

# **Charakterisierung Tumor-assoziiertes Glykosphingolipide von Karzinomen des Gastrointestinaltraktes**

Von der Technischen Fakultät der  
Universität Bielefeld  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

zugelassene  
**Dissertation**

von  
**Dipl.-Biotech. Jamal Souady**  
aus Siegburg

**2009**



**Gutachter:**

1. Prof. Dr. J. Müthing
2. Prof. Dr. T. Noll
3. Prof. em. Dr. J. Peter-Katalinić
4. Prof. Dr. U. Zähringer

## **Vorbemerkung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2006 bis Dezember 2009 in der Arbeitsgruppe Biomedizinische Analytik des Instituts für Medizinische Physik und Biophysik (IMPB) der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (WWU) (Leitung Frau Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinić) unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić und Herrn Prof. Dr. J. Müthing (Institut für Hygiene, WWU) angefertigt. Die Finanzierung erfolgte mit Mitteln der Deutschen Krebshilfe (DKH 106742, J.M.) und der EU (GLYFDIS-Projekt LSHB-CT-2006-037661, J.P.-K.).

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić (IMPB der WWU Münster) danke ich für die umfangreiche Betreuung, hilfreiche Unterstützung und besonders für die Möglichkeit, Ergebnisse dieser Arbeit auf internationalen Tagungen präsentieren zu können.

Herrn Prof. Dr. J. Müthing (Institut für Hygiene der WWU Münster) gilt mein Dank für die intensive Betreuung, die vielfältige Unterstützung sowie fachliche Beratung. Auch für die Bereitstellung der zur Durchführung der Glykosphingolipid-Analytik benötigten Arbeitsmaterialien möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Dr. T. Noll (Zellkulturtechnik, Technische Fakultät der Universität Bielefeld) danke ich für seine Bereitschaft, sich als Zweitgutachter zur Verfügung zu stellen.

Herrn Prof. Dr. U. Zähringer (Laborgruppe Immunchemie, Forschungszentrum Borstel) bin ich für die Anfertigung eines Gutachtens verbunden.

Dr. L. Bindila (IMPB der WWU Münster) bin ich für die Betreuung innerhalb des GLYFDIS-Projektes und wertvolle Gespräche sehr verbunden.

Herrn Prof. Dr. med. N. Senninger (Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster), Herrn Prof Dr. med. J. Haier (Zentrum für Onkologie des Universitätsklinikums Münster), Herrn PD Dr. C. Pilarsky, PD Dr. med. R. Grützmann und Dr. med. A. Denz (Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden) danke ich für die

Bereitstellung von Proben aus hepatozellulären Karzinomen und entsprechenden Vergleichsgeweben.

Herrn PD Dr. K. Dreisewerd und Herrn Dipl.-Phys. J. Soltwisch (IMPB der WWU Münster) danke ich für die Einführung in die IR-MALDI-o-TOF-MS und fruchtbare, wissenschaftliche Diskussionen.

Den Herren Dr. M. Mormann und PD Dr. G. Pohlentz (IMPB der WWU Münster) bin ich für gute Ratschläge und die Einführung in die Tiefen der Massenspektrometrie sehr verbunden.

Herrn Dipl.-Biotech. S. Kirsch (IMPB der WWU Münster) bin ich für umfangreiches Korrekturlesen, gute Zusammenarbeit und wissenschaftliche Diskussionen dankbar. Weiterhin bin ich ihm für die Erarbeitung des Protokolls für den Phospholipase-Verdau und die Unterstützung bei der Aufarbeitung von Serumglykosphingolipiden verbunden.

Herrn Dipl.-Biotech. M. Hülsewig (Institut für Hygiene der WWU Münster) danke ich für die Unterstützung bei der Isolierung von GSL aus klinischen Gewebeproben.

Frau K. Tschapalda danke ich für Unterstützung bei der Durchführung der Expressionsanalyse von neutralen Glykosphingolipiden aus Lebergewebeproben.

Frau Dr. S. Liebrecht danke ich für gewissenhaftes Korrekturlesen und die gute, konstruktive Kritik bei der Anfertigung der Arbeit sowie für die moralische Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des IMPB und des Instituts für Hygiene, mit denen ich zusammen arbeiten durfte, danke ich für ein tolles Umfeld und eine lehrreiche Zeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, auf deren Unterstützung ich immer zählen kann.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt vorab publiziert beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht bzw. befinden sich in Vorbereitung zur Publikation:

**Publikationen:**

- **Souady J**, Kirsch S, Hülsewig M, Zarei M, Müthing J, Bindila L, Peter-Katalinić J. Profiling complex human serum gangliosides of pancreatic and gastric cancer patients by multiple TLC immunostaining. (manuscript ready for publication)
- **Souady J**, Hülsewig M, Distler U, Haier J, Denz A, Grützmann R, Pilarsky C, Senninger N, Dreisewerd K, Peter-Katalinić J, Müthing J. (2011) Differences in CD75s- and iso-CD75s-ganglioside content and altered mRNA expression of sialyltransferases ST6GAL1 and ST3GAL6 in human hepatocellular carcinomas and nontumoral liver tissues. *Glycobiology*, 21:584-594.
- Müsken A, **Souady J**, Dreisewerd K, Zhang W, Distler U, Peter-Katalinić J, Miller-Podraza H, Karch H, Müthing J. (2010) Application of TLC-IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry to structural analysis of bacteria-binding glycosphingolipids selected by affinity detection. *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* 24:1032-1038.
- **Souady J**, Dadimov D, Kirsch S, Bindila L, Peter-Katalinić J, Vakhrushev SY. (2010) Software utilities for the interpretation of mass spectrometric data of glycoconjugates: application to glycosphingolipids of human serum. *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* 24:1039-1048.
- **Souady J**, Soltwisch J, Dreisewerd K, Haier J, Peter-Katalinić J, Müthing J. (2009) Structural profiling of individual glycosphingolipids in a single thin-layer chromatogram by multiple sequential immunodetection matched with direct IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 81:9481-9492.
- Distler U, **Souady J**, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Friedrich AW, Karch H, Senninger N, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Schmidt MA, Peter-Katalinić J, Müthing J. (2009) Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. *PLoS One* 4:e6813.
- Soltwisch J, **Souady J**, Berkenkamp S, Dreisewerd K. (2009) Effect of gas pressure and gas type on the fragmentation of peptide and oligosaccharide ions generated in an elevated pressure UV/IR-MALDI ion source coupled to an orthogonal time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem.* 81(8):2921-2934.
- Distler U, **Souady J**, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Denz A, Grützmann R, Pilarsky C, Senninger N, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Schmidt MA, Peter-Katalinić J, Müthing J. (2008) Tumor-associated CD75s- and iso-CD75s-gangliosides are potential targets for adjuvant therapy in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.* 7(8):2464-2475.
- Distler U, Hülsewig M, **Souady J**, Dreisewerd K, Haier J, Senninger N, Friedrich AW, Karch H, Hillenkamp F, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. (2008) Matching IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry with the TLC overlay binding assay and its clinical application for tracing tumor-associated glycosphingolipids in hepatocellular and pancreatic cancer. *Anal Chem.* 80:1835-1846.
- Zarei M, Bindila L, **Souady J**, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Müthing J, Peter-Katalinić J. (2008) A sialylation study of mouse brain gangliosides by MALDI a-TOF and o-TOF mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 43:716-725.

## Internationale Tagungsbeiträge:

### Vorträge:

- **Souady J**, Hülsewig M, Distler U, Kirsch S, Bindila L, Peter-Katalinić J, and Müthing J. *Identification and characterization of tumor-associated glycosphingolipids in gastrointestinal cancers*. 20<sup>th</sup> Joint Glycobiology Meeting. 8.-10. Oktober 2009, Köln.

### Posterbeiträge:

- **Souady J**, Dadimov D, Kirsch S, Bindila L, Peter-Katalinić J, Vakhrushev SY. *Software platform for the evaluation of MS data from glycosphingolipids*. 3<sup>rd</sup> Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, 5.-11. Juli 2009, Dubrovnik, Kroatien.
- **Souady J**, Distler U, Hülsewig M, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. *Identification and characterization of tumor-associated gangliosides by HPTLC coupled to IR-MALDI-o-TOF MS*. 21<sup>st</sup> ASMS Sanibel Conference on Mass Spectrometry "Lipodomics and Lipid Mass Spectrometry", 23.-26. Januar 2009, St. Petersburg, FL, USA.
- **Souady J**, Soltwisch J, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. *Glycosphingolipid expression analysis by HPTLC multicolor immunostaining directly coupled with IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry*. 19<sup>th</sup> Joint Glycobiology Meeting, 30. November - 2. Dezember 2008, Wageningen, Niederlande.
- **Souady J**, Soltwisch J, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. *Combining HPTLC multicolor immunostaining and IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry for glycosphingolipid expression analysis*. International Symposium on Chromatography, 21.-25. September 2008, Münster.
- **Souady J**, Pohlentz G, Meisen I, Peter-Katalinić J, Müthing J. *High-performance thin-layer chromatography immunodetection coupled with nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for full structural characterization of influenza A virus binding isomeric neolacto-series gangliosides from human granulocytes*. International Symposium for Thin-Layer Chromatography, 9.-11. Oktober 2006, Berlin.

## Nationale Tagungsbeiträge:

### Vorträge:

- **Souady J**, Hülsewig M, Distler U, Kirsch S, Bindila L, Peter-Katalinić J, Müthing J. *TLC-IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry: identification of tumor-associated glycosphingolipids in gastrointestinal carcinoma*. INVERS workshop, 20.-21. Oktober 2009, Münster.

### Posterbeiträge:

- **Souady J**, Kirsch S, Hülsewig M, Müthing J, Bindila L, Peter-Katalinić J. *Expression analysis of human serum gangliosides by multiple HPTLC immunostaining and nanoESI-QTOF MS*. 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 8.-11. März 2009, Konstanz.
- **Souady J**, Soltwisch J, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. *Characterization of glycosphingolipid mixtures by multicolor immunodetection combined with IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry*. 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 2.-5. März 2008, Giessen.
- **Souady J**, Peter-Katalinić J, Müthing J. *Structural characterization of glycosphingolipids containing hydroxylated fatty acids by nanoESI-QTOF mass spectrometry*. 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 11.-14. März 2007, Bremen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	TUMORE DES GASTROINTESTINALTRAKTES .....	2
1.1.1	<i>Hepatozelluläres Karzinom</i> .....	3
1.1.2	<i>Magenkarzinom</i> .....	5
1.1.3	<i>Pankreaskarzinome</i> .....	6
1.2	GLYKOSPHINGOLIPIDE .....	9
1.2.1	<i>Struktur</i> .....	9
1.2.2	<i>Nomenklatur</i> .....	10
1.2.3	<i>Biosynthese</i> .....	12
1.2.4	<i>Organisation in funktionalen Einheiten</i> .....	13
1.2.5	<i>GSL Expression in Tumoren</i> .....	14
1.2.6	<i>GSL-Freisetzung und Aufnahme von Zellen</i> .....	16
1.2.7	<i>Anti-GSL Therapeutika</i> .....	18
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
3.1	CHEMIKALIEN .....	27
3.2	PROBENMATERIAL .....	27
3.2.1	<i>Gewebeproben</i> .....	27
3.2.2	<i>Serumproben</i> .....	29
3.3	GLYKOSPHINGOLIPIDANALYTIK .....	32
3.3.1	<i>Extraktion und Reinigung von GSL aus Gewebe</i> .....	32
3.3.2	<i>Herstellung von GSL-Extrakten</i> .....	33
3.3.3	<i>Extraktion und Reinigung von GSL aus Serumproben</i> .....	33
3.4	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE.....	37
3.4.1	<i>Orcin-Färbung</i> .....	41
3.5	OVERLAY-ASSAY.....	41
3.5.1	<i>Immunoassay</i> .....	43
3.5.2	<i>Lektin-Assay</i> .....	45
3.5.3	<i>Overlay-Assay mit Mehrfachfärbung</i> .....	46
3.5.4	<i>Detektionssysteme für Overlay-Assays</i> .....	47
3.5.5	<i>Densitometrische Messungen von gefärbten DC-Platten</i> .....	51
3.6	MASSENSPEKTROMETRISCHE VERFAHREN.....	52
3.6.1	<i>nanoESI-QTOF-MS</i> .....	53
3.6.2	<i>IR-MALDI-o-TOF-MS</i> .....	57
3.7	MOLEKULARGENETISCHE ANALYTIK.....	59
3.7.1	<i>Primerdesign und Bioinformatik</i> .....	61
3.7.2	<i>RNA-Isolierung</i> .....	63
3.7.3	<i>Reverse Transkription</i> .....	64
3.7.4	<i>Quantitative real-time PCR</i> .....	64
3.7.5	<i>Datenauswertung</i> .....	65
3.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	65
3.8.1	<i>Vergleich verbundener Stichproben</i> .....	66
3.8.2	<i>Vergleich unabhängiger Stichproben</i> .....	67

3.8.3	<i>Rangkorrelation</i> .....	68
3.8.4	<i>Software-unterstützte Datenauswertung</i> .....	69
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>70</b>
4.1	GSL-EXPRESSIONSANALYSE DURCH DC, KOMBINIERT MIT IMMUNCHEMISCHER MEHRFACHFÄRBUNG UND IR-MALDI-MS .....	70
4.1.1	<i>Entwicklung der Methode</i> .....	70
4.2	GSL-EXPRESSION VON HCC.....	82
4.2.1	<i>LacCer</i> .....	82
4.2.2	<i>Gb3Cer</i> .....	86
4.2.3	<i>Gb4Cer</i> .....	88
4.2.4	<i>CD75s-Ganglioside</i> .....	91
4.2.5	<i>Iso-CD75s-Ganglioside</i> .....	94
4.3	EXPRESSION VON ST6GAL1 UND ST3GAL6 IN HCC .....	98
4.4	SERUM-GSL VON PANKREASADENOKARZINOM- UND MAGENKARZINOM-PATIENTEN ....	100
4.4.1	<i>Entwicklung einer Extraktionsmethode für Serum-GSL</i> .....	100
4.4.2	<i>MS-Charakterisierung von Serum-GSL</i> .....	102
4.4.3	<i>Mehrfachfärbung hoch komplexer Serumganglioside</i> .....	105
4.4.4	<i>Strukturelle Charakterisierung Overlay-Assay-detektierter Serumganglioside</i> .....	106
4.4.5	<i>Statistische Auswertung</i> .....	112
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>119</b>
5.1	ENTWICKLUNG EINES DC-MEHRFACH-OVERLAY-ASSAYS FÜR GSL .....	119
5.2	NEUTRALE GSL IN HCC .....	122
5.3	GANGLIOSIDEXPRESSION IN HCC .....	126
5.4	SERUM-GSL .....	132
5.4.1	<i>Extraktion und Charakterisierung von GSL aus humanem Serum</i> .....	132
5.4.2	<i>Serumganglioside von Krebs-Patienten</i> .....	137
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>164</b>
8.1	ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN .....	164
8.2	ZUSÄTZLICHE TABELLEN .....	165
8.3	ABKÜRUNGSVERZEICHNIS .....	176
8.4	CURRICULUM VITAE .....	179
	<i>Erklärung</i> .....	180

## 1 Einleitung

Krebserkrankungen sind global von großer Bedeutung, da sie jährlich mit etwa 12,5% ein Achtel aller Todesfälle verursachen. Für das Jahr 2007 wurde die Zahl der Krebs-bedingten Todesfälle weltweit auf 7,6 Millionen und die Zahl der Neuerkrankungen auf 12 Millionen geschätzt (Garcia *et al.* 2007). Damit verursacht Krebs mehr Todesfälle als AIDS, Tuberkulose und Malaria zusammen und ist nach Herz-Kreislauf-erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Statistisch erkrankt jeder dritte Europäer im Laufe seines Lebens an Krebs (Cotman & Kukovic 2008), und die meisten Krebsarten sind bisher kaum heilbar. Trotz stetiger Fortschritte auf dem Gebiet der Onkologie ist die Entwicklung neuer gezielter Therapien unumgänglich.

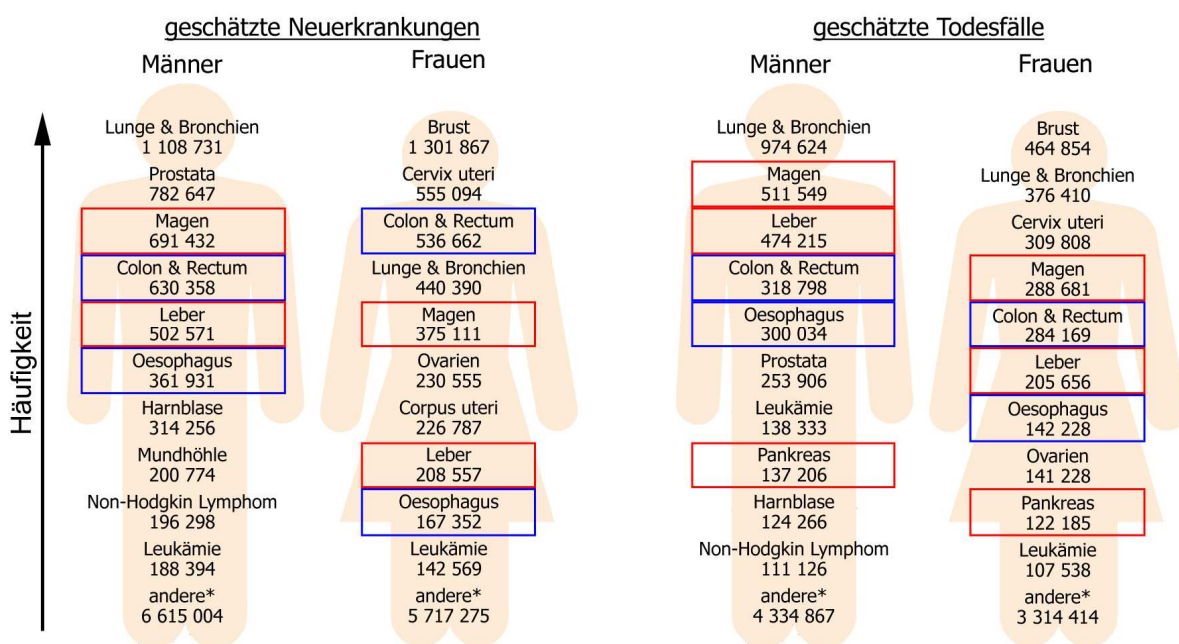
Die Grundlage der Krebserkrankung ist eine anormale, unkontrollierte Teilung von Zellen, durch die Gewebsneubildungen, die auch als Neoplasien oder Tumore bezeichnet werden, entstehen. Diese lassen sich zunächst in zwei Typen einteilen: benigne (gutartige) und maligne (bösartige) Tumore. Benigne Tumore weisen ein lokales Wachstum auf, während maligne Tumore invasiv in umgebende Gewebsschichten wachsen. Als „Krebs“ oder auch Malignome werden die bösartigen Tumore bezeichnet, die sich über das Lymphatische System und den Blutkreislauf in andere Organe des betroffenen Körpers ausbreiten, wo sie Metastasen bilden können.

Die Folgen der Erkrankung sind vielfältig. Durch das invasive Wachstum von den Primärtumoren und ihren Metastasen kommt es zu Raumforderungen und Gefäßverschlüssen, die häufig mit einer Funktionsbeeinträchtigung von lebenswichtigen Organen einhergehen. Am Ende der Kette steht Organversagen und somit der Tod der betroffenen Person.

Sowohl eine frühzeitige Diagnose als auch effektive Therapien können die Prognose für den Patienten verbessern, was bedeutet, dass hier die Forschung neue Ansätze anbieten muss.

## 1.1 Tumore des Gastrointestinaltraktes

Krebserkrankungen können in nahezu allen Gewebearten des Körpers entstehen. Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht über die Anzahl der Neuerkrankungen und Todesfälle in Abhängigkeit vom Entstehungsort der Tumore. Dabei wird deutlich, dass Organe des Gastrointestinaltrakts besonders häufig betroffen sind; Zu ihnen gehören Oesophagus (Speiseröhre), Magen, Dünndarm, Leber, Gallenblase, Pankreas (Bauchspeicheldrüse), Colon (Dickdarm) und Rectum (Enddarm).



**Abbildung 1.1: Häufigste Ursprungsorgane von Krebs. Geschätzte globale Zahlen der Neuerkrankungen und Todesfälle für Männer und Frauen für das Jahr 2007. Organe des Gastrointestinaltrakts sind mit Rahmen hervorgehoben, wobei Magen, Leber und Pankreas gesondert in Rot eingerahmt sind. \*Hautkrebs, der nicht auf Melanome zurückgeführt wird, ist nicht einbezogen. Modifiziert nach Garcia *et al.* (2007).**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich genauer mit Leber-, Magen- und Pankreaskarzinomen. Als Karzinome werden Tumore bezeichnet, die dem Epithelgewebe entstammen. Das Epithel gehört zu den vier Grundgewebearten, das durch Bildung einer ein- oder mehrlagigen Zellschicht innere und äußere Oberflächen des Körpers auskleidet.

Leber-, Magen-, und Pankreaskarzinome sind im Vergleich zu anderen Krebsarten sehr aggressiv und durch geringe Überlebensraten der Patienten gekennzeichnet, so dass sie zu einem größeren Anteil der Todesfälle beitragen als zu dem der Neuerkrankungen (vgl. Abbildung 1.1).

