xu X-M: Beta-tubulin is a more suitable internal control than beta-actin in western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury. *J NEUROTRAUMA* **2006**;23:1794–1801.
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *METHODS* **2001**;25:402-408.
- Lowe JB: Selectin ligands, leukocyte trafficking, and fucosyltransferase genes. *KIDNEY INT* **1997**;51:1418–1426.
- Lowe JB: Glycosyltransferases and glycan structures contributing to the adhesive activities of l-, e- and p-selectin counter-receptors. *BIOCHEM SOC SYMP* **2002**:33–45.
- Lowe JB, Kukowska-Latallo JF, Nair RP, Larsen RD, Marks RM, Macher BA, Kelly RJ, Ernst LK: Molecular cloning of a human fucosyltransferase gene that determines expression of the lewis x and vim-2 epitopes but not elam-1-dependent cell adhesion. *J BIOL CHEM* **1991**;266:17467–17477.
- Lu T, Pan Y, Kao S-Y, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA: Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *NATURE* **2004**;429:883–891.
- Magnani JL, Ball ED, Fanger MW, Hakomori SI, Ginsburg V: Monoclonal antibodies pmn 6, pmn 29, and pm-81 bind differently to glycolipids containing a sugar sequence occurring in lacto-n-fucopentaose iii. *ARCH BIOCHEM BIOPHYS* **1984**;233:501-506.

- Mai JK: CD15. *ENCYCLOPEDIA of MOLECULAR MEDICINE* **2002**;2:555-558.
- Mai JK, Bartsch D, Marani E: Cd15 and hkn-1 reveal cerebellar compartments with a complex overlap. *EUR J MORPHOL* **1995**;33:101-107.
- Mai JK, Reifenberger G: Distribution of the carbohydrate epitope 3-fucosyl-n-acetyl-lactosamine (fal) in the adult human brain. *J CHEM NEUROANAT* **1988**;1:255-285.
- Mai JK, Schonlau C: Age-related expression patterns of the cd15 epitope in the human lateral geniculate nucleus (lgn). *HISTOCHEM J* **1992**;24:878-889.
- Marani E, Mai JK: Expression of the carbohydrate epitope 3-fucosyl-n-acetyl-lactosamine (cd15) in the vertebrate cerebellar cortex. *HISTOCHEM J* **1992**;24:852-868.
- Marcus RC, Shimamura K, Sretavan D, Lai E, Rubenstein JL, Mason CA: Domains of regulatory gene expression and the developing optic chiasm: Correspondence with retinal axon paths and candidate signaling cells. *J COMP NEUROL* **1999**;403:346-358.
- Martinez M, Joffraud M, Giraud S, Baisse B, Bernimoulin MP, Schapira M, Spertini O: Regulation of psgl-1 interactions with l-selectin, p-selectin, and e-selectin: Role of human fucosyltransferase-iv and -vii. *J BIOL CHEM* **2005**;280:5378-5390.
- Matoba R, Saito S, Ueno N, Maruyama C, Matsubara K, Kato K: Gene expression profiling of mouse postnatal cerebellar development. *PHYSIOL GENOMICS* **2000**;4:155-164.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD: Targeted disruption of the stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the jak-stat signaling pathway. *CELL* **1996**;84:431-442.
- Mollicone R, Bara J, Le Pendu J, Oriol R: Immunohistologic pattern of type 1 (lea, leb) and type 2 (x, y, h) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae. *LAB INVEST* **1985**;53:219-227.
- Montreuil J: Primary structure of glycoprotein glycans: Basis for the molecular biology of glycoproteins. *ADV CARBOHYDRO CHEM BIOCHEM* **1980**;37:157-223.
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV: Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. *NAT REV MOL CELL BIOL* **2012**;13:448-462.
- Morres SA, Mai JK, Teckhaus L: Expression of the cd15 epitope in the human magnocellular basal forebrain system. *HISTOCHEM J* **1992**;24:902-909.
- Morrison JH, Hof PR: Life and death of neurons in the aging brain. *SCIENCE* **1997**;278:412-419.
- Munro JM, Lo SK, Corless C, Robertson MJ, Lee NC, Barnhill RL, Weinberg DS, Bevilacqua MP: Expression of sialyl-lewis x, an e-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *AM J PATHOL* **1992**;141:1397-1408.
- Murray AM, Simm B, Beagley KW: Cytokine gene expression in murine fetal intestine: Potential for extrathymic t cell development. *CYTOKINE* **1998**;10:337-345.
- Nadeau OW, Domanski P, Usacheva A, Uddin S, Platanias LC, Pitha P, Raz R, Levy D, Majchrzak B, Fish E, Colamonici OR: The proximal tyrosines of the cytoplasmic domain of the beta chain of the type i interferon receptor are essential for signal transducer and activator of transcription (stat) 2 activation. Evidence that two stat2 sites are required to reach a threshold of interferon alpha-induced stat2 tyrosine phosphorylation that allows normal formation of interferon-stimulated gene factor 3. *J BIOL CHEM* **1999**;274:4045-4052.
- Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, Izumi Y, Irimura T: Involvement of carbohydrate antigen sialyl lewis(x) in colorectal cancer metastasis. *DIS COLON RECTUM* **1997**;40:420-431.
- Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, Kudo T, Okubo R, Kaneko M, Nakamura M, Karube M, Sasaki K, Narimatsu H: Cd15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase ix, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase iv. *J BIOL CHEM* **2001**;276:16100-16106.
- Narimatsu H: A3-fucosyltransferase-ix (fut9) *HANDBOOK OF GLYCOSYLTRANSFERASES AND RELATED GENES* **2002**:pp 252-258.