### 1.1.1 Hepatozelluläres Karzinom

Hepatozelluläre Karzinome (*hepatocellular carcinoma*, HCC) sind die wichtigsten primären Tumore der Leber. In Deutschland treten HCC mit einer Inzidenz von 5 pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf. Dabei sind Männer drei Mal häufiger betroffen als Frauen (Buchta *et al.* 2006). Der weltweite Anteil an Neuerkrankungen lag im Jahr 2002 für Männer bei 7,6% und für Frauen bei 3,6%. Die entsprechenden Mortalitätsraten sind mit 11,0% (Männer) und 6,2% (Frauen) noch höher (Ferlay *et al.* 2004). Die globale geographische Verteilung ist sehr ungleich. So treten HCC vermehrt in ostasiatischen und afrikanischen Ländern südlich der Sahara auf und stellen dort mitunter das häufigste Malignom bei Männern dar. Das HCC entsteht meist auf der Grundlage einer vorliegenden Leberschädigung, wie etwa einer chronisch-aktiven Hepatitis (B oder C), Leberzirrhose oder aufgrund von Kanzerogenen, wie z.B. Aflatoxinen, Androgenen oder Arsen (Buchta *et al.* 2006).

HCC zeigen keinerlei Frühsymptome oder aufkommende Symptome und werden darüber hinaus häufig durch vorherige Lebererkrankungen überdeckt. Spätsymptome sind ein tastbarer Tumor, Gewichtsverlust/Kachexie sowie Zunahme von Aszites, Oberbauchschmerzen und Ikterus.

Aufgrund des schleichenden Krankheitsverlaufs werden Risikopatienten einer regelmäßigen sonographischen Kontrolle unterzogen. Zusätzlich wird die  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP)-Konzentration im Serum gemessen. AFP wird in höherem Maße von der fötalen Leber produziert, wobei die Konzentrationswerte im Serum nach der Geburt ständig abnehmen und letztendlich bei Erwachsenen sehr niedrig (<10 ng/mL) sind. Bei Patienten mit HCC ist dieser Wert häufig erhöht. Patienten mit Werten >400 ng/mL zeigen zu 95% einen positiven Befund. Problematisch ist jedoch die Detektion kleiner Tumore. Zudem kann der AFP-Wert auch aufgrund einer Lebererkrankung erhöht sein (Kufe *et al.* 2003).

Zur Sicherung von Befunden und zur Klassifizierung der HCC werden histologische Verfahren, Computertomographie und Angiographie eingesetzt. Eine Klassifizierung der Tumore erfolgt nach dem standardisierten TNM-System (Tabelle 1.1).

Die Therapieform hängt stark von der Ausdehnung und dem Stadium des Tumors ab. Liegen keine Metastasen vor, wird eine Leberteilektomie oder eine Lebertransplantation vorgenommen. Nach diesen Eingriffen kommt es jedoch häufig zu Rezidiven. Im Fall einer Metastasierung werden palliative Maßnahmen eingesetzt. Dazu gehören Strahlen- und Polychemotherapie sowie Verfahren zur Tumorembolisation wie die perkutane Ethanolinjektion, Radiofrequenzablation, Laser-induzierte Thermotherapie oder Kryotherapie.

Unter anderem wegen der frühen Metastasierung, die lymphogen in den Leberhilus oder hämatogen in Lunge und Knochen stattfinden kann, aber auch wegen der häufig späten Diagnose ist die Prognose für HCC extrem schlecht. Die mittlere Überlebenszeit nach der Diagnosestellung beträgt etwa 6 Monate (Buchta *et al.*, 2006).

**Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation von HCC.<sup>a</sup>**

Stadium	T	N	M
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>IIIa</b>	T3	N0	M0
<b>IIIb</b>	T1-3	N1	M0
<b>IVa</b>	T4	N0/1	M0
<b>IVb</b>	T1-4	N0/1	M1

<sup>a</sup> Greene *et al.* 2002

Dabei gilt:

Primärtumor (T)

TX Primärtumor konnte nicht bestimmt werden

T0 kein Hinweis auf einen Primärtumor

T1 solitärer Tumor mit maximalem Durchmesser  $\leq 2$  cm ohne Gefäßinvasion

T2 solitärer Tumor mit maximalem Durchmesser  $\leq 2$  cm mit Gefäßinvasion, multipler Tumor beschränkt auf einen Leberlappen mit je maximalen Durchmessern  $\leq 2$  cm und ohne Gefäßinvasion oder

solitärer Tumor mit maximalem Durchmesser  $> 2$  cm ohne Gefäßinvasion

T3 solitärer Tumor mit maximalem Durchmesser  $> 2$  cm mit Gefäßinvasion, multipler Tumor, beschränkt auf einen Leberlappen mit je maximalen Durchmessern  $\leq 2$  cm und mit Gefäßinvasion oder

multipler Tumor, beschränkt auf einen Leberlappen mit maximalen Durchmessern auch  $>2$  cm und mit oder ohne Gefäßinvasion

T4 Multipler Tumor in mehr als einem Leberlappen oder

Ausdehnung des Tumors in *Vena portae hepatis* (Pfortader) oder Lebervene(n)

Regionale Lymphknoten (N)

NX wurde nicht bestimmt

N0 keine Metastasen in regionalen Lymphknoten

N1 Metastasen in regionalen Lymphknoten

Fernmetastasen (M)

MX wurde nicht bestimmt

M0 keine Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen vorhanden

### 1.1.2 Magenkarzinom

Magenkarzinome sind maligne Neubildungen der Magenschleimhaut, die in Deutschland mit einer Inzidenz von 10 pro 100.000 pro Jahr auftreten (Buchta *et al.* 2006). Weltweit nimmt die Inzidenz ab, doch sind Magenkarzinome immer noch die zweithäufigste Ursache für tumorbedingten Tod. In China, Südamerika und Osteuropa ist Magenkrebs häufig, in Japan ist es die häufigste Erkrankung (Parkin *et al.* 1999; Hartgrink 2009).

Die Ätiologie ist weitgehend unbekannt. Es gibt Faktoren, die die Entstehung eines Karzinoms begünstigen. Dies scheinen genetische Prädisposition (z.B. Blutgruppe A) aber auch Ernährungs- und Umweltfaktoren zu sein. Kontamination von Nahrungsmitteln mit Kanzerogenen, u.a. Nitrate und Nitrite, und die Nahrungszubereitung spielen ebenfalls eine Rolle. Weitere Faktoren sind Gastritis Typ A (Achlorhydrie) und Typ B (*Helicobacter pylori*-Infektion) sowie adenomatöse Polypen und Morbus Ménétrier. Epidemiologische Studien zeigen, dass durch *H. pylori*-Infektion das Risiko, an Magenkarzinom zu erkranken, um das drei- bis fünffache steigt (Asaka 2002; Parsonnet *et al.* 1997; Nomura *et al.* 1991).

Problematisch ist, dass Magenkarzinome im Frühstadium keine Symptomatik zeigen und erst bei fortgeschrittener Erkrankung zu Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsabnahme und epigastrischem Schmerz kommt. Blutungen können zu Teerstuhl führen. Die Diagnose erfolgt meist endoskopisch und histologisch, wobei zusätzlich auch endosonographische Verfahren eingesetzt werden. Befunde werden nach dem Klassifizierungssystem der AJCC/UICC (*American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer*) in verschiedene Stadien eingeteilt (siehe Tabelle 1.2).

Die einzige wirklich kurative Therapieform ist die frühzeitige radikale Operation, die sogenannte Gastrektomie. Dabei werden sowohl der Magen als auch regionale Lymphknoten entfernt. Palliative Maßnahmen bestehen aus der Polychemotherapie, die jedoch meist wenig erfolgreich ist, und verschiedenen chirurgischen Eingriffen, z.B. der Gastrektomie und Gastroenterostomie.

Die Überlebensrate für Magenkrebs beträgt in entwickelten Ländern etwa 20-25%. Die Prognose hängt dabei stark vom Tumorstadium ab. Generell ist sie für Patienten mit resezierbaren Tumoren besser. Aber auch dann beträgt die Überlebensrate in den meisten entwickelten Ländern nur etwa 50% (Hartgrink 2009).

Abgesehen von den in der Serumdiagnostik standardmäßig bestimmten Leberwerten und Metaboliten wurden auch die Tumormarker CEA (engl. *carcinoembryonic antigen*), das *cancer antigen* 125 (CA125), CA19-9 (Sialyl-Lewis-a) und CA72-4 sowie das *tissue*

*polypeptide antigen* (TPA) auf diagnostischen Wert untersucht. Diese besaßen nur eine geringe Aussagekraft bei Magenkarzinomen (Lai 2002).

**Tabelle 1.2: AJCC/UICC Klassifizierung für Magenkarzinome.<sup>a</sup>**

Ausdehnung des Primärtumors	Metastasierungszustand			
	N0	N1	N2	N3
T1	Ia	Ib	II	IV
T2	Ib	II	IIIa	IV
T3	II	IIIa	IIIb	IV
T4	IIIa	IIIb	IV	IV

<sup>a</sup>Fleming *et al.* 1997

Dabei gilt:

Primärtumortumor (T)

- TX konnte nicht bestimmt werden
- T0 kein Hinweis auf einen Primärtumor
- T1 Oberflächlicher Tumor, bis *Submucosa*
- T2 Ausdehnung in die *Muscularis propria*
- T3 Durchbruch der Serosa
- T4 Invasion in benachbarte Organe

Regionale Lymphknoten (N)

- N0 keine Metastasen in Lymphknoten
- N1 1 bis 6 Metastasen in Lymphknoten
- N2 7 bis 15 Metastasen in Lymphknoten
- N3 mehr als 15 Metastasen in Lymphknoten

### 1.1.3 Pankreaskarzinome

Bei Krebserkrankungen des Gastrointestinaltrakts stellen Pankreaskarzinome in entwickelten Ländern die dritthäufigste Todesursache dar (Garcia *et al.* 2007). Nahezu alle Neubildungen des Pankreas entstehen im exokrinen Teil (95%) und zeigen Eigenschaften von Adenokarzinomen. Die Wahrscheinlichkeit, an Pankreaskrebs zu erkranken, ist bis zu einem Alter von 50 Jahren gering, steigt aber mit fortschreitendem Alter stark an. Aufgrund der meist späten Diagnose und dem Fehlen von effektiven Therapien entspricht die Inzidenz nahezu der Mortalitätsrate. Es wird angenommen, dass chronische Pankreatitis, *Diabetes mellitus*, übermäßiger Kaffee- und vor allem Tabakkonsum die Entstehung begünstigen.

Wie auch bei anderen gastrointestinalen Tumoren zeigen sich kaum Symptome im Frühstadium. In Folge der Erkrankung kommt es zu unspezifischen, Pankreatitis-ähnlichen Symptomen: Schmerzen in Mittel- und Oberbauch, die mitunter in den Rücken strahlen,



Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen und Gewichtsabnahme. Sogenannte Verschluss Symptome können bei Obstruktion des *Ductus choledochus* durch den Tumor auftreten. Diese sind Ikterus, Pruritus, erhöhte Cholesterase-Parameter und Courvoisier-Zeichen. Weiter kann es zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz, Begleitpankreatitis und einer diabetischen Stoffwechsellage, der Hyperglykämie, kommen.

In der Diagnose werden bildgebende Verfahren eingesetzt, (Endo)Sonographie, Gastroduodenoskopie, Computertomographie und ERCP (endoskopische retrograde Cholangio-Pankretikographie). Zusätzlich können Amylase- und Lipase-Werte, die häufig leicht erhöht sind, sowie die Tumormarker CA19-9 und CEA herangezogen werden. Diese beiden Tumormarker sind ebenfalls oft erhöht, werden aber hauptsächlich zur postoperativen Verlaufskontrolle eingesetzt (Buchta *et al.* 2006). Eine Klassifizierung der Tumore findet bei Pankreasadenokarzinomen ebenfalls nach dem standardisierten TNM-System der AJCC/UICC statt (Tabelle 1.3).

Zur Therapie von lokalen, nicht-metastasierten Tumoren kann ein radikaler chirurgischer Eingriff mit begleitender Chemo- und Strahlenbehandlung eingesetzt werden. Die Rezidivrate ist dennoch extrem hoch. Wie häufig bei anderen Gastrointestinaltumoren auch, stellt die Operation die einzige kurative Therapieform dar. Sie wird häufig nach Whipple durchgeführt und ist ein komplizierter Eingriff, unter anderem bestehend aus Pankreasteilresektion, Duodenektomie, radikaler lokaler Lymphknotenektomie, Cholecystektomie und Splenektomie (Ujiki & Talamonti 2007). Nach chirurgischer Behandlung liegt die mediane Überlebenszeit bei 17 bis 21 Monaten. Bei lokalen, nicht-metastasierten aber fortgeschrittenen Tumoren liegt die mediane Überlebenszeit bei 6-10 Monaten. Bei bereits vorhandenen Metastasen liegt die Überlebenszeit bei nur 3-6 Monaten (Kufe *et al.* 2003). Palliativ werden Schmerztherapie und chirurgische Eingriffe zur Aufrechterhaltung des Gallenflusses eingesetzt, der je nach Raumforderung des Tumors unterdrückt sein kann. Strahlen- und Chemotherapien sind in der Regel von geringer Wirkung.

Im Allgemeinen sind die Prognosen bei Pankreasadenokarzinomen extrem schlecht. Selbst bei einem operablen Karzinom im Frühstadium (T1N0M0, vgl. Tabelle 1.3) liegt die 5-Jahresüberlebensrate unter 25% (siehe auch Tabelle 1.4). Dazu trägt bei, dass Adenokarzinome des exokrinen Pankreas ein hohes Metastasierungspotential haben. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegen bei der Mehrheit der Fälle schon Metastasen in Lymphknoten oder der Leber vor und die 5-Jahresüberlebensrate sinkt bei fortgeschrittenen Stadien auf unter 2%.

**Tabelle 1.3: TNM Klassifikation von Pankreas-Adenokarzinomen.<sup>a</sup>**

Stadium	T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>Ia</b>	T1	N0	M0
<b>Ib</b>	T2	N0	M0
<b>IIa</b>	T3	N0	M0
<b>IIb</b>	T1-3	N1	M0
<b>III</b>	T4	N0/1	M0
<b>IV</b>	T1-4	N0/1	M1

<sup>a</sup> Greene *et al.* 2002

Dabei gilt:

Primärtumor (T)

Tx Primärtumor konnte nicht bestimmt werden

T0 kein Hinweis auf einen Primärtumor

Tis *Carcinoma in situ*T1 Tumor ist auf das Pankreas beschränkt und im Durchmesser  $\leq 2$  cmT2 Tumor ist auf das Pankreas beschränkt und im Durchmesser  $> 2$  cmT3 Tumor dehnt sich über das Pankreas aus ohne Penetration des *Truncus celiacus* oder der *Arteria mesenterica superior*T4 Tumor mit Penetration des *Truncus celiacus* oder der *Arteria mesenterica superior*Regionale Lymphknoten (N)

NX wurde nicht bestimmt

N0 keine Metastasen in regionalen Lymphknoten

N1 Metastasen in regionalen Lymphknoten

Fernmetastasen (M)

MX wurde nicht bestimmt

M0 keine Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen vorhanden

**Tabelle 1.4: Relativer Anteil der Stadien von Pankreastumoren bei Diagnosestellung und zugehörige 5-Jahresüberlebensraten in den USA.<sup>a</sup>**

Stadium	Relativer Anteil	5-Jahresüberlebensrate
Lokal begrenzt (N0, M0)	7%	22,2%
Ausdehnung ins Lymphsystem (N1, M0)	26%	8,7%
Metastasiert (M1)	53%	1,8%
Nicht klassifiziert	14%	4,9%

<sup>a</sup> Horner *et al.* 2009

## 1.2 Glykosphingolipide

Glykosphingolipide (GSL) sind Membranbestandteile von tierischen Zellen, in denen sie hauptsächlich in der äußeren Seite der Plasmamembran integriert vorkommen und eine wichtige Rolle in Zellkommunikationsprozessen spielen. Nahezu alle Glykolipide in Vertebraten sind GSL.

### 1.2.1 Struktur

GSL sind aus einem hydrophilen Glykan und einem hydrophoben Lipidteil, dem Ceramid, zusammengesetzt (Abbildung 1.2). Die Struktur der GSL ist hoch variabel; schon allein aufgrund des Glykans können mehrere Hundert verschiedene Typen unterschieden werden (*online*-Datenbanken mit GSL-Einträgen unter: <http://sphingolab.biology.gatech.edu>; <http://www.glycosciences.de>; <http://www.lipidmaps.org>). Zusätzlich wird die Vielfalt an GSL noch durch Variationen des Ceramidteils erhöht. Als Ceramid bezeichnet man einen *N*-acylierten aliphatischen Aminoalkohol. Sowohl der Aminoalkohol als auch die über Amidbindung gebundene Fettsäure variieren in Kettenlänge, Grad der Sättigung und Anzahl der Hydroxylierungen. In humanem Gewebe wird jedoch hauptsächlich Sphingosin (D-Erythro-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol, d18:1) exprimiert. Die gebundenen Fettsäuren unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer Kettenlänge, die von C14 bis C30 reichen kann; außerdem kann unter anderem eine zusätzliche Hydroxylgruppe am  $\alpha$ -C-Atom vorliegen. Der Ceramidteil beeinflusst unter anderem die Präsentation des Glykans auf der Membran (Pascher 1976) und somit auch die Antigenität, Immunogenität (Yoshino *et al.* 1982; Kannagi *et al.* 1983) und Rezeptorfunktion der GSL (Kiarash *et al.* 1994; Boyd *et al.* 1994).

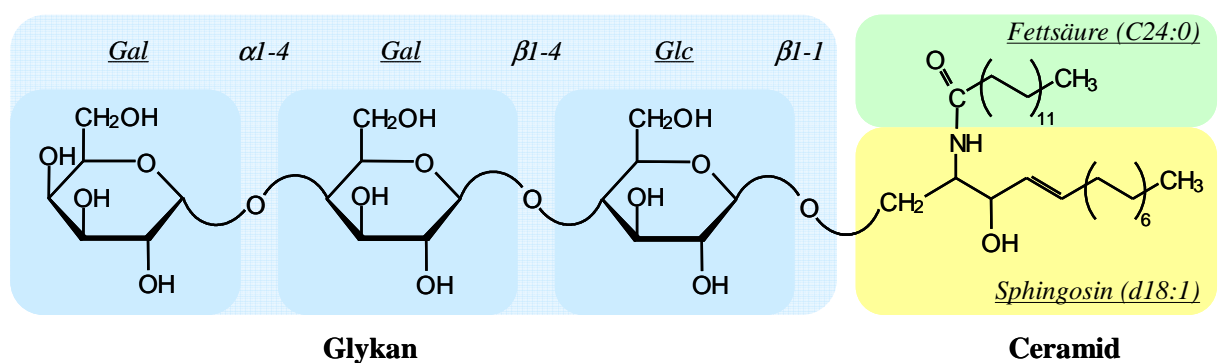


Abbildung 1.2: Struktur von GSL, veranschaulicht am Beispiel von Gb3Cer (d18:1, C24:0) (Nomenklatur siehe Kapitel 1.2.2), einem GSL mit einem hydrophilen Trisaccharid-Glykan und einem hydrophoben Ceramidteil, bestehend aus Sphingosin und einer C24:0-Fettsäure.

Die strukturelle Einteilung der GSL erfolgt aufgrund ihrer Glykanstrukturen. GSL werden hauptsächlich in drei Klassen unterteilt: neutrale GSL, Sialinsäure-haltige Ganglioside und Sulfat-haltige Sulfatide.

In der GSL-Synthese werden sowohl Glukose als auch Galaktose an das Ceramid gebunden, wobei nur Glukosylceramid als Grundstruktur für GSL mit komplexen Glykanstrukturen dient. Galaktosylceramid wird in großen Mengen im Gehirn und Nervengewebe exprimiert, wo es auch mit einer Sialinsäure oder Sulfatgruppe substituiert vorliegen kann.

### 1.2.2 Nomenklatur

Komplexe GSL werden, basierend auf Sequenz und Verknüpfungen der Zucker ihrer Kernstruktur, in verschiedene Serien eingeteilt, die zur Übersicht in Tabelle 1.5 dargestellt sind. Die Nomenklatur richtet sich im Wesentlichen nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB (Chester 1998). Die Bezeichnung eines GSLs ergibt sich aus (i) der Zugehörigkeit zu einer Serie als Präfix, z.B. „Globo“ (Gb) für die Globoserie oder „Neolacto“ (nLc) für die Neolactoserie etc., (ii) der Anzahl der Monosaccharideinheiten, „mono-“ (1), „di-“ (2), „triosaosyl“ (3), tetraosyl (4), etc. und (iii) dem Suffix „Cer“ für den Ceramidteil. Das aus vier Monosaccharideinheiten bestehende GSL mit der Struktur GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer wird der Globoserie zugeordnet und erhält die Bezeichnung „Globotetraosylceramid“ mit der Kurzschreibweise „Gb4Cer“ (vgl. Tabelle 1.5).

Die Bezeichnung weiterer GSL-Strukturen baut auf denen der Grundstrukturen auf. So wird auf Substitutionen des Glykans, die keiner Grundstruktur zuzuordnen sind, durch den Namen des Substituenten (Neu5Ac, Fuc etc.), eine römische Zahl und eine hochgestellte arabische Zahl verwiesen. Die römische Zahl beschreibt, welcher Zucker in der Grundstruktur (gezählt vom Ceramid-Ende) substituiert ist, und die arabische Zahl kennzeichnet die Position innerhalb des Saccharids, an welcher der Substituent bindet. Dieses System wird in Tabelle 1.6 an Gangliosiden der Neolactoserie verdeutlicht.