- Natsuka S, Gersten KM, Zenita K, Kannagi R, Lowe JB: Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leukocyte alpha-1,3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl lewis x determinant. *J BIOL CHEM* **1994**;269:16789–16794.
- Nguyen M, Strubel NA, Bischoff J: A role for sialyl lewis-x/a glycoconjugates in capillary morphogenesis. *NATURE* **1993**;365:267–269.
- Nishihara S, Iwasaki H, Nakajima K, Togayachi A, Ikehara Y, Kudo T, Kushi Y, Furuya A, Shitara K, Narimatsu H: Alpha1,3-fucosyltransferase ix (fut9) determines lewis x expression in brain. *GLYCOBIOLOGY* **2003**;13:445–455.
- Noro E, Togayachi A, Sato T, Tomioka A, Fujita M, Sukegawa M, Suzuki N, Kaji H, Narimatsu H: Large-scale identification of n-glycan glycoproteins carrying lewis x and site-specific n-glycan alterations in fut9 knockout mice. *J PROTEOME RES* **2015**;14:3823–3834.
- Oriol R, Mollicone R, Cailleau A, Balanzino L, Breton C: Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. *GLYCOBIOLOGY* **1999**;9:323–334.
- Oudega M, Marani E, Thomeer RT: Transient expression of stage-specific embryonic antigen-1 (cd15) in the developing dorsal rat spinal cord. *HISTOCHEM J* **1992**;24:869–877.
- Ozawa M, Muramatsu T: Molecular cloning and expression of a mouse alpha-1,3 fucosyltransferase gene that shows homology with the human alpha-1,3 fucosyltransferase iv gene. *J BIOCHEM* **1996**;119:302–308.
- Park ES, Kim H, Suh JM, Park SJ, You SH, Chung HK, Lee KW, Kwon OY, Cho BY, Kim YK, Ro HK, Chung J, Shong M: Involvement of jak/stat (janus kinase/signal transducer and activator of transcription) in the thyrotropin signaling pathway. *MOL ENDOCRINOL* **2000a**;14:662–670.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ: Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by hpv e7 oncoprotein. Implication for the e7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J BIOL CHEM* **2000b**;275:6764–6769.
- Paulson JC, Colley KJ: Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J BIOL CHEM* **1989**;264:17615–17618.
- Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *NUCLEIC ACIDS RES* **2001**;29:e45.
- Raz N, Rodrigue KM: Differential aging of the brain: Patterns, cognitive correlates and modifiers. *NEUROSCI BIOBEHAV REV* **2006**;30:730–748.
- Reguigne I, James MR, Richard CW, Mollicone R, Seawright A, Lowe JB, Oriol R, Couillin P: The gene encoding myeloid alpha-3-fucosyl-transferase (fut4) is located between d1 1s388 and d11s919 on 11q21. *CYTOGENET CELL GENET* **1994**;66:104–106.
- Reifenberger G, Sieth P, Niederhaus M, Wechsler W: Expression of cd15 in tumours of the nervous system. *HISTOCHEM J* **1992**;24:890–901.
- Reifenberger G, Szymas J, Wechsler W: Differential expression of glial- and neuronal-associated antigens in human tumors of the central and peripheral nervous system. *ACTA NEUROPATHOL* **1987**;74:105–123.
- Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Civin WH, Emmerling M, Shivers B, Walker D, McGeer P: Inflammation and alzheimer's disease pathogenesis. *NEUROBIOL AGING* **1996**;17:681–686.
- Rosen SD: Endothelial ligands for I-selectin: From lymphocyte recirculation to allograft rejection. *AM J PATHOL* **1999**;155:1013–1020.
- Rosen SD, Bertozzi CR: Two selectins converge on sulphate. Leukocyte adhesion. *CURR BIOL* **1996**;6:261–264.
- Rutten BP, Schmitz C, Gerlach OH, Oyen HM, de Mesquita EB, Steinbusch HW, Korr H: The aging brain: Accumulation of DNA damage or neuron loss? *NEUROBIOL AGING* **2007**;28:91–98.

- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics C: Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *NATURE* **2014**;511:421-427.
- Schmittgen TD, Livak KJ: Analyzing real-time pcr data by the comparative c(t) method. *NAT PROTOC* **2008**;3:1101-1108.
- Schwarz-Herzke B, Kremer, A., Mai, J. K.: Overexpression of the fucosyltransferases 4 and 9 leads to activation of stat 1 and stat 2 in primary astrocytes. *SOC NEUROSCIE* **2010a**.
- Schwarz-Herzke B, Kremer, A., Mai, J. K.: Investigation of the function of cd15 and the alpha 1.3 fucosyltransferase 9 in the murine brain. *FED EUR NEUROSCI SOC* **2010b**;vol.5:011.058.
- Shimoda Y, Tajima Y, Osanai T, Katsume A, Kohara M, Kudo T, Narimatsu H, Takashima N, Ishii Y, Nakamura S, Osumi N, Sanai Y: Pax6 controls the expression of lewis x epitope in the embryonic forebrain by regulating alpha 1,3-fucosyltransferase ix expression. *J BIOL CHEM* **2002**;277:2033–2039.
- Solter D, Knowles BB: Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (ssea-1). *PNAS* **1978**;75:5565–5569.
- Stichel CC, Luebbert H: Inflammatory processes in the aging mouse brain: Participation of dendritic cells and t-cells. *NEUROBIOL AGING* **2007**;28:1507–1521.
- Taniguchi A, Suga R, Matsumoto K: Expression and transcriptional regulation of the human alpha1, 3-fucosyltransferase 4 (fut4) gene in myeloid and colon adenocarcinoma cell lines. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN* **2000**;273:370–376.
- Tanzi RE, Bertram L: New frontiers in alzheimer's disease genetics. *Neuron* 2001;32:181–184.
- Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M: A defined methodology for reliable quantification of western blot data. *MOL BIOTECHNOL* **2013**;55:217–226.
- Terao A, Apte-Deshpande A, Dousman L, Morairty S, Eynon BP, Kilduff TS, Freund YR: Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *J NEUROIMMUNOL* **2002**;132:99–112.
- Tetteroo PA, de Heij HT, Van den Eijnden DH, Visser FJ, Schoenmarker E, Geurts van Kessel AH: A gdp-fucose:[gal beta 1----4]glcnac alpha 1----3-fucosyltransferase activity is correlated with the presence of human chromosome 11 and the expression of the lex, ley, and sialyl-lex antigens in human-mouse cell hybrids. *J BIOL CHEM* **1987**;262:15984-15989.
- Urdal DL, Brentnall TA, Bernstein ID, Hakomori SI: A granulocyte reactive monoclonal antibody, 1g10, identifies the gal beta 1-4 (fuc alpha 1-3)glcnac (x determinant) expressed in hl-60 cells on both glycolipid and glycoprotein molecules. *BLOOD* **1983**;62:1022-1026.
- Vestweber D: Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: More than just selectins, chemokines and integrins. *EUR J IMMUNOL* **2003**;33:1361–1364.
- Vestweber D: Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation through endothelial cell contacts. *ERNST SCHERING FOUND SYMP PROC* **2007a**:151–167.
- Vestweber D: Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *IMMUNOL REV* **2007b**;218:178–196.
- Vestweber D, Blanks JE: Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *PHYSIOL REV* **1999**;79:181–213.
- Vries T, Knegtel RM, Holmes EH, Macher BA: Fucosyltransferases: Structure/function studies. *GLYCOBIOLOGY* **2001**;11:119R-128R.
- Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, Souchkova N, Quackenbush EJ, Lowe JB, Andrian UH: Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-iv and fuct-vii during leukocyte rolling in dermal microvessels. *IMMUNITY* **2000**;12:665–676.
- Weston BW, Nair RP, Larsen RD, Lowe JB: Isolation of a novel human alpha (1,3)fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human lewis blood group alpha (1,3/1,4)fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities. *J BIOL CHEM* **1992a**;267:4152–4160.