**Tabelle 1.5: Die wichtigsten GSL-Serien; ihre Grundstrukturen und Bezeichnungen.<sup>a</sup>**

Struktur <sup>b</sup>	Bezeichnung	Kurz-schreibweise
Glc $\beta$ 1Cer	Glukosylceramid	GlcCer
Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	Laktosylceramid	LacCer
<b>Ganglioserie (Gg)</b>		
GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	Gangliotriaosylceramid	Gg3Cer
Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	Gangliotetraosylceramid	Gg4Cer
<b>Lactoserie (Lc)</b>		
GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	Lactotriaosylceramid	Lc3Cer
Gal $\beta$ 3GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	Lactotetraosylceramid	Lc4Cer
<b>Neolactoserie (nLc)</b>		
Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	Neolactotetraosylceramid	nLc4Cer
<b>Globoserie (Gb)</b>		
Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	Globotriaosylceramid	Gb3Cer
GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	Globotetraosylceramid	Gb4Cer

<sup>a</sup> Die Nomenklatur folgt den IUPAC-IUB Empfehlungen (Chester 1998).

<sup>b</sup> Bei der Strukturbeschreibung wird davon ausgegangen, dass alle Saccharide in D-Konfiguration vorliegen und glykosidische Bindungen mit ihrem anomeren C-Atom eingehen, d.h. mit C1 für Glc etc.

**Tabelle 1.6: Ganglioside der Neolactoserie, Strukturen und Bezeichnungen.<sup>a</sup>**

Struktur	Bezeichnung
Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer
Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer
Neu5Ac $\alpha$ 6Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer
Neu5Ac $\alpha$ 6Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer	VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer

<sup>a</sup> Bei der Strukturbeschreibung wird davon ausgegangen, dass Neu5Ac-Einheiten glykosidische Bindungen mit ihrem anomeren C-Atom (C2) eingehen.

Für einige kurzkettige Ganglioside und Ganglioside der Ganglio-Serie richtet sich die Nomenklatur historisch bedingt nach Svennerholm (Svennerholm 1963). Diese Nomenklatur ermöglicht es, komplexe Strukturen mit drei bis vier Zeichen kompakt zu beschreiben, und ist aufgrund ihrer Übersichtlichkeit weiterhin in Gebrauch. Einige Beispiele sind in Tabelle 1.7 angeführt. Die erste Ziffer „G“ bezeichnet die ursprüngliche Zuordnung zur Ganglioserie; die zweite Ziffer gibt die Anzahl der gebundenen Neuraminsäuren („M“ für Mono-, „D“ für Di-, „T“ für Trisialo-GSL, etc.) an; die dritte Ziffer wurde ursprünglich eingesetzt, um das chromatographische Laufverhalten zu beschreiben, korreliert aber mit dem Aufbau der jeweiligen neutralen Grundstruktur. Die Suffixe „a“, „b“ etc. verweisen auf die Anzahl der Neuraminsäuren, die an die Galaktose am nicht-reduzierenden Ende der Grundstruktur gebunden sind und erlaubt die Unterscheidung von Strukturisomeren.

**Tabelle 1.7: Bezeichnung von Gangliosiden nach Svennerholm.**

Struktur	IUPAC-Nomenklatur <sup>a</sup>	Svennerholm-Nomenklatur <sup>b</sup>
Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer   $\alpha$ 2,3 Neu5Ac	II <sup>3</sup> Neu5Ac-LacCer	GM3
GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer   $\alpha$ 2,3 Neu5Ac	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg3Cer	GM2
Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer   $\alpha$ 2,3 Neu5Ac	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer	GM1a
Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer   $\alpha$ 2,3 Neu5Ac   $\alpha$ 2,8 Neu5Ac	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -LacCer	GD3
GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer   $\alpha$ 2,3 Neu5Ac   $\alpha$ 2,8 Neu5Ac	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg3Cer	GD2
Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer   $\alpha$ 2,3        $\alpha$ 2,3 Neu5Ac      Neu5Ac	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer	GD1a
Gal $\beta$ 3GalNAc $\beta$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer   $\alpha$ 2,3 Neu5Ac   $\alpha$ 2,8 Neu5Ac	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg4Cer	GD1b

<sup>a</sup> Die Bezeichnungen folgen den IUPAC-IUB Empfehlungen (Chester 1998).

<sup>b</sup> Bezeichnungen nach (Svennerholm 1963).

### 1.2.3 Biosynthese

Die Biosynthese der komplexen GSL findet bis zum Glukosylceramid im Cytosol und danach im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparats statt. Während dieses intrazellulären Transports werden die jeweiligen Glykan-Strukturen über die Aktivität von Glykosyltransferasen sequenziell verlängert. GSL werden final über Vesikel an die Oberfläche der Zellen transportiert (Kolter *et al.* 2002; Sandhoff & Kolter 2003).

Die Enzyme für die GSL-Grundstrukturen sind GSL-spezifisch. Enzyme für die Synthese von langkettigen Glykanen können auch an der Glykoproteinbiosynthese beteiligt sein, die im

Wesentlichen parallel stattfindet. GSL-Glykostrukturen können, wie im Fall von Hirngangliosiden, von Mensch zu Mensch hoch konserviert sein, aber auch individuell variieren, wie im Fall der Blutgruppenantigene, die auch in Form von GSL exprimiert werden (Varki *et al.* 2008).

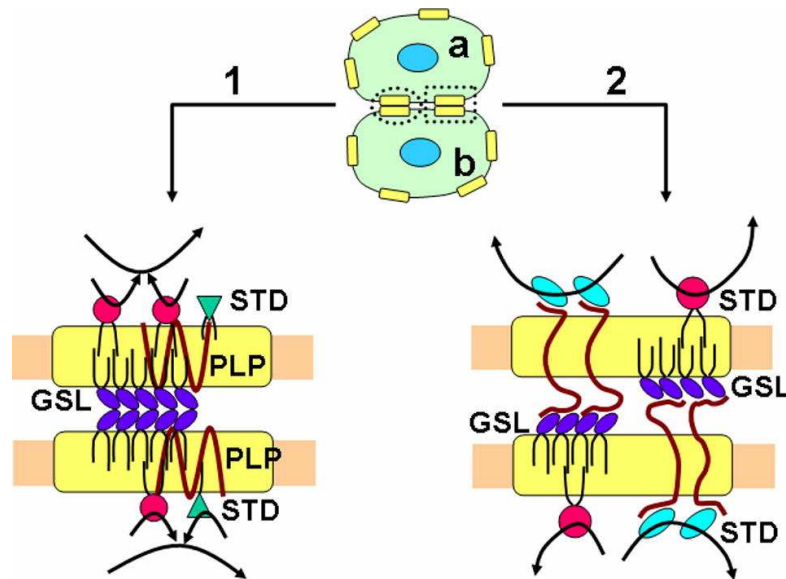
Das GSL-Expressionsmuster ist hoch variabel. Es ändert sich mit Zellwachstum, Differenzierung, viraler Transformation, Ontogenese und Onkogenese (Hakomori 1981).

#### 1.2.4 Organisation in funktionalen Einheiten

In der Zytoplasmamembran sind GSL höchstwahrscheinlich in funktionale Einheiten organisiert, die aufgrund ihrer Mobilität innerhalb der Lipiddoppelschicht einer Membran als *lipid rafts* (engl. für „Lipidflöße“) bezeichnet werden. Diese selbstassoziierten Mikrodomänen haben eine Größe von 10-50 nm und bestehen hauptsächlich aus GSL, Sphingomyelin, Cholesterin und GPI-verankerten sowie Transmembranproteinen (Simons & Ikonen 1997). Aufgrund der Anreicherung von GSL in Membrandomänen und deren Resistenz gegenüber nichtionischen Detergenzien werden sie auch GEMs (engl. *glycolipid enriched membranes*) (Hakomori 2003) oder DRMs (engl. *detergent resistant membranes*) (Brown & London 1997) genannt. Es wurde gezeigt, dass GSL-Mikrodomänen an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurden sie auch als *glycosignaling domains* oder auch Glykosynapsen bezeichnet (Hakomori 2002). Hakomori teilt GSL-Mikrodomänen einer Zelle aufgrund ihrer physikochemischen und funktionalen Eigenschaften in die Untergruppen der mobilen *rafts* und der Glykosynapsen ein (Hakomori 2009).

GSL können sowohl mit Proteinen als auch mit Glykanen interagieren. Über Wechselwirkungen innerhalb einer Membran (*cis*-Interaktion) bilden GSL mit anderen Lipiden und Proteinen Mikrodomänen aus. Weiterhin können GSL über *cis*-Interaktion Signaltransduktionsprozesse modulieren. So weist z.B. der EGF Rezeptor in Abhängigkeit von seiner Wechselwirkung mit GD1a oder GM3 in der gleichen Membran eine unterschiedliche Affinität zu seinem Liganden auf (Yates 1998).

Bei einer Wechselwirkung von GSL mit Proteinen oder Glykanen einer anderen Membran spricht man von *trans*-Interaktion. Sie spielt eine Rolle bei GSL-vermittelter Zell-Zell-Erkennung, Zelladhäsion und Signaltransduktion (siehe Abbildung 1.1). Dabei hat wahrscheinlich die multivalente Präsentation der GSL in Mikrodomänen einen starken Einfluss auf die Affinität der Bindung.



**Abbildung 1.3: Adhäsion und Signaltransduktion über Glykosynapsen.** Zwei Zellen (a und b) können über Glykosynapsen-vermittelte Adhäsion in Kontakt treten. (1) Über die Wechselwirkungen von Glykosphingolipiden (GSL) mit GSL der benachbarten Zelle kommt es zu einer Aktivierung von Signalgebern (STD, engl. *signal transducer*). Das Proteolipid-Protein (PLP) stabilisiert wahrscheinlich den GSL-Komplex. (2) Über GSL-Protein-Interaktion vermittelter transmembraner Signaltransduktionsprozess. Quelle: Hakomori (2009).

Aufgrund ihrer Exposition an der Zelloberfläche fungieren GSL auch als Rezeptorstrukturen für Pathogene, wie Viren (Influenza) und Bakterien (z.B. uropathogene *E. coli*). Bakterielle Toxine, darunter Cholera oder Shiga Toxin, binden ebenfalls an GSL (Müthing 2001).

GSL sind essenziell für mehrzellige Organismen, wo sie intrazelluläre Kommunikationsprozesse vermitteln und modulieren.

### 1.2.5 GSL Expression in Tumoren

Der Zusammenhang zwischen einer anormalen Glykosylierung und maligner Transformation von Zellen wurde bereits in den 1970er Jahren festgestellt, als im Zuge der Entdeckung der Hybridom-Technologie monoklonale Antikörper gegen Krebszellen hergestellt wurden. Dabei wiesen die Antikörper, die gegen Tumor-assoziierte Strukturen, d.h. bevorzugt auf den Tumoren exprimierte Strukturen, gerichtet waren, häufig Glykostrukturen als Epitope auf (Feizi 1985; Varki *et al.* 2008).

Die Veränderungen des Glykosylierungsprofils betreffen prinzipiell alle Glykokonjugate: Mucine, Glykosaminoglykane und proteingebundene O- und N-Glykane sowie



lipidgebundene Glykane. Dieser Wandel wird hauptsächlich auf zwei Faktoren zurückgeführt: (i) eine unvollständige Biosynthese, die zu einer Akkumulation von Vorläuferstrukturen und (ii) eine *de novo* Synthese neuer Glykostrukturen (Hakomori 1985). Es wird angenommen, dass die unvollständige Synthese durch epigenetisches *silencing* von Genen des Glykstoffwechsels über DNA-Methylierung und/oder Histon-Modifikationen hervorgerufen wird und in den Frühphasen der Tumorentwicklung auftritt. Beim Fortschreiten der Krankheit werden in Sauerstoff-unterversorgten Zonen des Tumors bevorzugt Hypoxie-resistente Zellen selektiert. Diese weisen nunmehr eine konstitutive Aktivierung der Hypoxie-induzierten Faktoren auf, die die Expression bestimmter Gene des Glykstoffwechsels einleiten und in Folge zu einer Neusynthese (*de novo* Synthese) von Glykostrukturen führen (Kannagi *et al.* 2008).

Häufig geht die Entartung von Zellen mit einer anormalen Neuraminsäure-Expression einher, die sich in vielen Tumoren durch eine erhöhte Konzentration auf der Zelloberfläche äußert. So zeigen z.B. Tumore ektodermalen Ursprungs häufig eine insgesamt erhöhte Gangliosid-Expression. Aber auch die Überexpression einzelner Ganglioside wurde beschrieben. Dies betrifft z.B. GD3 in Melanomen (Nudelman *et al.* 1982; Pukel *et al.* 1982), GD2 in Melanomen und Neuroblastomen (Cahan *et al.* 1982; Watanabe *et al.* 1982) und GM2 in Melanomen (Tai *et al.* 1983). Auch Modifikationen von Neuraminsäuren, wie z.B. die 9-*O*-Acetylierung von GD3 unter anderem in Melanomen (Manzi *et al.* 1990) und Mammakarzinomen (Marquina *et al.* 1996), wurden in Assoziation mit Tumoren gebracht.

Die GSL-Expression beeinflusst den Phänotyp der Tumorzellen und steht im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf und der Prognose. GSL sind wichtige Faktoren für Adhäsion, Motilität und Wachstum von Tumorzellen, da sie über Protein-Kohlenhydrat- und Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionsprozessen beteiligt sind (Hakomori 1996; Hakomori 2009).

Über die Vermittlung von Adhäsions- und Zellerkennungsprozessen sind GSL an der Bildung von Metastasen beteiligt. GSL, die Sialyl-Lewis-x- (Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4(Fuca3)GlcNAc) und Sialyl-Lewis-a- (Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 3(Fuca4)GlcNAc)-Determinanten aufweisen, sind auf humanen Tumorzellen häufig überexprimiert und dienen als Rezeptoren für Lektine. Auf diese Weise können sie bei der hämatogenen Metastasierung, z.B. über die Bindung an E-Selektin, das auf aktiviertem Endothel exprimiert wird, die Adhäsion der Tumorzellen an die Gefäßwand vermitteln und die Migration der Tumorzelle in das umliegende Gewebe begünstigen. Dieser Mechanismus wird natürlicherweise von Leukozyten bei der Diapedese genutzt (Takada *et al.* 1993; Kannagi 1997; Kannagi *et al.* 2004). Ebenso scheint die

Interaktionen von Tumor-GSL mit P- und L-Selektinen unter Beteiligung von Leukozyten und Thrombozyten die Metastasenbildung zu begünstigen (Borsig *et al.* 2002). Disialoganglioside auf Tumorzellen vermitteln über Bindung an Siglec-7 auf Lymphozyten die Bildung von Aggregaten. Diese können vaskuläre Mikroembolien hervorrufen, welche als Keim für eine neue Metastase dienen (Ito *et al.* 2001). Weitere Integrin-abhängige Adhäsionsprozesse wurden für GM3 und GD2 beschrieben (Cheresh *et al.* 1987; Zheng *et al.* 1994). Das Ablösen einzelner Zellen vom Primärtumor kann über homotypische Wechselwirkungen von GSL, z.B. Lewis-x–Lewis-x und GM3-GM3, vermittelt werden und somit zu einer vermehrten Streuung führen (Kojima & Hakomori 1991).

Über ihre Beteiligung an Glykosynapsen sind GSL und ihre Derivate zudem in Signaltransduktions- und Regulierungsprozesse involviert, die die wesentlichen Eigenschaften der Tumorzelle bestimmen. Für GM3 im Komplex mit dem Tetraspanin CD9 (GM3/CD9) konnte, ebenso wie für GM2/CD82, gezeigt werden, dass sie die Wachstumsfaktorrezeptor- und Integrin-abhängige Signaltransduktion modulieren und dadurch Wachstum und Motilität inhibieren (Hakomori 2009).

### **1.2.6 GSL-Freisetzung und Aufnahme von Zellen**

GSL können von Zellen in den extrazellulären Raum freigesetzt und aus diesem wieder aufgenommen werden (Lauc & Heffer-Lauc 2006). Dies konnte in Zellkultur-Experimenten gezeigt werden, in denen eine GSL-produzierende Donor-Zelllinie und eine GSL-defiziente Akzeptor-Zelllinie durch eine Membran getrennt kultiviert wurden (Olshefski & Ladisch 1996).

Das Maß der Abgabe von GSL hängt von Faktoren wie z.B. der Zelldichte ab (Shaposhnikova *et al.* 1984) und kann beträchtlich sein. So werden von Neuroblastoma-Zellen *in vitro* 0,5% aller GSL einer Zelle pro Stunde freigesetzt (Li & Ladisch 1991). Es werden bevorzugt GSL mit Fettsäuren kurzer Kettenlänge abgegeben; die Glykostruktur dagegen scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen (Young *et al.* 1986; Chang *et al.* 1997). Freigesetzte GSL können sowohl in Form von Vesikeln als auch von Monomeren vorliegen. Diese Monomere natürlich freigesetzter GSL können in Konzentrationen vorliegen, die bei einer *in vitro* Präparation von aufgereinigten GSL zur Bildung von Mizellen führen (Kong *et al.* 1998). Zudem werden natürlich freigesetzte GSL im Vergleich zu *in vitro* präparierten mit höherer Effizienz von Zellen aufgenommen (Olshefski & Ladisch 1996). Aufgrund dessen wird

angenommen, dass die Freisetzung und der Transport von GSL ein Protein-vermittelter Vorgang ist. Es wird vermutet, dass Saposine (und Prosaposin) sowie das sog. Glykolipid-Transferprotein die Freisetzung vermitteln und auch als „Fähren“ bzw. Transportproteine dienen könnten (Lauc & Heffer-Lauc 2006).

Bei der Aufnahme von exogenen GSL wurden drei verschiedene Zustände beobachtet: (i) GSL sind als Mizellen an die Zelloberfläche gebunden und können mit Serum abgelöst werden; (ii) GSL sind Serum-resistent aber Protease-labil gebunden.; (iii) die GSL sind Serum- und Protease-resistent gebunden (Callies *et al.* 1977; Radsak *et al.* 1982; Schwarzmann *et al.* 1983). Dies sind weitere Hinweise auf einen über spezifische Proteine vermittelten Aufnahme- und Abgabe-Prozess. Die Aufnahme von GSL ist generell abhängig von der Konzentration in der sie vorliegen, der Temperatur, der Inkubationsdauer und dem jeweiligen Zelltyp.

Eine Abgabe von Tumor-GSL konnte *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden. *In vivo* können aus Tumoren stammende GSL in die Blutbahn gelangen. So wurden im Zuge von Krebserkrankungen Veränderungen der GSL-Konzentration sowie des GSL-Profiles im Serum betroffener Patienten beobachtet. Diese Änderungen betrafen hauptsächlich Ganglioside. So wurden erhöhte Gesamtgangliosid-Konzentrationen in Serum von Patienten mit Mammakarzinomen (Kloppel *et al.* 1977), Melanomen (Ravindranath *et al.* 2003), kolorektalen Karzinomen (Perez *et al.* 2002) und Pankreas-Adenokarzinomen (Chu *et al.* 2000) gefunden. Dabei zeigte die Gesamtgangliosid-Konzentration auch einen diagnostischen und prognostischen Wert. Bei Pankreas-Adenokarzinomen korrelierte sie mit der Tumorprogression und geringer Überlebenszeit (Chu *et al.* 2000). Bei der Immuntherapie von Melanomen konnte die Gesamtgangliosid-Konzentration als Verlaufsmarker für den Therapieerfolg eingesetzt werden (Ravindranath *et al.* 2003). Anormale Gangliosidexpressionsmuster und vor allem erhöhte GD2-Konzentrationen wurden in Serum von Neuroblastom-Patienten beobachtet (Ladisch & Wu 1985; Ladisch *et al.* 1987). Dabei zeigte die Höhe der GD2-Konzentration eine Korrelation mit schnellem Tumorwachstum und geringer Überlebenszeit (Valentino *et al.* 1990). Patienten mit Retinoblastomen zeigten ebenfalls signifikant erhöhte GD2-Konzentrationen im Serum, die nach einer erfolgreichen Behandlung sanken und erst im Fall eines Rezidivs wieder anstiegen (Portoukalian *et al.* 1993). Eine Erhöhung des GD3-Gehalts wurde in Serum von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie gefunden (Merritt *et al.* 1994). GM3 und GD3 zeigten eine signifikante Erhöhung in Serum von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen und konnten dazu verwendet werden, den Erfolg des chirurgischen Eingriffs zu überprüfen (Portoukalian *et al.*

1989). Eine Abnahme der Serum-GD3-Konzentration wurde ebenfalls nach der Resektion von Hirntumoren gefunden (Radić *et al.* 2008). Dies zeigt, dass Seruminganglioside das Potential haben, qualitativ als Tumormarker oder auch quantitativ als prognostische Marker zu dienen.

Es wird angenommen, dass die Abgabe von Gangliosiden dem Tumor zusätzlich hilft, der Immunantwort zu entgehen. Die Fähigkeit des Immunsystems, entstehende Krebszellen zu erkennen und zu bekämpfen, ist sehr wichtig bei der Vermeidung von Tumor(neu)bildungen (Burnet 1970; Botti *et al.* 1998; Dunn *et al.* 2002). Die anti-Tumor-Immunantwort ist sehr komplex und häufig gegen Tumor-spezifische Antigene gerichtet. Dennoch gelingt es vielen Tumorzellen, die diese aufweisen, der Immunantwort zu entgehen. Die Abgabe von Gangliosiden vom Tumor scheint an diesem Mechanismus beteiligt zu sein (McKallip *et al.* 1999). Es wurde gezeigt, dass Ganglioside immunsuppressiv wirken. Exogene Zugabe von Gangliosiden inhibierte die Antigen-Prozessierung und -Präsentation (Ladisch *et al.* 1984; Heitger & Ladisch 1996), die Lymphozyten-Proliferation (Miller & Esselman 1975; Whisler & Yates 1980; Ladisch *et al.* 1992), die T-Helfer-Zelldifferenzierung (Shen *et al.* 2005) und die Aktivierung von Mastzellen (Jensen *et al.* 1987). Des Weiteren wurde die Differenzierung dendritischer Zellen inhibiert und deren Apoptose stimuliert (Bennaceur *et al.* 2009).

### 1.2.7 Anti-GSL Therapeutika

Aufgrund ihres Zusammenhangs mit der Tumorentwicklung und ihrer Zugänglichkeit auf der Zelloberfläche sind GSL bei der Entwicklung neuer Krebstherapeutika von wachsendem Interesse. Daher wurde eine Vielzahl von Ansätzen verfolgt, um Tumor-assoziierte GSL als Zielstrukturen in der Immuntherapie auszunutzen (Fuster & Esko 2005).

Die Immuntherapie beruht auf der Markierung von Tumorzellen mit Antikörpern, die gegen spezifisch im Tumorgewebe überexprimierte Strukturen gerichtet sind. Dabei kommt es einerseits zur Aktivierung von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), was als ADCC (engl. für *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) bezeichnet wird, und zusätzlich zur Aktivierung des Komplementsystems (CDC engl. für *complement-dependent cytotoxicity*), über die das körpereigene Immunsystem die markierten Tumorzellen angreift. Die anti-GSL-Immuntherapie hat im Wesentlichen zwei Ausprägungen: (i) passive Immuntherapie durch Injektion eines gegen ein GSL gerichteten Antikörpers und (ii) aktive Immuntherapie durch die Verabreichung von Substanzen, die eine Immunantwort des Patienten gegen Tumor-assoziierte GSL und somit gegen den Tumor auslöst bzw. verstärkt (Fuster & Esko 2005).

Immuntherapien mit Tumor-assoziierten GSL wurden unter anderem zur Behandlung von Melanomen, Neuroblastomen, Mamma- und Prostatakarzinomen in klinischen Studien untersucht. Interessanterweise konnten GSL trotz ihrer immunsuppressiven Wirkung (Kapitel 1.2.6) auch in klinischen Studien zur aktiven Immuntherapie erfolgreich verwendet werden, um anti-GSL Antikörper in den Patienten zu induzieren. Dabei wurde zur Behandlung von Melanomen ein GD2-Lacton-KLH (*keyhole limpet hemocyanin*)-Konjugat erfolgreich für die Immunisierung von Patienten in den ersten Phasen klinischer Studien eingesetzt (Ragupathi *et al.* 2003). Dieser Ansatz scheiterte jedoch in Studien der Phase III. In einem neuen Ansatz wurde GM3 in Form von sehr kleinen Proteoliposomen erfolgreich in klinische Phase I Studien angewendet (Guthmann *et al.* 2004). Proteoliposomen mit einer besonderen Form von GM3, die *N*-Glycolylneuraminsäure enthält, passierten erfolgreich klinische Phase I Studien zur Behandlung von Mammakarzinomen und Melanomen (Carr *et al.* 2003; Osorio *et al.* 2008). Mehrere klinische Studien der Phasen I und II zur Behandlung von Neuroblastom-Patienten mit gegen GD2 gerichteten Immuntherapien wurden erfolgreich abgeschlossen. Dabei wurden in passiven Therapien sowohl „nackte“ anti-GD2 Antikörper eingesetzt, als auch anti-GD2-Konjugate mit Immunmodulatoren und radioaktiv markierte anti-GD2 Antikörper, die zusätzlich zur ADCC und CDC anti-tumorale Wirkungen zeigen. Einige Präparate befinden sich in klinischen Phase III Studien (Modak & Cheung 2007). Von besonderem Interesse ist dabei der ebenfalls gegen GD2 gerichtete, chimäre Antikörper ch14.18, der in Studien der dritten klinischen Phase zur Behandlung von Hochrisiko-Neuroblastomen längere zwischenfallfreie Krankheitsverläufe und signifikant erhöhte Überlebensraten gegenüber der Standardtherapie ergab. Der eingesetzte Antikörper wurde zusammen mit GM-CSF (engl. für *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) und Interleukin 2 verabreicht, so dass neben der vermittelten ADCC eine zusätzliche Aktivierung von Immunzellen erfolgte (Yu 2009; Nature Reviews 2009).

Aus der Feststellung, dass außer Antikörpern auch Lektine an Tumor-assoziierte Oberflächenstrukturen binden, entstanden Bestrebungen, diese in einem analogen Ansatz zur Immuntherapie in der Krebstherapie einzusetzen (Mody *et al.* 1995; Puztai *et al.* 2008).

Die Gruppe der Lektine umfasst alle Proteine außer Immunglobulinen, die eine Bindungsspezifität für Kohlenhydratstrukturen besitzen, ohne diese enzymatisch umzusetzen (Gabius 2009). Der Name wurde 1954 von W.C. Boyd vorgeschlagen und leitet sich aus dem lateinischen *lectus* bzw. *legere* ab, was lesen, selektieren oder auswählen bedeutet und die spezifische Natur der Lektin-Interaktionen betonen soll (Boyd 1954).

Aufgrund ihrer Spezifität können Lektine als Föhren für anti-tumorale Wirkstoffe dienen. Es ist aber auch ein Spektrum von Lektinen mit intrinsischen zytotoxischen Eigenschaften bekannt (Barbieri *et al.* 1993). In diesem Zusammenhang wird im Folgenden auf die potenziellen Krebstherapeutika Viscumin und Shiga-Toxin eingegangen.

### 1.2.7.1 Viscumin

Viscumin, das auch als *Viscum album* Agglutinin 1 (VAA-1) oder Mistellektin 1 (ML-1) bezeichnet wird, ist ein Lektin, das aus der Weißbeerigen Mistel (*Viscum album*) isoliert wurde (Olsnes *et al.* 1982; Barbieri *et al.* 1993).

Die Mistel ist eine semiparasitäre, immergrüne Pflanze, die in Europa historisch als Heilpflanze von Bedeutung ist (Samtleben *et al.* 1999). Es ist bekannt, dass sie bereits vor über 2000 Jahren durch die Kelten angewendet wurde. In der Folgezeit diente sie zur Behandlung der verschiedensten Leiden, wie Epilepsie, Kreislaufkrankungen und Asthma (Tubef & Neckel 1923; Luther & Becker 1987). Im Rahmen der Entwicklung einer anthroposophisch-medizinische Lehre wurden 1920 fermentierte Mistelextrakte von Rudolf Steiner zur Therapie von Krebs vorgeschlagen (Steiner 1990). Die Popularität dieser unkonventionellen Form der Behandlung hat bis heute Bestand und ist wahrscheinlich auf die Unzufriedenheit mit herkömmlichen Therapieformen wie der Chemotherapie zurückzuführen (Samtleben *et al.* 1999).

Mistelextrakte haben das Interesse der modernen Medizin erregt, da *in vitro* eine toxische Wirkung auf Tumorzellen (Stirpe *et al.* 1982) und zusätzlich eine Aktivierung von Zellen des Immunsystems (Samtleben *et al.* 1999; Bocci 1993; Stauder & Kreuser 2002) beobachtet wurde. Als biologisch aktive Komponenten der Mistel wurden im Wesentlichen Viscotoxine und Lektine gefunden. Viscotoxine sind kleine Proteine mit zytotoxischer und potenziell immunmodulatorischer Aktivität (Büssing *et al.* 1998; Stein *et al.* 1999).

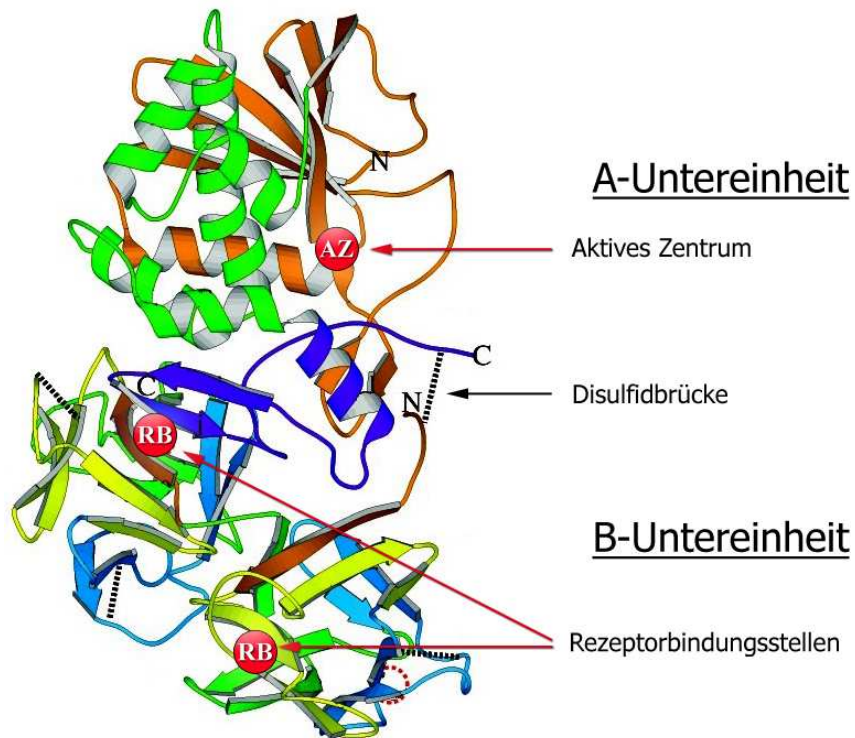
Aus der europäischen Mistel wurden neben Viscumin (ML-1) drei weitere Lektine isoliert: ML-2, ML-3 und Visalb-CBA (*Viscum album* chitin-binding agglutinin) (Franz *et al.* 1981; Franz 1986; Peumans *et al.* 1996). Es konnte aber gezeigt werden, dass vor allem der Viscumin-Gehalt wichtig für die anti-tumorale Wirkung ist (Beuth *et al.* 1995; Büssing & Schietzel 1999). Interessanterweise ist jedoch gerade in fermentierten Mistelextrakten, die von Steiner eingeföhrt wurden, kaum Viscumin enthalten (Wagner *et al.* 1986; Jäggy *et al.* 1995).

Viscumin wirkt einerseits als Immunstimulanz, wobei diese Wirkung auf die Bindung von ML-1 an Oberflächenstrukturen von Monozyten und Lymphozyten zurückgeführt wird. Dieser Prozess führt zur Ausschüttung von den Zytokinen IL-1 und IL-6 sowie TNF $\alpha$ , zudem wird die Aktivität von natürlichen Killer (NK)-Zellen und dendritischen Zellen beeinflusst (Samtleben *et al.* 1999; Thies *et al.* 2005; Hoessli & Ahmad 2008). Andererseits wirkt Viscumin über immunmodulatorische Effekte hinaus zytotoxisch und gehört zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen des Typs 2 (RIP-2) (Barbieri *et al.* 1993; Samtleben *et al.* 1999). RIP-2 sind starke Inhibitoren der eukaryotischen Proteinbiosynthese, indem sie intrazellulär als *N*-Glykosidase wirken und spezifisch eine Adenin-Seitengruppe der 28S rRNA hydrolysieren. Dies führt zu einer verminderten Affinität der ribosomalen 60S Untereinheit zu Elongationsfaktoren, eingeschränkter Proteinbiosynthese und final zur Apoptose der Zelle (Endo *et al.* 1987; Endo & Tsurugi 1987; Endo *et al.* 1988).

Die Struktur von Viscumin ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Viscumin ist ein etwa 63 kDa großes Glykoprotein. Wie alle RIP-2 besteht auch Viscumin aus einer A- und einer B-Untereinheit. Die A-Untereinheit besitzt die Ribosomen-inaktivierende *N*-Glykosidase-Aktivität und die B-Untereinheit weist Bindeaktivität für Saccharidstrukturen auf. Beide Untereinheiten sind über Disulfidbrücken zu einem Holotoxin verbunden. Viscumin liegt unter physiologischen Bedingungen als Dimer vor (Krauspenhaar *et al.* 1999).

Es wird angenommen, dass Viscumin an einen Zelloberflächenrezeptor bindet, über Endozytose aufgenommen und retrograd über den Golgi-Apparat ins Endoplasmatische Retikulum transportiert wird. Dort wird die A-Untereinheit nach reduktiver Spaltung von der B-Untereinheit ins Zytosol freigesetzt und enzymatisch aktiv (Moisenovic *et al.* 2002; Sandvig & van Deurs 2002).

Die Bindespezifität von Viscumin wird kontrovers diskutiert. Viscumin wurde ursprünglich als Galaktose-spezifisches Protein beschrieben (Ziska & Franz 1981; Franz *et al.* 1981), von Müthing und Mitarbeitern konnte aber gezeigt werden, dass Viscumin mit hoher Affinität an  $\alpha$ 2,6-sialylierte Typ 2-Glykostrukturen bindet, die auch auf Gangliosiden exprimiert werden. Die Rezeptorstruktur Neu5Ac $\alpha$ 6Gal $\beta$ 4GlcNAc-R wird auch als CD75s bezeichnet (Müthing *et al.* 2002, 2004, 2005).



**Abbildung 1.4: Struktur von Viscumin.** Die Struktur des AB-Toxins wurde über Röntgen-Kristallographie bestimmt. Die Ribosomen-inaktivierende A-Untereinheit weist ein aktives Zentrum (AZ) mit *N*-Glykosidase-Aktivität auf. Die B-Untereinheit vermittelt die Bindung an den Oberflächenrezeptor. Auf ihr wurden zwei Rezeptorbindungsstellen (RB) identifiziert (allerdings für Galaktose und Laktose). Beide Untereinheiten sind über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden. Quelle: modifiziert nach Krauspenhaar *et al.* (1999).

Es wurden viele klinische Studien zur Anwendung von Mistelextrakten in der Krebstherapie durchgeführt, von denen jedoch ein großer Teil nicht den Standards der modernen evidenzbasierten Medizin entsprach. In einigen der hochqualitativen Studien konnte jedoch eine Verbesserung der Lebensqualität und auch der Überlebensrate gezeigt werden (Horneber *et al.* 2008). Dies gilt unter anderem auch für Tumore des Gastrointestinaltrakts. So ergab eine klinische Studie der Phase II bei Patienten mit fortgeschrittenen HCC eine verbesserte Überlebensrate durch die Anwendung von Viscumin fraxini-2, einem Mistelextrakt mit hohem Lektingehalt (Mabed *et al.* 2004).

Die Anwendung von Mistelextrakten birgt jedoch ein gewisses Risiko, da die Zusammensetzung der Extrakte je nach Hersteller und in Abhängigkeit vom Wirtsbaum, der Jahreszeit der Ernte und der Verarbeitungsmethode starken Schwankungen unterliegt (Ribéreau-Gayon *et al.* 1986; Kaegi 1998). Um ein Produkt mit gleich bleibender, definierter Qualität zu gewährleisten, wurde ein rekombinanter Wirkstoff entwickelt. Das auch als rViscummin (r = rekombinant) oder Aviscummin bezeichnete rekombinante Mistellektin wird in gentechnisch veränderten *Escherichia coli*-Bakterien produziert (Eck *et al.* 1999a, 1999b;



Schöffski *et al.* 2004). Dadurch wird außerdem eine Herstellung in größeren Maßstäben als in Pflanzen möglich.

Das rViscumin weist im Gegensatz zum nativen Viscumin keine posttranslationalen Modifikationen in Form von Glykosylierungen auf, zeigt aber ein mit dem aus Pflanzen gewonnenen Lektin identisches Bindungsmuster (Müthing *et al.* 2004, 2005). Es wurde bereits erfolgreich in klinischen Phase I Studien für Gewebstumore eingesetzt (Schöffski *et al.* 2004, 2005; Bergmann *et al.* 2008).

Eine klinische Phase II Studie zum Einsatz von rViscumin gegen maligne Melanome im fortgeschrittenen Stadium wurde vor kurzem beendet (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT00658437). Die Ergebnisse stehen noch aus. Eine weitere klinische Phase II Studie wurde für chemotherapieresistente, metastasierte Kolonkarzinome angesetzt (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT00932724).

### 1.2.7.2 Shiga Toxin

Von enteropathogenen Bakterien werden Shiga Toxine, früher auch Shiga-ähnliche Toxine und Verotoxine genannt, gebildet. Dazu gehören *Shigella dysenteriae* (Serotyp 1) und verschiedene Shiga Toxin-produzierende *E. coli* Stämme (STEC). Eine Untergruppe, die beim Menschen hämorrhagische Colitis hervorruft, wird als EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) bezeichnet. Das klinische Spektrum dieser Krankheit reicht von Diarrhö bis zum lebensgefährlichen hämolytisch-uremischen Syndrom (HUS), das sich in Form von hämolytischer Anämie, Thrombocytopenie und Niereninsuffizienz manifestiert .

Shiga Toxine aus STEC werden hauptsächlich in zwei Gruppen eingeteilt, Shiga Toxin 1 (Stx1) und Shiga Toxin 2 (Stx2), wobei Stx1 und Stx2 57% und 60% Sequenzübereinstimmung in ihren Untereinheiten aufweisen (Müthing *et al.* 2009).

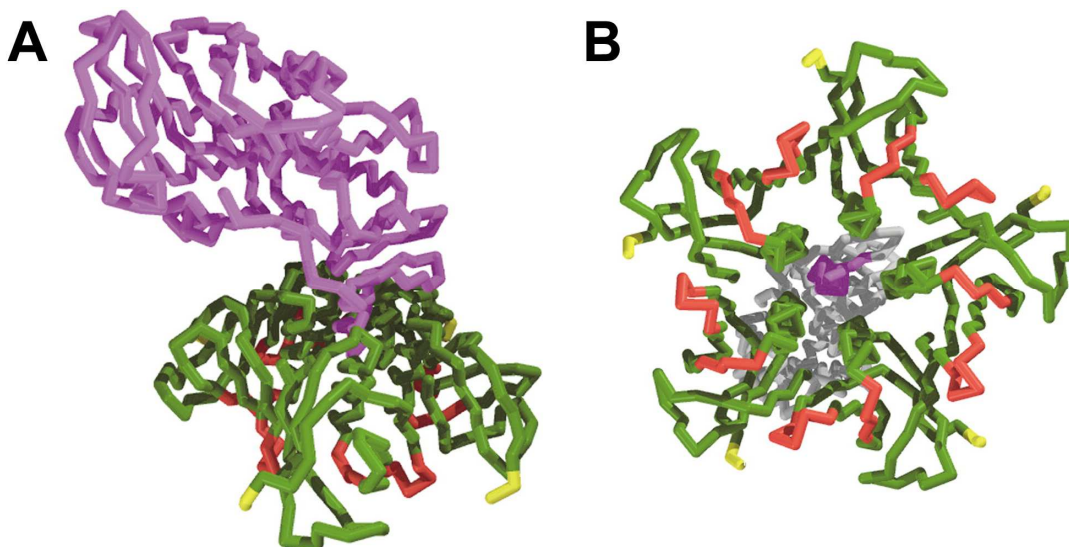
Das Stx1 zählt zu den AB<sub>5</sub>-Toxinen und besteht aus einer ~32 kDa schweren A- und fünf ~7,7 kDa schweren B-Untereinheiten (Abbildung 1.5 A und B). Die Bindung an die Zelloberfläche wird über das Pentamer der B-Untereinheiten vermittelt. Ähnlich wie Viscumin wird das Stx1-Holotoxin über Endozytose aufgenommen und in die Zelle retrograd über Endosomen und Golgi-Vesikel zum Endoplasmatischen Reticulum (ER) transportiert (Abbildung 1.5C). Hierbei findet eine proteolytische Spaltung der A-Untereinheit statt (Garred *et al.* 1995). Das daraus resultierende ~27,5 kDa schwere A<sub>1</sub>-Fragment wird nach Translokation ins Zytosol enzymatisch aktiv und wirkt auf die 28S rRNA der ribosomalen 60S Untereinheit. In Folge wird die Proteinbiosynthese der Zelle gehemmt, was zum Zelltod

führt. Ein weiterer zytotoxischer Mechanismus des Stx1, der über eine Signalkaskade zur Apoptose, dem programmierten Zelltod führt, wird ebenfalls diskutiert (Cherla *et al.* 2003).

Als Bindestruktur für Stx1 an der Zelloberfläche fungiert hauptsächlich das GSL Gb3Cer/CD77 (Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer) (Lindberg *et al.* 1987), das als „*high affinity*“-Ligand bezeichnet wird (Struktur siehe Abbildung 1.2). Daneben bindet Stx1 auch schwach an Gb4Cer (GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer), dem „*low affinity*“-Liganden (Meisen *et al.* 2005).

Gb3Cer/CD77 wird hauptsächlich auf vaskulären Endothelzellen exprimiert (Schweppe *et al.* 2008; Müthing *et al.* 2009); es wurde aber auch als Tumor-assoziierte Struktur für B-Zell-Lymphome (Murray *et al.* 1985; Oosterwijk *et al.* 1991), Ovarial- (Farkas-Himsley *et al.* 1995), Mamma- (LaCasse *et al.* 1999; Johansson *et al.* 2009), Kolon- (Kovbasnjuk *et al.* 2005; Falguières *et al.* 2008) und Pankreaskarzinome (Distler *et al.* 2009) sowie maligne Meningeome (Salhia *et al.* 2002) beschrieben.