- Weston BW, Smith PL, Kelly RJ, Lowe JB: Molecular cloning of a fourth member of a human alpha (1,3)fucosyltransferase gene family. Multiple homologous sequences that determine expression of the lewis x, sialyl lewis x, and difucosyl sialyl lewis x epitopes. *J BIOL CHEM* **1992b**;267:24575–24584.
- Williams, RW: Mouse Brain Gross Anatomy Atlas. Neurogenetics at UT Health Science Center unter http://www.mbl.org/anatomy_images/fixed/mba_3.html(abgerufen am 25.08.2010)
- Withers DA, Hakomori SI: Human alpha (1,3)-fucosyltransferase iv (futiv) gene expression is regulated by elk-1 in the u937 cell line. *J BIOL CHEM* **2000**;275:40588–40593.
- Wyss-Coray T, Mucke L: Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *NEURON* **2002**;35:419–432.
- Xu Z, Vo L, Macher BA: Structure-function analysis of human alpha1,3-fucosyltransferase. Amino acids involved in acceptor substrate specificity. *J BIOL CHEM* **1996**;271:8818–8823.
- Yagi H, Saito T, Yanagisawa M, Yu RK, Kato K: Lewis x-carrying n-glycans regulate the proliferation of mouse embryonic neural stem cells via the notch signaling pathway. *J BIOL CHEM* **2012**;287:24356–24364.
- Yang X-S, Liu S-A, Liu J-W, Yan Q: Fucosyltransferase iv enhances expression of mmp-12 stimulated by egf via the erk1/2, p38 and nf-kb pathways in a431 cells. *ASIAN PAC J CANCER PREV* **2012**;13:1657–1662.
- Zacharowski K: Neue Überlegungen zu Entzündung und Gerinnung. *DER ANÄSTHESIST* **2007**;56:482–484.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Konrad Mai für das Überlassen der Thematik. Ohne Seine tatkräftige Unterstützung wäre die Durchführung der Aufgabenstellung nicht möglich gewesen. Jederzeit konnten Fragen gestellt und anregende Diskussionen geführt werden.

Einen ganz herzlichen Dank auch an Frau Dr. Beryl Schwarz-Herzke. Ohne Ihre stetige Betreuung wäre diese Dissertationsschrift nicht zustande gekommen. Sie war vor allem in der experimentellen Phase der Arbeit immer zur Stelle und half maßgeblich bei der Ressourcenbeschaffung. Für die Korrektur der Arbeit und Ihre fast endlos erscheinende Geduld möchte ich mich nochmals ganz herzlich bedanken. In diesem Kontext möchte ich ebenfalls Frau Prof. Dr. Charlotte von Gall ganz besonders danken. Die finalen Western Blots hätten ohne Ihr Einverständnis und die Bereitstellung Ihres Labors nie verwirklicht werden können.

Ferner möchte ich mich bei Frau Ursula Lammersen bedanken. Jederzeit waren Ihre helfenden Hände im Labor bereit und unterstützten mich mit großer Sorgfalt. Vielen lieben Dank für Ihre Mühen und Geduld.

Zum Schluss gilt mein Dank meiner Familie, die mich jederzeit bei meiner Arbeit bestärkt und ermutigt hat. Sei es Rechtschreibprüfung, Unterstützung oder Nachfrage, Sie war jederzeit für mich da.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne
unzulässige fremde
Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer
anderen
medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

12.06.16, Julia Domin

Unterschrift

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized representation of the name 'Julia Domin'.