Aufgrund seiner möglichen Bindungsspezifität an Tumorzellen und zytotoxischen Wirkung wurden Shiga Toxine bereits als Alternative für die Krebstherapie vorgeschlagen und in verschiedenen klinischen Ansätzen untersucht (Gariépy 2001; Johannes & Decaudin 2005).



**Abbildung 1.5:** Seitenansicht (A) und Aufsicht (B) der Kristallstruktur von Shiga Toxin. Die A-Untereinheit (lila) ist mit dem C-Terminus in einer von dem Pentamer der B-Untereinheiten gebildeten Pore verankert. Quelle: Gariépy (2001)

## 2 Zielsetzung

### **Tumor-assoziierte GSL in HCC**

Um eine mögliche Eignung der potenziellen Therapeutika Viscumin und Stx1 für eine Behandlung von HCC zu testen, sollte die Expression ihrer GSL-Zielstrukturen in einer Patientengruppe mit statistisch repräsentativer Stichprobengröße untersucht werden. Dazu sollte die GSL-Expression zwischen Tumor- und benachbarten Normalgeweben zur Bestimmung von Veränderungen verglichen, aber auch individuelle Variation der Expression zwischen den Patienten bestimmt werden.

Von besonderem Interesse ist dabei Gb3Cer, das im Fall einer Stx1-Therapie die Zielstruktur auf der Zelloberfläche wäre. Um eventuell Rückschlüsse auf die Hintergründe einer möglichen Tumor-assoziierten Veränderung ziehen zu können, sollten zusätzlich die in der Biosynthese vor- und nachgeschalteten Strukturen LacCer und Gb4Cer untersucht werden.

Im Fall einer Viscumin-Therapie stellen Ganglioside mit terminalen CD75s-Strukturen die Oberflächen-präsentierten Zielstrukturen dar. Die Expression von Gangliosiden mit terminalen CD75s- und iso-CD75s-Strukturen sollte analysiert werden. Weiterhing galt es, die Expression der für die Biosynthese verantwortlichen Sialyltransferasen ST6GAL1 und ST3GAL6 auf eine mögliche Verbindung mit der Ganglioside-Expression zu untersuchen.

Alle Expressionsdaten sollten statistisch ausgewertet werden. Dabei sollte auf signifikante Differenzen zwischen Normal- und Tumorgewebe aber auch auf Zusammenhänge zwischen der GSL-Expression und pathologischen Parametern getestet werden.

### **Tumor-assoziierte GSL in Serum von Magen- und Pankreaskarzinom-Patienten**

Serum-GSL von Magenkarzinom- und Pankreaskarzinom-Patienten sollten auf Strukturen mit einem möglichen Nutzen für die Erkennung und Beurteilung ihrer Erkrankungen untersucht werden. In diesem Zusammenhang galt es eine Extraktionsmethode für Serum-GSL zu entwickeln, die auf kleine Probenvolumina und auf Stichproben mit großem Umfang anwendbar sein sollte. Die GSL sollten in einer Reinheit präpariert werden, die eine Charakterisierung über DC-Overlay-Assay- und MS-Methoden erlaubt. Es sind dabei Methoden, die potenziell Tumor-assoziierte Modifikationen der Glykane zerstören, zu vermeiden. Insofern galt es, auf eine milde alkalische Hydrolyse und Derivatisierungen zu verzichten und eine Analyse nativer GSL anzustreben. Die Methode sollte zudem eine effiziente Extraktion von hoch komplexen und polaren Gangliosiden ermöglichen.

Es galt weiterhin einen DC-Overlay-Assay für die Analyse von Serumgangliosiden zu entwickeln, um damit Serumproben von Magen- und Pankreaskarzinom-Patienten einschließlich einer Kontrollgruppe auf Ganglioside mit möglichem diagnostischen Nutzen zu untersuchen. Die detektierten Serumganglioside galt es zudem mit massenspektrometrischen Techniken zu charakterisieren. Der Datensatz der Serumgangliosidkonzentrationen sollte durch statistische Tests auf signifikante Differenzen zwischen den Gruppen und auch auf Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen und pathologischen Parametern ausgewertet werden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Chemikalien**

In der vorliegenden Arbeit wurden Chemikalien der Firmen Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Riedel-de Haën AG (Seelze), Röhm GmbH + Co.KG (Darmstadt), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA) verwendet. Alle eingesetzten Chemikalien hatten *pro analysis* (p.a.)-Qualität. Die organischen Lösungsmittel Chloroform und Methanol (Merck KGaA, Darmstadt) wurden vor Gebrauch destilliert. Das Chloroform wurde durch Zugabe geringer Mengen Methanol stabilisiert. Milli Q-Reinstwasser wurde mit dem Synergy UV-System (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) hergestellt.

### **3.2 Probenmaterial**

#### **3.2.1 Gewebeproben**

Gewebeproben wurden von Prof. Dr. Norbert Senninger und Prof. Dr. Jörg Haier aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster sowie von PD Dr. Christian Pilarsky, PD Dr. Robert Grützmann und Dr. Axel Denz aus der Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Dresden zur Verfügung gestellt. Sie wurden von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen entnommen, die einem chirurgischen Eingriff unterzogen wurden. Von jedem Patienten lagen Proben des Tumorgewebes und des normalen Lebergewebes vor, das in einem Abstand von min. 5 cm zum Primärtumor entnommen wurde. Die Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme schockgefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Eine Liste der verwendeten Gewebeproben mit klinischen Daten ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Aufgrund mangelnder Probenmengen, RNA-Extrakten mit zu niedriger Qualität oder Verdrängungseffekten bei der Dünnschichtchromatographie konnten nicht alle Patienten in die Auswertung aller Experimente einbezogen werden. Eine Aufschlüsselung, welche Patienten Messdaten für die Einzelnen Experimente verwendet wurden, ist in Tabelle 8.1 gegeben.

**Tabelle 3.1: Klinische Daten der untersuchten HCC-Patienten.**

Patient Nr. <sup>a</sup>	pT <sup>b</sup>	pN <sup>b</sup>	pM <sup>b</sup>	G <sup>c</sup>	Zirrhose	Gewebegewicht [mg]	
						Tumor	Normal
1	3	0	0	2-3	ja	46,2	47,8
2	2	x	0	2	nein	98,5	62,4
3	1	0	0	2-3	ja	51,7	56,3
4	3	1	1	2	nein	69,2	138,9
5	4	0	1	3	nein	46,1	263,7
6	3	0	0	3	nein	111,1	126,9
7	3	0	0	2	nein	73,5	148,5
8	3	x	x	3	ja	188,0	84,8
9	3	0	0	2	nein	132,9	232,7
10	3	0	1	x	nein	44,4	226,1
11	1	1	0	1	nein	119,1	118,1
12	3	0	0	2	nein	294,2	245,0
13	x	x	x	x	nein	4,3	2,9
14	2	x	0	1	nein	54,6	40,3
15	x	x	x	x	nein	10,1	20,9
16	x	x	x	x	nein	16,1	1,2
17	x	x	x	x	nein	13,6	12,6
18	3	x	0	2	nein	4,8	2,3
19	x	x	x	x	nein	9,3	24,9
20	2	x	0	2	beginnend	12,9	7,1
21	x	x	x	2	nein	5,2	13,0
22	x	x	x	x	nein	15,2	4,4
23	2	x	0	1	nein	60,5	47,0
24	1	x	0	2	ja	35,4	114,0
25	1	x	0	2	ja	46,9	11,2
26	3	x	0	2	beginnend	189,5	59,5
27	1	x	0	2	beginnend	108,9	62,4
28	1	x	0	1	ja	34,8	46,0
29	1	x	0	1	ja	50,3	30,5
30	2	x	0	2	beginnend	19,8	17,8
31	1	x	0	3	ja	29,7	112,8
32	2	x	0	2	ja	49,6	34,4
33	1	x	0	1	nein	22,2	45,8
34	1	x	0	2	nein	74,4	53,6
35	2	x	0	3	ja	43,5	20,4
36	3	x	0	3	ja	12,7	34,2
37	1	x	0	2	ja	68,0	89,7

<sup>a</sup> fortlaufende Nummerierung der Patienten innerhalb der vorliegenden Arbeit

<sup>b</sup> Einteilung nach TNM-System der UICC (siehe auch Tabelle 1.1); das Präfix „p“ kennzeichnet Werte, die auf postoperativen, pathologischen Befunden beruhen

<sup>c</sup> Einteilung des Differenzierungsgrades nach WHO-Kriterien (Hamilton & Aaltonen 2000): G1, gut differenziert; G2, mäßig differenziert; G3, gering differenziert

### 3.2.2 Serumproben

Serumproben wurden über das EU-GLYFDIS-Projekt von RNTech (Heudebouville, Frankreich) bezogen.

Es wurden Serumproben aus drei Patienten-Kollektiven untersucht. In Patienten des ersten Kollektivs (N = 40) wurden Pankreasadenokarzinome diagnostiziert und in denen des zweiten Kollektivs (N = 40) Magenkarzinome. Die Patienten der dritten Gruppe zeigten keine Krebserkrankung und dienten als Vergleichsgruppe (N = 20). Den an Krebs erkrankten Patienten wurde das Blut präoperativ entnommen und anschließend das Serum gewonnen. In Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 sind die klinischen Daten der einzelnen Krebspatienten aufgelistet. Daten über die Patienten der Vergleichsgruppe finden sich in Tabelle 3.4. Die Serumproben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert.

Tabelle 3.2: Klinische Daten der Pankreasadenokarzinom-Patienten (N = 40).

Patient Nr. <sup>a</sup>	Code	Alter	Geschlecht <sup>b</sup>	pT <sup>c</sup>	pN <sup>c</sup>	pM <sup>c</sup>	UICC-Stadium <sup>c</sup>	G
38	GD01/1-01	60	M	3	0	0	IIA	2
39	GD01/1-02	69	W	3	0	0	IIA	2
40	GD01/1-03	58	M	1	1	0	IIB	1
41	GD01/1-04	72	W	3	0	1	IV	1
42	GD01/1-05	64	W	1	1	0	IIB	1
43	GD01/1-06	56	W	2	0	0	IB	1
44	GD01/1-07	59	W	1	1	1	IV	1
45	GD01/1-25	59	W	3	0	0	IIA	2
46	GD01/1-26	74	M	2	0	0	IB	1
47	GD01/1-08	77	M	2	0	0	IB	2
48	GD01/1-09	69	W	3	1	0	IIB	1
49	GD01/1-10	55	M	1	1	0	IIB	1
50	GD01/1-11	52	W	2	0	0	IB	2
51	GD01/1-12	75	M	2	0	0	IB	1
52	GD01/1-13	64	M	2	0	0	IB	3
53	GD01/1-14	61	W	2	1	0	IIB	2
54	GD01/1-15	46	M	2	1	0	IIB	2
55	GD01/1-16	66	W	1	1	0	IIB	1-2
56	GD01/1-17	54	W	2	1	1	IV	1
57	GD01/1-27	52	W	2	1	0	IIB	1
58	GD01/1-18	62	W	2	1	0	IIB	1
59	GD01/1-19	65	M	3	0	0	IIA	1
60	GD01/1-20	67	M	2	1	0	IIB	1
61	GD01/1-21	57	M	2	1	1	IV	1
62	GD01/1-28	67	W	2	1	0	IIB	1
63	GD01/1-22	53	M	2	1	0	IIB	1-2
64	GD01/1-23	64	W	1	0	0	IA	1
65	GD01/1-24	70	W	2	1	0	IIB	1
66	GD01/1-29	73	W	3	1	0	IIB	1
67	GD01/1-30	52	M	3	0	0	IIA	1
68	GD01/1-31	45	M	2	0	0	IB	1
69	GD01/1-32	67	W	4	0	0	III	1
70	GD01/1-33	57	W	2	1	0	IIB	1
71	GD01/1-34	64	M	2	0	0	IB	1-2
72	GD01/1-35	50	W	2	1	0	IIB	1
73	GD01/1-36	64	W	3	0	0	IIA	1
74	GD01/1-37	58	M	1	0	0	IA	1
75	GD01/1-38	72	M	2	0	0	IB	1-2
76	GD01/1-39	56	M	2	0	0	IB	1-2
77	GD01/1-40	56	M	2	1	1	IV	1

<sup>a</sup> fortlaufende Nummerierung der Patienten innerhalb der vorliegenden Arbeit

<sup>b</sup> M: männlich; W: weiblich

<sup>c</sup> Einteilung nach dem UICC-Klassifikationssystem (vgl. Tabelle 1.4); das Präfix „p“ kennzeichnet Werte, die auf postoperativen, pathologischen Befunden beruhen



**Tabelle 3.3: Klinische Daten der Magenkarzinom-Patienten (N = 40).**

Patient Nr. <sup>a</sup>	Code	Alter	Geschlecht <sup>b</sup>	pT <sup>c</sup>	pN <sup>c</sup>	pM <sup>c</sup>	UICC-Stadium <sup>c</sup>	G
78	GD01/2-01	68	M	3	1	0	IIIA	3
79	GD01/2-02	63	M	3	2	0	IIIB	2
80	GD01/2-03	69	M	2b	1	0	II	2
81	GD01/2-04	69	M	2b	1	0	II	1
82	GD01/2-05	63	W	2a	1	0	II	2
83	GD01/2-06	61	M	2b	1	0	II	3
84	GD01/2-07	65	W	2a	1	1	II	2
85	GD01/2-08	62	M	2a	2	0	IIIA	2
86	GD01/2-09	59	M	4	2	0	IV	1
87	GD01/2-10	73	M	2a	0	0	IB	3
88	GD01/2-11	60	M	2b	2	0	IIIA	3
89	GD01/2-12	61	M	2b	1	0	II	2
90	GD01/2-13	72	M	2b	2	0	IIIA	2
91	GD01/2-14	66	M	2b	2	0	IIIA	1
92	GD01/2-15	68	W	2b	1	0	II	3
93	GD01/2-16	63	M	2b	1	0	II	2
94	GD01/2-17	75	W	2b	2	0	IIIA	2
95	GD01/2-18	63	M	2b	0	0	IB	1
96	GD01/2-19	55	M	2a	0	0	IB	2
97	GD01/2-20	64	W	2b	2	1	IIIA	3
98	GD01/2-21	70	W	2a	1	0	II	2
99	GD01/2-22	58	M	4	2	0	IV	2
100	GD01/2-23	70	W	3	2	0	IIIB	1
101	GD01/2-24	67	M	2a	0	0	IB	3
102	GD01/2-25	65	M	3	3	0	IV	2-3
103	GD01/2-26	65	M	2b	0	0	IB	2
104	GD01/2-27	74	M	2b	2	0	IIIA	2-3
105	GD01/2-28	75	W	2b	1	0	II	2
106	GD01/2-29	63	M	2b	1	0	II	2
107	GD01/2-30	66	W	2a	1	0	II	1-2
108	GD01/2-31	66	W	2b	1	0	II	3
109	GD01/2-32	59	M	2a	2	0	IIIA	1-2
110	GD01/2-33	74	M	2b	0	0	IB	1-2
111	GD01/2-34	71	M	2b	1	0	II	2
112	GD01/2-35	73	M	2b	1	0	II	2-3
113	GD01/2-36	77	W	2a	1	0	II	2
114	GD01/2-37	66	M	2b	1	1	II	1-2
115	GD01/2-38	66	W	4	1	0	IIIB	1
116	GD01/2-39	75	M	2a	0	0	IB	1
117	GD01/2-40	62	M	2	1	0	II	2-3

<sup>a</sup> fortlaufende Nummerierung der Patienten innerhalb der vorliegenden Arbeit

<sup>b</sup> M: männlich; W: weiblich

<sup>c</sup> die Einteilung der nach dem UICC-Klassifikationssystem (vgl. Tabelle 1.2); das Präfix „p“ kennzeichnet Werte, die auf postoperativen, pathologischen Befunden beruhen

**Tabelle 3.4: Daten der Krebs-freien Vergleichsgruppe (N = 20).**

Patient Nr. <sup>a</sup>	IMPB-Code	Alter	Geschlecht
118	GD01/3-01	65	W
119	GD01/3-02	68	M
120	GD01/3-03	75	M
121	GD01/3-04	58	M
122	GD01/3-05	56	M
123	GD01/3-06	65	M
124	GD01/3-07	66	W
125	GD01/3-08	66	M
126	GD01/3-09	66	M
127	GD01/3-10	70	M
128	GD01/3-11	69	W
129	GD01/3-12	67	W
130	GD01/3-13	76	M
131	GD01/3-14	67	W
132	GD01/3-15	71	W
133	GD01/3-16	70	W
134	GD01/3-17	69	M
135	GD01/3-18	73	W
136	GD01/3-19	65	M
137	GD01/3-20	72	W

<sup>a</sup> fortlaufende Nummerierung der Patienten innerhalb der vorliegenden Arbeit

### 3.3 Glykosphingolipidanalytik

Für die Expressionsanalyse werden GSL mit organischen Lösungsmitteln aus biologischen Proben extrahiert. In den Extrakten liegen GSL häufig in sehr komplexen Mischungen vor, in denen sie sich sowohl aufgrund ihrer Glykan- als auch Lipidstrukturen unterscheiden. Zur Analyse solcher Gemische werden vielfältige Techniken eingesetzt. Mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie, Overlay-Assay und massenspektrometrischen Methoden kann sowohl die Struktur einzelner GSL als auch deren Expressionsniveau bestimmt werden.

#### 3.3.1 Extraktion und Reinigung von GSL aus Gewebe

Die Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Skalpells auf einer auf -20 °C vorgekühlten Glasplatte zerkleinert und in ein Schraubdeckelröhrchen aus Glas mit Teflon-Dichtung überführt (Pyrex, Staffordshire, England). Die GSL wurden in einem dreistufigen Prozess extrahiert, in dem Chloroform und Methanol in verschiedenen Mischverhältnissen eingesetzt wurden. Zuerst wurde das Gewebe nach Zugabe von 2 ml Chloroform/Methanol (1/2) mit

einem Homogenisator (Polytron PT 1200, Kinematica AG, Littau, Schweiz, Spitzentyp PT-DA 1205/2 und PT-DA 1207/2) 2 min lang zerkleinert und dann 1 min lang mit einem Vortex Genie 2 (Bender & Hohbein AG, Zürich, Schweiz) gemischt. Um kein Probenmaterial zu verlieren, wurde die Spitze des Homogenisators anschließend in 2 ml des Lösungsmittelgemisches gesäubert, welches anschließend 1 min lang gemischt und dann mit dem ersten Homogenisat vereinigt wurde. Dieses wurde 5 min lang mit Ultraschall behandelt und dann 2 min lang bei 1400 x g abzentrifugiert (Hettich Universal, Rotor 1323, Bäch, Schweiz). Der Überstand wurde in einen Spitzkolben überführt und das Sediment durch 1-minütiges Mischen und eine 5-minütige Ultraschallbehandlung in 4 ml Chloroform/Methanol (1/1) (v/v) resuspendiert. Das Gemisch wurde erneut zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten Extrakt vereinigt. Ein dritter Extraktionsschritt mit Chloroform/Methanol (2/1) (v/v) wurde nach dem gleichen Schema durchgeführt. Die Lösungsmittel der vereinten Extrakte wurden in einem Rotationsverdampfer (Heidolph VV 2001, Kehlheim) bei 37 °C und 210 rpm abgezogen.

### 3.3.2 Herstellung von GSL-Extrakten

Neben GSL befinden sich auch verschiedene Esterlipide, die bei weiteren Analysen stören, im erhaltenen Extrakt. Diese wurden durch alkalische Hydrolyse verseift.

Dazu wurde der Rückstand des Extraktes in 4 ml 1 M NaOH gelöst, bei 37 °C unter Bewegung inkubiert und nach 1 h mit 400 µl 10 M HCl neutralisiert.

Durch Dialyse gegen deionisiertes Wasser wurden sowohl niedermolekulare Substanzen als auch Salze entfernt. Anschließend wurde der neutralisierte Ansatz in einem Dialysemembranschlauch (Medicell Int. Ltd., London, England) mit einem *cut-off* von 12 kDa bis 14 kDa gegeben und gegen je 5 l deionisiertes Wasser 2 d lang bei 4 °C unter leichtem Rühren dialysiert. Das Wasser wurde 2-mal täglich gewechselt.

Das Retentat wurde anschließend im Rotationsverdampfer eingedampft. Dieser Rohextrakt wurde in definierten Volumina Chloroform/Methanol (2/1) (v/v) aufgenommen und für die folgenden Analysen bei -20 °C gelagert.

### 3.3.3 Extraktion und Reinigung von GSL aus Serumproben

Humane Serumproben mit Volumina von 300 µl wurden in Glasprobenröhrchen (Flasche G 1, Artikel Nr. 300101, CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) mit Lochkappen eingefroren. Die Lochkappen wurden mit Glasfaserfiltern (Typ 691, 1,6 µm Porengröße, VWR, Darmstadt) ausgestattet, um bei der folgenden Lyophilisation über Nacht

Kreuzkontaminationen zu verhindern. In den darauf folgenden Schritten wurden Kappen mit PTFE-Dichtungen verwendet. Zur Extraktion von Lipiden wurden die Lyophilisate mit 1,3 ml eines Lösungsmittelgemischs bestehend aus Chloroform/Methanol/Wasser (30/60/8) (v/v/v) versehen, intensiv vermischt, für 30 min im Ultraschallbad inkubiert und anschließend bei 1900 x g für 4 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Sediment einem zweiten analogen Extraktionsschritt unterzogen. Die vereinten Überstände aus den Extraktionen wurden im Stickstoffstrom bei 37 °C eingedampft.

### **Phospholipase C (PLC)-Verdau**

Phospholipide liegen im Vergleich zu GSL in hohem Überschuss in humanem Serum vor und müssen für eine zuverlässige GSL-Analyse entfernt oder zumindest abgereichert werden. Phospholipide stören sowohl bei der Dünnschichtchromatographie, wo sie durch Überladungs- und Verdrängungseffekte die Trennleistung und Zuverlässigkeit des Verfahrens herabsetzen, als auch bei der Massenspektrometrie, wo sie die Ionisation anderer in geringeren Konzentrationen vorliegenden Substanzen unterdrücken (Shen *et al.* 2005; Johanson *et al.* 2007).

Zur spezifischen Abreicherung von Phospholipiden wurden die gewonnenen Lipidhextrakte einem PLC-Verdau unterzogen. PLC spaltet die Phosphatesterbindung zwischen dem Glycerin und dem Phosphat, wobei Diacylglycerin und die polare Kopfgruppe des Phospholipids frei werden. Diese lassen sich im Folgenden von den GSL trennen.

#### Material:

PLC-Reaktionspuffer	40 mM Tris 40 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,5
PLC-Stammlösung	50 U/ml (aus <i>Bacillus cereus</i> , Sigma, Saint Louis, MO, USA)

#### Durchführung:

Für den Verdau wurden die getrockneten Extrakte mit 400 µl Milli Q versetzt und durch Ultraschallbehandlung emulgiert. Danach wurden 150 µl Reaktionspuffer mit 40 mM Tris (pH 7,5) und 40 mM CaCl<sub>2</sub> sowie 50 µl Enzymstammlösung bzw. 2,5 U PLC hinzugegeben.

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 16 h in einem Wasserbadschüttler inkubiert. Dabei setzt nach Definition 1 U Phospholipase C 1 µmol wasserlösliche Phosphorverbindungen von L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin pro min bei pH 7,3 und 37 °C frei.

### **Festphasenextraktion**

Die Festphasenextraktion (SPE, engl. *solid phase extraction*) wurde mit einem modifizierten VacElut-System (Baxter Healthcare Corp., Muskegon, MI, USA) durchgeführt, das die parallele Bearbeitung von bis zu 12 Proben ermöglicht.

Alle Teile, die mit der Probe und den verwendeten Lösungsmitteln in Kontakt kamen waren entweder aus Stahl, Glas oder PTFE, um Resistenz gegenüber (halogenierten) Lösungsmitteln, wie Chloroform, zu gewährleisten und die Kontamination der Probe durch Weichmacher und andere Substanzen aus Kunststoffmaterialien zu vermeiden.

Säulen für die SPE wurden in Hülsen von Glasspritzen (Fortuna Optima Ganzglasspritzen, 1 ml, 6 mm Innendurchmesser, Poulten und Graf, Wertheim) gepackt, die mit zwei Lagen Glasfaserfiltern (Typ 691, 1,6 µm Porengröße, VWR, Darmstadt) als Bodenfritte versehen wurden. Über das Luer-Stecksystem wurden die Spritzenhülsen auf Teflon-Ventile mit Stahlkanüle aufgesetzt und im VacElut-System fixiert. Über die Ventile wurde der Fluss der Elutionsmittel kontrolliert.

### **Umkehrphasen-SPE**

Umkehrphasenmaterial besteht meist aus modifiziertem Silika, dessen Oberfläche derart verändert wurde, dass sie anstatt polarer hauptsächlich unpolare Eigenschaften besitzt. Durch Modifikation der polaren Silanolgruppen und die Einführung von aliphatischen Gruppen, wie Octadecyl- oder Octylgruppen, werden die Eigenschaften der stationären Phase demnach „umgekehrt“.

Zur Abreicherung von niedermolekularen Salzen und neutralen Lipiden, wie Tri- und Diacylglycerinen, die die GSL-Analyse beeinträchtigen, wurden die verdauten Lipidextrakte über Umkehrphasenmaterial gereinigt. Eine Bindung von Analyten an die Festphase erfolgt entsprechend über hydrophobe Wechselwirkungen, welche bei niedermolekularen Salzen am geringsten und bei neutralen Lipiden am stärksten ausgeprägt sind. Relativ polare Lipide wie GSL binden, wenn sie in einem polaren Lösungsmittel aufgetragen werden, im Gegensatz zu Salzen an die Umkehrphase und können durch eine sukzessive Erhöhung der eluotropen Stärke der mobilen Phase noch vor den neutralen Lipiden (Triacylglyceride) eluiert werden.

Durchführung:

Für die Umkehrphasen-SPE wurde das modifizierte VacElut-System verwendet und Säulen mit 100 mg Sep-Pak C18 Material (Waters, Milford, MA, USA) gepackt (Bettvolumen 250  $\mu$ l).

Die einzelnen Arbeitsschritte der Umkehrphasen-SPE sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Kurz vor dem Auftragen wurden die PLC-verdauten Proben kurz mit Ultraschall behandelt und dann direkt aufgetragen. Der Durchlauf des Probenauftrags wurde im ursprünglichen Probengefäß aufgefangen und anschließend noch zweimal, jeweils nach kurzer Ultraschallbehandlung, rezykliert, um eine maximale Bindung aller Lipide sicherzustellen und Verluste gering zu halten.

In einem Waschschritt mit Wasser wurden Salze, die aus dem Serum koextrahiert oder zum PLC-Verdau hinzugegeben wurden, entfernt. Mit Methanol wurden hauptsächlich polare Lipide eluiert, während die Mehrheit der neutralen Lipide, d.h. Triacylglycerine, Diacylglycerine, Cholesterin und dessen Ester, auf der Säule verblieben. Die Methanol-Fraktion wurde im Stickstoffverdampfer bei 37 °C getrocknet.

**Tabelle 3.5: Arbeitsschritte der Festphasenextraktion von GSL mit Sep-Pak C18 Material.**

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Volumen</b>	<b>Lösungsmittel</b>
Konditionieren	1,5 ml	Chloroform
	1,5 ml	Chloroform/Methanol (2/1) (v/v)
	1,5 ml	Methanol
	1,5 ml	Milli Q
Probenauftrag	0,6 ml (2x rezyklieren)	wässriger Puffer
Waschen	1,5 ml	Milli Q
Elution	0,75 ml	Methanol

**Normalphasen-SPE**

Bei der Normalphasen-SPE erfolgt eine Interaktion mit der stationären Phase über polare Wechselwirkungen, z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und induzierte Dipole sowie  $\pi$ -Komplexbindungen (Gey 1998).

Durch die Normalphasen-SPE wurde eine Beseitigung verbliebener Reste von unpolaren Lipiden und eine Fraktionierung von den polaren Lipiden erreicht. Dafür wurde das modifizierte VacElut-System verwendet und Säulen mit je 100 mg Iatrobeads 6RS-8060

(Porengröße 80 Å, Partikelgröße 60 µm, Macherey-Nagel, Düren) als stationäre Phase gepackt (Säulenbettvolumen 200 µl).

Alle Arbeitsschritte der Normalphasentrennung sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Dabei wurde das über Umkehrphasen-SPE entsalztes Lipidgemisch in Chloroform aufgenommen und aufgetragen. Wie zuvor bei der Umkehrphasen-SPE wurde beim Probenauftrag der Durchlauf im ursprünglichen Gefäß aufgefangen und nach kurzer Ultraschallbehandlung erneut aufgetragen. Dieser Vorgang wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Neutrale Lipide wurden in zwei Waschschrritten mit Chloroform und Chloroform/Methanol (9/1) (v/v) eluiert. Danach erfolgte die Fraktionierung der polaren Lipide mit einem Stufengradienten (siehe Tabelle 3.6). Die erhaltenen Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 3.6: Arbeitsschritte zur Fraktionierung von GSL auf Iatrobeads-Säulen.**

Arbeitsschritt	Volumen	Lösungsmittel	Eluat
Konditionieren	1,2 ml	Chloroform	
	1,2 ml	Chloroform/Methanol (1/1) (v/v)	
	1,2 ml	Methanol	
	1,2 ml	Chloroform	
Probenauftrag	0,6 ml (2x rezyklieren)	Chloroform	
Waschen	0,6 ml	Chloroform	
Waschen	0,6 ml	Chloroform/Methanol (9/1) (v/v)	
Elution	0,6 ml	Chloroform/Methanol (2/1) (v/v)	E1
Elution	0,6 ml	Chloroform/Methanol (1/2) (v/v)	E2
Elution	0,6 ml	Chloroform/Methanol (1/4) (v/v)	E3
Elution	0,6 ml	Methanol	E4
Elution	0,6 ml	Methanol/Wasser (4/1) (v/v)	E5

### 3.4 Dünnschichtchromatographie

Wie andere Trenntechniken beruht auch die Dünnschichtchromatographie (DC) auf der unterschiedlichen Affinität der Komponenten einer Mischung zu zwei sich nicht mischenden Phasen, der mobilen und der stationären Phase. Bei der DC ist die stationäre Phase als dünne Schicht auf einer Trägerfolie bzw. einer Glasplatte aufgebracht. Als mobile Phase werden je nach stationärer Phase und je nach Eigenschaft der zu trennenden Analyten meist organische Lösungsmittel eingesetzt.

Für eine Trennung mittels DC wird das Probengemisch zunächst auf einem definierten Bereich am unteren Teil der DC-Platte aufgetragen. Diese wird dann in einen Chromatographietank mit einem Laufmittel gestellt, so dass der Bereich unterhalb der Auftragszone in das Laufmittel eintaucht. Dieses steigt über Kapillarkräfte in der porösen stationären Phase hoch und transportiert als mobile Phase die Komponenten aus der Auftragszone in Richtung des oberen Rands der DC-Platte. Dabei werden die jeweiligen Komponenten der Mischung aufgetrennt. Je stärker die Interaktion einer Komponente mit der stationären Phase, umso geringer ist ihre Mobilität und Laufhöhe. Ein substanzspezifischer Wert ist der Retentionsfaktor, der sich aus dem Quotienten der von der Substanz und der Laufmittelfront zurückgelegten Strecke, gemessen ab der Auftragszone, ergibt.

Nach einer definierten Laufzeit, oder wenn die Lösungsmittelfront eine definierte Höhe erreicht hat, wird die „entwickelte“ Platte dem Tank entnommen. Im Idealfall liegen die einzelnen Komponenten des Gemisches örtlich getrennt entlang der Laufrichtung auf der Platte vor.

Bei der Hochleistungsdünnschichtchromatographie weisen die Partikel der stationären Phase Durchmesser von ca. 5  $\mu\text{m}$  und eine besonders geringe Größenverteilung auf. Hierbei werden durch eine homogenere Matrix effizientere Trennungen sowie eine höhere Auflösung erreicht (Reich & Schibli 2007).

Für die GSL Analytik wird meist Silika als polare stationäre Phase mit Chloroform/Methanol/Wasser-Gemischen als Laufmittel eingesetzt. Die Trennung der GSL erfolgt in erster Linie aufgrund ihrer Glykostruktur und in zweiter Linie aufgrund ihres Ceramidanteils. Komplexe, sehr polare GSL interagieren aufgrund ihres hydrophilen Charakters stärker mit der Silika-Festphase und weisen eine geringe Mobilität im Vergleich zu GSL mit einfachen Glykanen auf. Auch die Konfiguration des Glykans hat einen Einfluss auf die Trennung, so dass auch isomere Strukturen, z.B.  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-sialylierte GSL, mittels DC getrennt werden können (Müthing 1996).

Nach erfolgter Trennung mittels DC können Substanzen mit Hilfe von Färbereagenzien auf den Platten nachgewiesen werden. Zum Nachweis von GSL stehen Reagenzien verschiedener Sensitivität und Spezifität zur Verfügung. Orcin weist allgemein Zuckerstrukturen nach und färbt somit alle Glykolipide. Die Färbung ist jedoch destruktiv, so dass die Analyten nicht mehr für weitere Analysen zur Verfügung stehen.



Laufmittel:

**LM1:** Laufmittel für neutrale GSL:

Chloroform/Methanol/Wasser (120/70/17) (v/v/v) + (20 mg CaCl<sub>2</sub> / 100 ml)

**LM2:** Laufmittel für Ganglioside:

Chloroform/Methanol/Wasser (120/85/20) (v/v/v) + (20 mg CaCl<sub>2</sub> / 100 ml)

**LM3:** Laufmittel für hoch polare Ganglioside:

Chloroform/Methanol/Wasser (50/47/14) (v/v/v) + (20 mg CaCl<sub>2</sub> / 100 ml)

GSL-Referenzen:

Neutrale GSL aus humanen Erythrozyten

Referenz: JM10/80

Konzentration nach Einwaage: 5 µg/µl

Hauptkomponenten: MHC, LacCer, Gb3Cer, Gb4Cer

Ganglioside aus humanen Granulozyten:

Referenz: JM07/7-1

Konzentration nach Einwaage: 2 µg/µl

Hauptkomponenten: GM3, IV<sup>3</sup>nLc4Cer, IV<sup>6</sup>nLc4Cer, VI<sup>3</sup>nLc6Cer, VI<sup>6</sup>nLc6Cer

Ganglioside aus humanen Granulozyten (polare Fraktion):

Referenz: JM07/7-3

Konzentration nach Einwaage: 5 µg/µl

Hauptkomponenten: IV<sup>3</sup>nLc4Cer, IV<sup>6</sup>nLc4Cer, VI<sup>3</sup>nLc6Cer, VI<sup>6</sup>nLc6Cer, monosialylierte Ganglioside mit nLc8- und nLc10-Grundstruktur sowie unterschiedlichem Fukosylierungsgrad

#### Durchführung:

Mit Kieselgel 60 vorbeschichtete DC-Platten (Merck, Darmstadt, 10 cm x 10 cm, Schichtdicke 0,2 mm, Nr. 1.05633.0001) wurden vor dem Gebrauch 45 min lang bei 110 °C inkubiert, um restliche Feuchtigkeit zu entfernen und gleich bleibende Leistung während der Chromatographie zu gewährleisten. Die derart aktivierten Platten wurden in einem Exsikkator gelagert, der zudem noch Phosphorpentoxid (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) enthielt, um eine trockene Atmosphäre aufrecht zu erhalten.

GSL-Proben wurden mit einem Linomat IV-Applikator (CAMAG, Muttenz, Schweiz) auf die DC-Platten gesprüht. Dadurch wurden kompakte und gleichmäßige Probenauftragszonen erzielt, die eine hohe Auflösung bei der DC ermöglichen. Für den Vergleich der GSL-Expression in Gewebeproben wurden die Lipidextrakte entsprechend einer konstanten Gewebemasse und für den Vergleich der GSL-Expression in Serum entsprechend konstanter Serumvolumina aufgetragen.

Bei der DC von Rohlipidextrakten aus Gewebeproben wurde ein Chloroform-Vorlauf durchgeführt, d.h. die Platten wurden nach der Probenapplikation in einem kleinen Chromatographie-Tank (Innenmaße 6 x 11 x 13 cm, Desaga GmbH, Heidelberg) mit 40 ml Chloroform für 30 min chromatographiert. Unpolare Lipide wurden vom Laufmittel an das obere Plattenende transportiert, während die GSL in der Auftragszone verblieben. Nach Trocknung der Platten in einem Exsikkator unter Vakuum für 10 min erfolgte die Auftrennung der polaren Lipide mit einem GSL-Laufmittel. Der Chloroform-Vorlauf verringerte die Menge an Matrixsubstanzen in der Auftragszone und ermöglichte im Folgenden höhere Trennleistungen.

Die chromatographische Trennung von GSL erfolgte in großen Chromatographie-Tanks (Innenmaße 8 x 21 x 22 cm, Desaga GmbH, Heidelberg), die mit 100 ml Laufmittel befüllt waren. Die Tanks wurden mit Filterpapier (Chromatography Paper, 3MM Chr, Whatman International Ltd., Maidstone, England) ausgekleidet und vor dem ersten Lauf mindestens 3 h ruhen gelassen, um eine optimale Sättigung der Gasphase und somit konstante Bedingungen zu erzielen. Die Laufzeiten richteten sich nach den verwendeten Laufmitteln (LM1 und LM2 20 min, LM3 25 min).

### 3.4.1 Orcin-Färbung

Material:

Orcin-Lösung: 0,3% Orcin in 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Durchführung:

Die DC-Platten wurden nach dem Lauf 5 min lang in einem Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Danach wurden sie für 15 s in Orcin-Lösung getaucht und anschließend zu Farbentwicklung bei 100 °C auf einem TLC Plate Heater III (CAMAG, Muttenz, Schweiz) inkubiert. Die erhaltenen violett-braun gefärbten GSL-Banden wurden mit Hilfe eines Densitometers ausgewertet (Kapitel 3.5.5).

### 3.5 Overlay-Assay

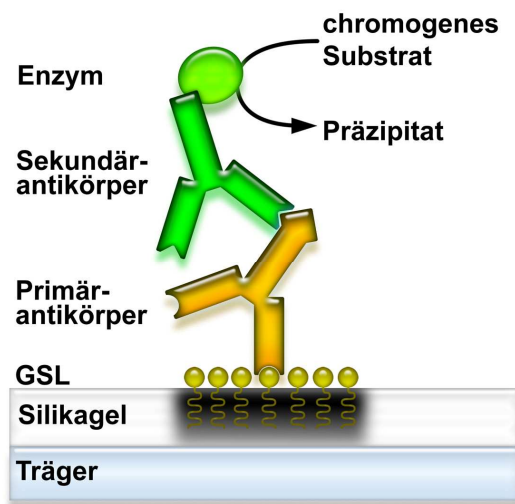
Der Overlay-Assay ist eine Methode für den Nachweis spezifischer GSL-Strukturen auf DC-Platten. Das Konzept des Overlay-Assays wurde von Magnani und Mitarbeitern entwickelt (Magnani *et al.* 1980) und nutzt die spezifische Bindung biologischer Substanzen an Glykostrukturen von GSL aus. Etabliert wurde das Verfahren durch den gezielten Nachweis von GM1 mit einer radioaktiv markierten B-Untereinheit des Cholera Toxins auf DC Platte. Die Spezifität der Nachweismethode ergibt sich aus der Tatsache, dass GM1 der Rezeptor ist, über den das Cholera Toxin an die Oberflächen von Zellen bindet.

Im Allgemeinen können für den spezifischen Nachweis von GSL auch weitere GSL Determinanten-bindende Substanzen eingesetzt werden, deren Bindemotiv bekannt ist. Dies können neben Toxinen auch Antikörper oder allgemein Lektine sein. Inzwischen wurden viele monoklonale Antikörper und Lektine beschrieben, die an Glykostrukturen u.a. von GSL binden (Kannagi 2000; Gabius 2009).

Der Ablauf eines DC-Overlay-Assays ähnelt dem anderer Festphasen-Assays, wie dem ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) oder Western Blot, und lässt sich im Allgemeinen in drei grundlegende Schritte einteilen. Nach der chromatographischen Auftrennung wird im ersten Schritt ein primärer Bindungspartner auf die Platte gegeben. Dies können gegen GSL-Determinanten gerichtete Antikörper oder auch andere GSL-bindende Proteine sein. Im zweiten Schritt wird eine Reportergruppe eingeführt. Dies erfolgt meist in Form eines Sekundärantikörpers, der mit einer Reportergruppe konjugiert ist und spezifisch die erste gebundene Substanz erkennt. Im dritten Schritt erfolgt der Nachweis des in den

ersten beiden Schritten gebildeten Komplexes. Weit verbreitet ist die Verwendung von Enzymen als Reportergruppe, z.B. alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*). Dabei können GSL über eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Chromogene Substrate werden in wasserunlösliche Chromophore umgesetzt, die am Ort der Reaktion ausfallen und somit die jeweiligen GSL lokalisieren.

Abbildung 3.1 veranschaulicht den beschriebenen Prozess zum GSL-Nachweis. Die in dieser Form dargestellte Methode wird auch als Immunoassay oder Immunfärbung bezeichnet, da als primärer Bindungspartner ein GSL-spezifischer Primärantikörper eingesetzt wird. Als Reportergruppe wird ein Enzym über ein Sekundärantikörper-Konjugat eingeführt. Der Nachweis der GSL erfolgt über eine Enzym-vermittelte Farbreaktion.



**Abbildung 3.1: Overlay-Assay Schema.**

Außer zur bloßen Detektion einzelner GSL kann der Overlay-Assay auch zum Nachweis von biologisch aktiven GSL bzw. zur Bestimmung von Rezeptorstrukturen von Viren, Bakterien und Toxinen eingesetzt werden (Müthing 1996).

Der Overlay-Assay kann je nach verwendetem Bindungspartner sehr sensitiv und spezifisch sein. Er ist von besonderer Bedeutung in der GSL-Analytik, da er zerstörungsfrei arbeitet und die detektierten GSL nach dem Assay für weitere Analysen zur Verfügung stehen. Zudem liefert der Overlay-Assay aufgrund der Spezifitäten der Antikörper Informationen über die Feinstruktur des Glykans, wie z.B. Art der Monosaccharideinheiten sowie Typ und Position der glykosidischen Bindungen, die mit anderen Techniken nicht zu erreichen sind, wenn GSL nur in kleinen Mengen und/oder in Form von komplexen Mischungen vorliegen.

Um zusätzliche Strukturinformationen zu erzielen, hat sich die Kopplung von DC-Overlay-Assay und Massenspektrometrie als besonders nützlich herausgestellt; dieses Prinzip wird in Kapitel 3.6 genauer erläutert.

### 3.5.1 Immunoassay

Primärantikörper:

**Tabelle 3.7: Eingesetzte Primärantikörper für die Immundetektion von GSL auf DC-Platten.**

Antigen	Typ <sup>a</sup>	Spezies	Verdünnung	Referenz
LacCer	pk	Huhn IgY	(1/2000)	JM06/249-1 (Duvar <i>et al.</i> 1997)
Gb3Cer/CD77	pk	Huhn IgY	(1/2000)	JM06/298-1 (Duvar <i>et al.</i> 1997)
Gb4Cer	pk	Huhn IgY	(1/2000)	JM06/206 (Duvar <i>et al.</i> 1997)
IV <sup>6</sup> nLc4Cer/CD75s	pk	Huhn IgY	(1/2000)	JM06/280-5 (Meisen <i>et al.</i> 2003)
IV <sup>3</sup> nLc4Cer/isoCD75s	pk	Huhn IgY	(1/2000)	JM06/280-4 (Meisen <i>et al.</i> 2003)
sLe <sup>x</sup> /CD15s	mk	Maus IgM	(1/1000)	JM07/193 (CSLEX-1) (Fukushima <i>et al.</i> 1984)

<sup>a</sup> pk: polyklonal; mk: monoklonal

Sekundärantikörper:

**Tabelle 3.8: Mit Enzym-konjugierte Sekundärantikörper.**

Antigen	Typ	Spezies	Verdünnung	Nr. <sup>a</sup>
Huhn IgG (IgY)	AP-konjugiert	Kaninchen	(1/2000)	303-055-003
Huhn IgG (IgY)	HRP-konjugiert	Kaninchen	(1/2000)	303-035-003
Maus IgG und IgM	AP-konjugiert	Ziege	(1/1000)	115-055-003 115-055-020

<sup>a</sup> alle Sekundärantikörper wurden von Dianova (Dianova GmbH, Hamburg) bezogen.

Material:

Plexigum-Lösung: 0,5% Polyisobutylmethacrylat (Plexigum P28, Röhm, Darmstadt) in n-Hexan (getrocknet)

#### CMF-PBS (*Calcium Magnesium Free Phosphate-Buffered Saline*)

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
140 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>  
pH 7,2

Lösung A                      1% (w/v) lipidfreies bovines Serumalbumin (BSA)  
(Nr. 1930, Fraktion V, Serva, Heidelberg) in CMF-PBS

#### Durchführung:

Nach chromatographischer Trennung der GSL auf DC-Platten wurden diese 40 min lang im Exsikkator unter Ölpumpenvakuum getrocknet. Anschließend wurden sie 30 min lang in Plexigum-Lösung chromatographiert, um sie zu imprägnieren und für folgende Inkubationsschritte in wässrigen Puffern zu stabilisieren. Die Platten wurden dazu aufrecht in einen mit Plexigum-Lösung versehenen Tank gestellt. Platten, auf denen neutrale GSL aufgetrennt waren, wurden kurz getrocknet und dann ein zweites Mal für weitere 20 min mit Plexigum chromatographiert. Das nicht imprägnierte Kieselgel am oberen Plattenrand wurde bei diesen Platten abgekratzt. Bei Platten mit Gangliosiden wurde dieses durch Abschneiden der oberen Hälfte entfernt. Es folgte eine Vorinkubation in CMF-PBS bei 37 °C über Nacht. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Um unspezifische Bindungen an der Kieselgeloberfläche zu minimieren, wurden die Platten zu Beginn des Overlay-Assays 30 min lang in Lsg. A geblockt. Danach wurde der in Lsg. A verdünnte Anti-GSL-Primärantikörper hinzugegeben. (siehe Tabelle 3.7). Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden drei Waschschrinen mit CMF-PBS durchgeführt, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Danach wurde der entsprechende, ebenfalls in Lsg. A verdünnte, Enzym-konjugierte Sekundärantikörper hinzugegeben. Je nach angestrebter Färbung war dies ein AP- oder HRP-konjugierter Antikörper (vgl. Tabelle 3.8). Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurde durch drei weitere Waschschrine mit CMF-PBS ungebundener Sekundärantikörper entfernt. Die Platten wurden wenige Minuten lang in dem Detektionspuffer der angestrebten Färbung äquilibriert bevor die entsprechende Substrat-Lösung hinzugegeben und die Nachweisreaktion gestartet wurde. Alle verwendeten Detektionssysteme sind in Kapitel 3.5.4

beschrieben. Die Farbentwicklung wurde im Allgemeinen abgebrochen, sobald sich das Hintergrundsignal verstärkte. Dazu wurden die Platten mit dem jeweiligen Detektionspuffer gewaschen. Die erhaltenen, gefärbten Banden wurden densitometrisch quantifiziert (siehe Kapitel 3.5.5) und die Platten bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.5.2 Lektin-Assay

#### Material:

Biotinyliertes *Maackia amurensis* Agglutinin I (MAA, Nr. B-1315, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)

Streptavidin (Nr. 016-000-084, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., Westgrove, PA, USA)

Biotinylierte alkalische Phosphatase (Nr. B000-05, Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA, USA)

Lektin-Puffer	0,01 M Tris
	0,15 M NaCl
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM MnCl <sub>2</sub>
	1 mM CaCl <sub>2</sub>
	pH 7,5

#### Durchführung:

Der Lektin-Assay wurde im Wesentlichen analog zum Immunoassay durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.1). Anstelle eines Antikörpers wurde das Lektin MAA zum spezifischen GSL-Nachweis eingesetzt. Als Reportergruppe, die die Nachweisreaktion vermittelt, wurde ein Enzym über das Biotin-Streptavidin-System eingeführt. Das Lektin und das verwendete Reporterenzym AP waren beide Biotin-konjugiert. Streptavidin besitzt eine extrem hohe Affinität zu Biotin und kann die Bindung des Enzyms an das Lektin vermitteln. Aufgrund der Multivalenz des Streptavidin-Komplexes wird dabei zusätzlich eine Signalamplifikation erreicht.

Für den Lektin-Assay wurden Plexigum-fixierte DC-Platten verwendet, die über Nacht in CMF-PBS inkubiert und anschließend mit Lsg. A geblockt wurden. Nach Äquilibration der Platten in Lektin-Puffer wurden sie jeweils 1 h lang mit 2 µg/ml biotinyliertem MAA in Lektin-Puffer, 1 µg/ml Streptavidin in Lsg. A und 0,5 mg/ml biotinylierter AP in Lsg. A inkubiert. Nach den Inkubationsschritten wurde jeweils dreimal mit CMF-PBS gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Von MAA erkannte GSL wurden final mit dem BCIP/NBT-Detektionssystem (Kapitel 3.5.4.1) nachgewiesen. Auch in diesem Fall wurde die Färbung bei Anstieg des Hintergrundsignals gestoppt. Die gefärbten GSL-Banden wurden mittels Densitometrie ausgewertet und die Platten bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.5.3 Overlay-Assay mit Mehrfachfärbung**

Zum Nachweis verschiedener GSL-Determinanten auf ein und derselben Platte wurden mehrere Overlay-Assays sequenziell durchgeführt. Mit jedem Overlay-Assay wurde ein zusätzliches GSL-Strukturmotiv detektiert.

Nach der DC-Trennung der GSL wurde der erste Overlay-Assay entsprechend Kapitel 3.5.1 durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Um anschließend einen weiteren Assay durchzuführen, wurden die Platten 90 min lang in einem Umluftofen (ULE 500, Memmert GmbH, Schwabach) bei 140 °C inaktiviert und dann über Nacht bei 37 °C in CMF-PBS inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Assay entsprechend Kapitel 3.5.1 oder 3.5.2. Auf diese Weise wurden bis zu drei Overlay-Assays in Folge mit einer Platte durchgeführt. Um die Signale der einzelnen Assays zu unterscheiden, wurden jeweils Detektionssysteme eingesetzt, die Präzipitate mit differierenden Farben erzeugten (siehe Kapitel 3.5.4).



### 3.5.4 Detektionssysteme für Overlay-Assays

Für den Nachweis von GSL wurden Detektionssysteme verwendet, die auf der Enzymkatalysierten Produktion von Chromophoren basieren. Als Reporterenzyme wurden die alkalische Phosphatase (AP) und die Meerrettich-Peroxidase (HRP) verwendet. Für den GSL Overlay-Assay wurden Substrate verwendet, die in wasserunlösliche Chromophore umgesetzt werden. Durch die Präzipitation der Farbstoffe am Ort ihrer Produktion ist es möglich gezielt GSL auf der DC-Platte zu lokalisieren. Im Folgenden sind alle Detektionssysteme aufgeführt die bei den Overlay-Assays verwendet wurden.

#### 3.5.4.1 Detektionssysteme mit alkalischer Phosphatase

##### **BCIP-Färbung**

##### Material:

Detektionspuffer	0,1 M Glycin 1 mM ZnCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> pH 10,4
------------------	---

BCIP-Lösung	0,05% (w/v) BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-toluidinsalz) (Roth, Karlsruhe) in Glycin-Puffer
-------------	--

##### Durchführung:

Für die Substrat-Lösung wurde BCIP durch intensives Mischen und Inkubation im Ultraschallbad in Glycin-Puffer gelöst. Zum Nachweis von GSL wurde die Substratlösung frisch angesetzt und auf mit Glycin-Puffer äquilibrierte Platten gegeben. Die Nachweisreaktion produziert einen blauen Farbstoff.

### **NBT/BCIP-Färbung**

#### Material:

NBT/BCIP-Detektionspuffer	0,1 M Tris 0,05 M MgCl <sub>2</sub> 0,1 M NaCl pH 9,5
NBT/BCIP-Stammlösung	18,75 mg/ml Nitroblautetrazoliumsalz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) 9,4 mg/ml BCIP in Dimethylsulfoxid/H <sub>2</sub> O (2/1) (v/v)

#### Durchführung:

Für die Nachweisreaktion mit NBT/BCIP wurde die NBT/BCIP-Stammlösung 1/50 mit dem Detektionspuffer verdünnt und auf die Platten gegeben, die zuvor mit dem Detektionspuffer äquilibriert wurden. Die Reaktion wurde durch Waschen mit dem Detektionspuffer gestoppt. Das NBT/BCIP-AP-Detektionssystem produziert ein dunkles, blau-violettes Präzipitat.

### **Fast Red-Färbung**

#### Material:

Fast Red-Detektionspuffer	0,2 M Tris pH 9,1
Fast Red-Lösung	2 mg/ml Fast Red TR Salz (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in Detektions-Puffer
NASMPX-Lösung	2 mg/ml NASMPX (Naphthol-AS-MX-phosphat Dinatriumsalz, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) in Detektionspuffer

Durchführung:

Die Fast Red- und NASMXP-Lösungen wurden durch intensives Mischen und Ultraschallbehandlung in Detektionspuffer gelöst. Die Fast Red-Lösung wurde filtriert und kurz vor dem Beginn des Detektionsschrittes mit einem gleichen Volumen NASMXP-Lösung vermischt. Die entstandene Lösung wurde auf Platten gegeben, die zuvor mit Fast Red-Detektionspuffer äquilibriert wurden. Die Fast Red-Färbung ergibt ein rotes Präzipitat (Van Duijn *et al.* 1967).

**Variaminblau-Färbung**

Die Variaminblau-Färbung wurde analog zur Fast Red-Färbung durchgeführt. Anstelle von Fast Red TR wurde Variaminblau TR-Salz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet.

**Neufuchsin-Färbung**

Material:

Neufuchsin (Merck KGaA, Darmstadt)

NASTRP-Lösung                      0,25 mg/ml Naphthol-AS-TR-phosphat (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) in Detektionspuffer

Neufuchsin-Detektionspuffer      0,2 M Tris  
   10 mM MgCl<sub>2</sub>  
   pH 9,1

Durchführung:

Zur Herstellung des Diazoniumsalzes von Neufuchsin wurden 0,25 ml 4% (w/v) NaNO<sub>2</sub> und 0,25 ml 4% (w/v) Neufuchsin, je gelöst in 2 M HCl, vermischt und für 10 min inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 1 ml 0,5 M NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert. Um die finale Substrat-Lösung zu erhalten, wurde der Ansatz mit 40 ml NASTRP-Lösung verdünnt. Die Neufuchsin-Färbung produziert einen rot-braunen Farbstoff.

### 3.5.4.2 Detektionssysteme mit Meerrettich-Peroxidase

#### AEC-Färbung

##### Material:

AEC-Stammlösung	0,4% (w/v) AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) in Dimethylformamid
AEC-Detektionspuffer	0,05 M Natriumacetat pH 5,0

Wasserstoffperoxid (30%)

##### Durchführung:

Es wurde 1 ml der AEC-Stammlösung mit 19 ml AEC-Detektionspuffer verdünnt. Kurz vor dem Beginn der Färbung wurden unter ständigem Mischen 7 µl der Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugegeben (Graham *et al.* 1965). Bei der AEC-Färbung entsteht ein dunkelroter Farbstoff.

#### DAB-Imidazol-Färbung

##### Material:

DAB-Imidazol-Lösung	1,3 mM DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) 0,1 M Imidazol (Merck KGaA, Darmstadt) 0,05 M Tris pH 7,6
---------------------	---

##### Durchführung:

Direkt vor Beginn jeder Färbung wurden 20 ml DAB-Imidazol-Lösung mit 7 µl 30%-iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung vermischt. Die DAB-Imidazol-Färbung produziert einen braunen Farbstoff.

#### DAB-Ni/Co-Färbung

##### Material:

Kobalt-Stammlösung	1% (w/v) CoCl <sub>2</sub> (Hexahydrat-Salz)
Nickel-Stammlösung	1% (w/v) NiCl <sub>2</sub> (Hexahydrat-Salz)

DAB-Detektionspuffer          0,1 M Natriumphosphat  
pH 7,3

#### Durchführung:

Zur Herstellung der Substratlösung wurden 10 mg DAB in 20 ml DAB-Detektionspuffer gelöst. Danach wurden je 0,5 ml der Kobalt- und Nickel-Stammlösungen sehr langsam und unter ständigem Mischen, um ein Ausfallen des Substrats zu vermeiden, hinzugegeben. Kurz vor Beginn der Färbung wurden weiterhin 7 µl 30%-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugemischt. Bei der DAB-Färbung in Kombination mit den Nickel- und Kobalt-Salzen wird ein dunkelblaues Präzipitat produziert.

#### **DAB-Ni-Färbung**

Die DAB-Ni-Färbung wurde analog zur DAB-Ni/Co-Färbung durchgeführt. Anstatt je 0,5 ml Nickel- und Kobalt-Stammlösung wurde hier 1 ml der Nickel-Lösung hinzugegeben.

### **3.5.5 Densitometrische Messungen von gefärbten DC-Platten**

Mit Hilfe des CD60-DC-Scanners (Desaga GmbH, Heidelberg) wurden durch Overlay-Assays erhaltene Färbungen ausgewertet. Es wurden Chromatogramme von Bahnen aufgezeichnet, indem bei einer konstanten Messwellenlänge (siehe Tabelle 3.9) die Absorption entlang der Laufrichtung bestimmt wurde. Zusätzlich wurden Absorptionsspektren von einzelnen Signalen bzw. Färbungen ermittelt. Die Spektren wurden für den Bereich von 190 bis 900 nm aufgenommen. Messungen wurden im Reflektionsmodus durchgeführt.

Die Software Proquant (Version 1.06, Desaga GmbH, Heidelberg) wurde zur Steuerung des Densitometers und im Allgemeinen zur Auswertung der Messdaten, d.h. zur Peakflächenbestimmung, verwendet. Für die Bestimmung des NBT/BCIP-Signals bei der Mehrfachfärbung wurden die Chromatogramme, die vor und nach der Färbung mit einer Messwellenlänge von 610 nm aufgenommen wurden, exportiert und mit Hilfe von Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) ausgewertet. Dabei wurden Chromatogramme für die NBT/BCIP-Färbung über Subtraktion erhalten und danach die Peakflächen mit dem Peakanalysator bestimmt.

**Tabelle 3.9: Messwellenlängen für die densitometrische Auswertung von Overlay-Assays.**

Färbung <sup>a</sup>	Messwellenlänge
Fast Red	520 nm
BCIP	650 nm
NBT/BCIP	610 nm
DAB-Ni	750 nm

<sup>a</sup> Details zu den Färbungen werden in Kapitel 3.5.4 erläutert.

### 3.6 Massenspektrometrische Verfahren

Die Massenspektrometrie (MS) ist die wichtigste spektrometrische Methode in der GSL-Analytik (Peter-Katalinić & Egge 1990; Levery 2005). Sie wird zur Strukturaufklärung von GSL eingesetzt. Dabei können Informationen über die Struktur des Glykans, z.B. Anzahl und Sequenz der Monosaccharideinheiten, und des Ceramids, z.B. Kettenlänge und Sättigungsgrad der *N*-Acylgruppe, gewonnen werden. Die Massenspektrometrie profitiert von ihrer hohen Sensitivität, so dass auch kleine Probenmengen im unteren Nanogramm-Bereich der Analyse zugänglich sind.

Das allgemeine Prinzip der Massenspektrometrie ist die Bestimmung der Masse von geladenen Teilchen in der Gasphase. Massenspektrometer können unterschiedliche Konstruktionen aufweisen, wobei alle auf drei gemeinsamen funktionalen Einheiten basieren: (i) Ionenquelle, (ii) Massenanalysator und (iii) Detektor. In der Ionenquelle werden die Analyten in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Ionen werden anschließend im Massenanalysator entsprechend ihrer Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) getrennt. Der Detektor liefert Signale relativ zur Anzahl der Ionen mit einem gemeinsamen  $m/z$ .

Seit den 1980er Jahren wurden GSL mittels *fast atom bombardment* (FAB)-MS charakterisiert. Dabei werden GSL in Matrices präpariert, die aus schwer flüchtigen Flüssigkeiten, wie z.B. Glycerin bestehen, und mit einem Partikelstrom aus neutralen, inerten Atomen oder Molekülen beschossen, häufig Argon und Xenon. Durch die Einschläge werden in den Präparationen enthaltene Ionen in die Gasphase freigesetzt und im Folgenden in den Massenanalysator überführt (Hoffmann & Stroobant 2007).

Mit dieser Methode wurden die ersten hoch komplexen GSL-Strukturen massenspektrometrisch aufgeklärt (Egge & Peter-Katalinić 1985). GSL wurden dabei teils nativ, aber auch in peracetylierter und permethylierter Form eingesetzt. Derivatisierte GSL wurden vor allem im Positivionenmodus analysiert, saure GSL dagegen häufig in nativer

Form im Negativionenmodus. Auf diese Art konnten z.B. hochkomplexe GSL mit Blutgruppen-Antigenen charakterisiert werden (Hanfland 1984).

Mit der Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) (Karas & Hillenkamp 1988; Tanaka *et al.* 1988; Karas *et al.* 1989a, 1989b) und der Elektrospray-Ionisation (ESI) (Yamashita & Fenn 1984a, 1984b) stehen zwei sanfte Ionisationsverfahren zur Verfügung, mit denen polare, große und/oder labile Biomoleküle intakt in die Gasphase überführt und ionisiert werden können. Aufgrund ihrer hohen Ionenausbeute werden sie gegenwärtig in der GSL Analytik fast ausschließlich verwendet (Leverly 2005).

### 3.6.1 nanoESI-QTOF-MS

Bei der Nanoelektrospray-Ionisation-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (nanoESI-QTOF-MS, engl. *nanoelectrospray ionization quadrupol time-of-flight mass spectrometry*) wird eine sanfte Ionisationsmethode in Kombination mit einem Tandem-Massenspektrometer verwendet (Lottspeich & Engels 2006). Derartige Messinstrumente erlauben über Fragmentierungsexperimente die Strukturaufklärung ausgewählter Vorläuferionen (Hoffmann & Stroobant 2007).

Der Aufbau eines ESI-QTOF Massenspektrometers ist gekennzeichnet durch die ESI-Ionenquelle und zwei hintereinander geschaltete Massenanalytoren: dem Quadrupol und dem Reflektorflugrohr (siehe Abbildung 3.2).

Ionen werden über ein Elektrospray erzeugt, das sich durch Anlegen eines starken elektrischen Feldes zwischen einer Elektrode und einer mit Probelösung gefüllten Kapillare aufbaut. Die Probelösung dispergiert in viele geladene Tröpfchen, die durch Desolvatisierung an Größe verlieren. Es wird angenommen, dass in Folge des Lösungsmittelverlusts die Ladungsdichte der Tröpfchen so groß wird, dass das Raleigh-Stabilitätslimit überschritten und eine Coulomb-Explosion ausgelöst wird, durch die mehrere kleinere geladene Tröpfchen entstehen. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass schon durch die Verformung der geladenen Tröpfchen im elektrischen Feld eine zweite Generation kleinerer Tröpfchen noch vor dem Erreichen des Raleigh-Limits freigesetzt wird (Gomez & Tang 1994). Nach dem *charged residue model* (Dole *et al.* 1968) wiederholen sich diese Prozesse bei ständiger Desolvatisierung, bis einzelne geladene Moleküle in der Gasphase vorliegen. Nach dem *ion evaporation model* (Iribarne & Thomson 1976) verlassen Ionen direkt die hochgeladenen Tröpfchen bevor diese vollständig desolvatisiert sind. Beide Modelle decken Teilaspekte experimenteller Beobachtungen ab. Die genauen Vorgänge der Ionenbildung sind jedoch

nicht bekannt. Durch ESI ist es möglich, Makromoleküle zu ionisieren und massenspektrometrisch zu untersuchen. Das beruht einerseits auf dem nicht-thermischen Prinzip des Ionisierungsvorgangs, andererseits aber auch auf der Bildung mehrfachgeladener Ionen mit  $m/z$ , die im Arbeitsbereich der Standardmassenanalysatoren liegen (Lottspeich & Engels 2006).

Da in der Ionenquelle Atmosphärendruck herrscht, wird der in ihr produzierte kontinuierliche Ionenstrahl über ein *Interface* in den Hochvakuumbereich der Massenanalysatoren überführt.

Der erste Massenanalysator ist ein Quadrupol (vgl. Abbildung 3.2) und besteht aus vier parallel angeordneten länglichen Elektroden, die durch anliegende Gleich- und Wechsellspannungskomponenten elektrische Felder erzeugen. Diese zwingen Ionen, die den Zwischenraum der Elektroden in Längsrichtung durchqueren, auf oszillierende Bahnen, so genannte Trajektorien, welche je nach anliegenden Wechsel- oder Gleichspannungsanteilen für Ionen mit bestimmten  $m/z$  stabil oder instabil sind. Der Quadrupol wird auch als Massenfilter bezeichnet, da er zur Isolierung von Vorläuferionen für Fragmentierungsexperimente genutzt werden kann. Dabei werden die Gleich- und Wechsellspannungsanteile so eingestellt, dass sich nur Ionen innerhalb eines kleinen Fensters um ein definiertes  $m/z$  auf stabilen Trajektorien bewegen. Wird der Quadrupol ohne Gleichspannungsanteil betrieben (RF-Modus), kann er auch zur Ionenführung eingesetzt werden und Ionen eines breiten  $m/z$ -Fensters können auf stabilen Bahnen passieren (Hoffmann & Stroobant 2007).

Ein Flugzeitmassenanalysator trennt Ionen nach ihrer anfänglichen Beschleunigung durch ein elektrisches Potential aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Die  $m/z$ -Werte werden über die Flugzeit bestimmt, die die Ionen für das Zurücklegen einer feldfreien Flugstrecke zwischen Startregion und Detektor benötigen.

Aus einer Startregion werden Ionenpakete durch Anlegen einer Potentialdifferenz in Richtung des Flugrohrs gepulst. Dabei erhalten alle Ionen die gleiche kinetische Energie:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = zeU \quad (4.1)$$

$E_{kin}$	Kinetische Energie
$m$	Masse des Ions
$v$	Geschwindigkeit nach der Beschleunigungsstrecke
$z$	Anzahl der Ladungen
$e$	Elementarladung
$U$	Beschleunigungsspannung



Die Endgeschwindigkeiten der Ionen lässt sich demnach berechnen durch:

$$v = \sqrt{2zeU/m} \quad (4.2)$$

Bei einer definierten Flugstrecke  $L$  und einer konstanten Endgeschwindigkeit ist die Flugzeit  $t$  der Ionen:

$$t = L/v \quad (4.3)$$

Durch Ersetzen von  $v$  ergibt sich:

$$t^2 = \frac{m}{z} \left( \frac{L^2}{2eU} \right) \quad (4.4)$$

Es zeigt sich, dass  $m/z$  bei definierter Flugstrecke und Beschleunigungsspannung aus der Flugzeit bestimmt werden kann.

Flugzeitmassenanalysatoren können Ionen eines großen  $m/z$ -Bereichs analysieren; zudem besitzen sie eine hohe Sensitivität. Ihr Auflösungsvermögen wird jedoch durch die anfängliche Verteilung der kinetischen Energien von Ionen begrenzt. Ein Reflektorflugrohr kann diese kompensieren und somit das Auflösungsvermögen stark erhöhen. Ionen werden nach dem Durchlaufen einer ersten Flugstrecke in einem Reflektor durch ein anliegendes Potential auf eine gekrümmte Bahn gebracht und umgelenkt (siehe Abbildung 3.2). Dabei dringen Ionen eines bestimmten  $m/z$  mit größerer initialer  $E_{\text{kin}}$  tiefer in die Reflektorregion ein und legen eine größere Wegstrecke zurück als Ionen gleichen  $m/z$  mit geringerer initialer  $E_{\text{kin}}$ . Nach dem Passieren des Reflektors werden sie gemeinsam auf einen Punkt fokussiert an dem sie idealerweise detektiert werden.

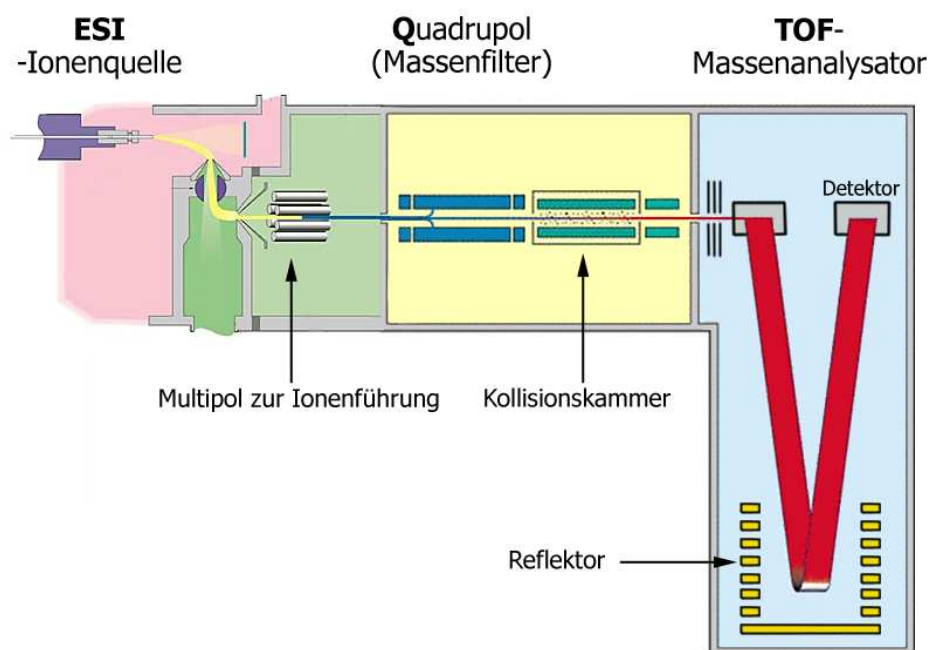
Mit dem Aufbau eines ESI-QTOF-Massenspektrometers können sowohl einfache Übersichtsmassenspektren ( $MS^1$ -Modus) als auch Fragmentionenspektren von zuvor im ersten Massenanalysator selektierten Vorläuferionen aufgenommen werden ( $MS^2$ -Modus).

Im  $MS^2$ -Modus können mit Hilfe des Quadrupols Ionen aus einem definierten  $m/z$ -Bereich selektiert werden. Die selektierten Vorläuferionen werden durch Anlegen einer Potentialdifferenz in eine mit inertem, neutralem Stoßgas gefüllte Kollisionskammer

beschleunigt. Über Kollisionsaktivierung (CID, engl. *collision-induced dissociation*), d.h. über die teilweise Umwandlung der Translationsenergie der Vorläuferionen in Schwingungsenergie durch Stoßprozesse, kommt es zu strukturspezifischen Fragmentierungsreaktionen. Die generierten Fragmentationen werden in einem weiteren Multipol fokussiert und anschließend orthogonal in ein Reflektorflugrohr beschleunigt, wo ihre  $m/z$ -Werte bestimmt werden. Im  $MS^2$ -Modus können so CID-Spektren aufgenommen werden.

Im  $MS^1$ -Modus wird weder eine Selektion von Vorläuferionen noch eine Kollisionsaktivierung vorgenommen, so dass ein breites Spektrum von Ionen aus der Ionenquelle ins Reflektorflugrohr überführt und bezüglich ihrer  $m/z$  analysiert wird.

Neben der Möglichkeit der Strukturaufklärung durch CID-Experimente bietet nanoESI-Q-TOF-MS den zusätzlichen Vorteil, dass aufgrund geringer Flussraten von wenigen nl/min nur äußerst geringe Probenmengen benötigt werden.



**Abbildung 3.2:** Schematischer Aufbau eines ESI-QTOF-Massenspektrometers. Quelle: modifiziert nach <http://cbsu.tc.cornell.edu/vanwijk/q-tof.htm>.

#### Durchführung:

Messungen wurden mit einem nanoESI-QTOF-Massenspektrometer (Micromass, Manchester, England) durchgeführt. Dazu wurden in Methanol gelöste GSL in Kapillaren aus Borsilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld) gefüllt, die mit einem selbstgebauten Kapillarenzieher hergestellt wurden. Die Kapillaren wurden in die ZSpray<sup>TM</sup>-Ionenquelle eingeführt, wo,

unterstützt durch einen Stickstoffgasstrom, das Elektrospray erzeugt wurde. Das elektrische Potential wurde dabei über einen in die Probelösung getauchten Metalldraht angelegt. Für CID-Experimente wurde Argon als Kollisionsgas verwendet. MassLynx Software (Micromass) wurde für die Aufnahme und Auswertung der Massenspektren verwendet.

### 3.6.2 IR-MALDI-o-TOF-MS

Die Infrarot Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation orthogonal Flugzeit Massenspektrometrie (*infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry*, IR-MALDI-o-TOF-MS) ist ein spezieller Fall der MALDI-MS, der unter anderem eine *off-line* Kopplung von DC und MS ermöglicht.

In der Regel werden bei der MALDI-MS Analytmoleküle in eine kristalline Matrix aus aromatischen Säuren eingebettet und mit einem Ultraviolett (UV)-Laser desorbiert und ionisiert (UV-MALDI). Dabei werden durch die Laserbestrahlung hauptsächlich die im Überschuss vorliegenden stark UV-absorbierenden Matrixmoleküle angeregt, die im Zuge des Desorptions-/Ablationsvorganges die Analytmoleküle mit in die Gasphase überführen und ionisieren. Diese indirekte Ionenbildung ist wesentlich sanfter als die direkte Desorption/Ionisation der Analytmoleküle durch Laserbestrahlung (LDI, *laser desorption/ionization*) (Hillenkamp & Peter-Katalinić 2007).

Weniger verbreitet ist die IR-MALDI, die an Stelle eines UV-Lasers einen Infrarot (IR)-Laser verwendet. Anstelle von konjugierten  $\pi$ -Elektronensystemen, wie bei der UV-Laseranregung, werden bei der IR-MALDI, z.B. bei 2,94  $\mu\text{m}$  eines Er:YAG Lasers, C-H- und O-H-Streckschwingungen angeregt. Dadurch ist auch die Verwendung anderer Matrices nötig. Häufig verwendete IR-MALDI-Matrices sind Bernsteinsäure und Glycerin.

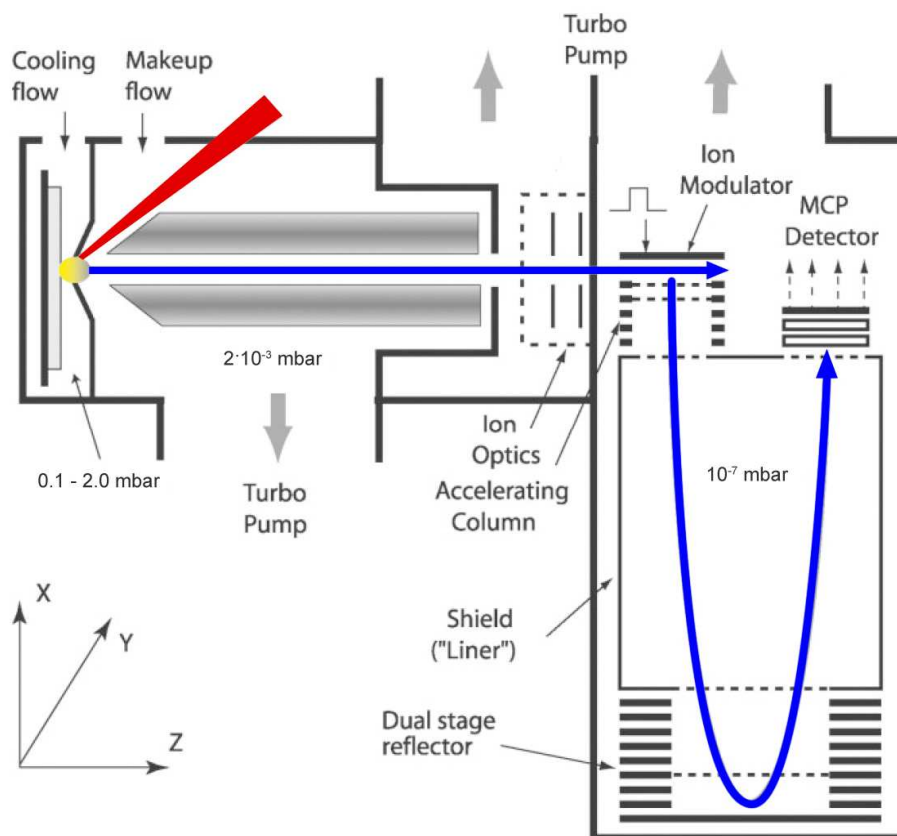
Der Aufbau des verwendeten oTOF-Massenspektrometers ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Desorption und Ionisation finden bei einem Druck von 0,1 bis 2,0 mbar in der Ionenquelle statt. Ionen werden über einen Quadrupol fokussiert, orthogonal in ein Reflektorflugrohr mit Hochvakuum beschleunigt und auf ihre  $m/z$  untersucht.

Bei einem Massenspektrometer mit axialer Konfiguration sind Ionisation und Massenanalyse gekoppelt, so dass mit dem Ionisationsprozess einhergehende Ungenauigkeiten, wie die örtliche Verteilung und auch die Energieverteilung der Ionen, die Massenanalyse beeinflussen und Auflösung und Stabilität der Messung einschränken.

Der Ionisationsprozess und die Massenanalyse werden bei der orthogonalen Konfiguration von einander entkoppelt. Der Druck in der Ionenquelle ist so gewählt, dass ein durch

Stoßprozesse vermitteltem Kühlungseffekt eintritt, der die innere Energie der desorbierten Moleküle abbaut. So wird einerseits deren Fragmentierung als auch die Energieverteilung der Ionen minimiert. Die Fokussierung der Ionen im überführenden Quadrupol (kollisionsfokussierende Ionenführung) führt zu einer geringen örtlichen Verteilung in der Beschleunigungsrichtung des orthogonal angeordneten Flugzeitmassenanalysators und zu einer definierten und vor allem konstanten Startposition. So können auch von rauhen Oberflächen, wie der einer DC-Platte, Massenspektren hoher Auflösung und Massengenauigkeit aufgenommen werden, die bei einer axialen Konfiguration nicht möglich wären.

Die Verwendung der IR-MALDI-o-TOF-MS hat sich bei der Kopplung von DC und MALDI-MS als vorteilhaft erwiesen und wurde erfolgreich für die Analyse von Oligosacchariden, Phospholipiden und GSL eingesetzt (Dreisewerd *et al.* 2005, 2006; Rohlfing *et al.* 2007; Distler *et al.* 2008a; Müthing & Distler 2009).



**Abbildung 3.3:** Schematischer Aufbau eines orthogonal beschleunigenden Flugzeitmassenspektrometers mit MALDI-Ionenquelle (MALDI-o-TOF-MS); Quelle: modifiziert nach Loboda *et al.* (2003).

**Durchführung:**

Nach der Extraktion von Plexigum wurden immungefärbte DC Platten mit Hilfe eines Glasschneiders zugeschnitten und mit doppelseitig klebenden Pads (Plano GmbH, Wetzlar) auf einem Probenhalter befestigt. Glycerin wurde als Flüssigmatrix tropfenweise auf die zu untersuchenden Banden aufgetragen. Wenn das Glycerin nicht selbstständig in das Kieselgel einzog, wurde Chloroform als Lösungsvermittler neben die Bande getropft.

Messungen wurden an einem modifizierten Sciex Prototypen durchgeführt. Der Aufbau entspricht dem eines kommerziell erhältlichen prOTOF<sup>TM</sup> 2000 Massenspektrometers (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA). Das Massenspektrometer war mit einem Er:YAG-Laser (Erbium-dotierter Yttrium Aluminium Granat-Laser, Speser GmbH, Berlin) ausgestattet. Der IR-Laser hatte eine Emissionswellenlänge von 2,94  $\mu\text{m}$  und wurde mit einer Pulsdauer von  $\sim 100$  ns und einer Frequenz von 2 Hz betrieben. Die bestrahlte Fläche auf dem Probenhalter betrug  $\sim 200 \times 350 \mu\text{m}^2$ . Messungen wurden sowohl im Positiv- als auch im Negativionenmodus mit einer orthogonalen Beschleunigungsspannung von 10 kV durchgeführt. In der Ionenquelle wurde ein Stickstoffpartialdruck von 0,1 bis 2,0 mbar eingestellt. Massenspektren wurden mit dem Programm MoverZ (Version 2001.02.13, Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA) ausgewertet.

### **3.7 Molekulargenetische Analytik**

Die Expression einzelner Genprodukte kann auf der Transkriptebene mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (QRT-PCR, engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*) bestimmt werden.

Dieses Verfahren beruht auf der gezielten, exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen durch die zyklische Wiederholung von drei temperaturgesteuerten Arbeitsschritten: (i) Denaturierung, d.h. dem Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA, (ii) komplementäre Anlagerung (*Annealing*) von sogenannten Primern, kurze Oligonukleotide, die spezifisch den zu amplifizierenden Bereich einrahmen, und (iii) Polymerase-katalysierte Synthese (Elongation) von DNA Doppelsträngen ausgehend von den Primern. Da sowohl die Nukleinsäuremoleküle, die als Edukte dienen, als auch solche, die produziert wurden, der Reaktion im folgenden Zyklus als Vorlage dienen können, wird eine exponentielle Amplifikation erreicht, die die PCR sehr sensitiv macht. Während eines PCR-Laufs findet allerdings nur in den ersten Zyklen eine exponentielle Amplifikation statt (exponentielle Phase) bis erste Limitierungen durch Verbrauch der Substrate oder auch Inhibierungen durch

Nebenprodukte auftreten. Nach einer Übergangsphase wird die Plateauphase erreicht, in der keine Synthese mehr stattfindet.

Wie in Gleichung 4.5 verdeutlicht, ist die Produktmenge in der exponentiellen Phase unter anderem von der Anzahl der Ausgangsmoleküle abhängig und kann zur quantitativen Bestimmung eben dieser verwendet werden.

$$X_n = X_0 \cdot E^n \quad (4.5)$$

Dabei gilt  $E = (1 + e)$

$X_n$ : Anzahl der Nukleinsäuremoleküle mit der Zielsequenz  
 $X_0$ : anfängliche Anzahl der Nukleinsäuremoleküle mit der Zielsequenz  
 $e$ : Effizienz der Reaktion  
 $N$ : Anzahl der Zyklen

Bei der QRT-PCR wird der Verlauf der Amplifikation verfolgt, indem in jedem Zyklus die Menge an Produkt über Fluoreszenzmessung bestimmt wird. Dies kann z.B. mit Hilfe des interkalierenden Fluorophors SYBR Green, das doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle nachweist, erfolgen. Der Zyklus, bei dem Fluoreszenzwert einen bestimmten Grenzwert überschreitet, wird als Ct bezeichnet. Abgeleitet von Gleichung 4.5 hängt der Ct-Wert invers logarithmisch mit der Menge an Genprodukt zusammen.

Eine vergleichende Analyse der Genexpression in zwei Gewebeproben kann mit der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode vorgenommen werden. Dabei werden normalisierte relative Quantitäten (NRQ) bestimmt, indem die Ct-Werte der untersuchten Gene mit der Expression nicht regulierter, sogenannter *housekeeping* Gene normalisiert und im weiteren Verlauf aufeinander bezogen werden (Gleichung 4.6).

$$NRQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct, Probe - \Delta Ct, Kontrolle)} \quad (4.6)$$

Dabei ergibt sich  $\Delta Ct$  für Probe und Kontrolle aus der Differenz der jeweiligen Ct-Werte von Zielgen (ZG) und *housekeeping* Gen (HG).

Bei der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode wird von einer optimalen oder zumindest für alle Reaktionen konstanten Amplifizierungseffizienz ausgegangen. Diese ist jedoch vor allem von den eingesetzten Primerpaaren abhängig und kann für eine exaktere Bestimmung der NRQs in deren Berechnung einbezogen werden.

$$NRQ = \frac{E_{ZG}^{\Delta Ct, ZG}}{E_{HG}^{\Delta Ct, HG}} \quad (4.7)$$

Die Amplifizierungseffizienzen der einzelnen Primerpaare können über cDNA-Verdünnungsreihen bestimmt und bei der Berechnung der NRQ mit einbezogen werden. Dazu werden die gemessenen Ct-Werte als Funktion der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen und über lineare Regression die Steigung  $m$  bestimmt. Aus der Steigung ergibt sich entsprechend Gleichung 4.8 der Effizienz-Term  $E$ .

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)} \quad (4.8)$$

Um die Zuverlässigkeit der Genexpressionsanalysen zu steigern, können mehrere *housekeeping* Gene für die Normalisierung verwendet werden. Vandesompele und Mitarbeiter haben in diesem Zusammenhang vorgeschlagen mit dem geometrischen Mittel der Expression der *housekeeping* Gene zu normalisieren (Vandesompele *et al.* 2002). Daraus folgt abgeleitet von Gleichung 4.7:

$$NRQ = \frac{E_{ZG}^{\Delta Ct, ZG}}{\sqrt[f]{\prod_0^f E_{HG}^{\Delta Ct, HG}}} \quad (4.9)$$

Dabei ist  $f$  die Anzahl der verwendeten *housekeeping* Gene.

Im Folgenden wird die Anwendung der QRT-PCR zur Expressionsanalyse von Sialyltransferasen beschrieben.

### 3.7.1 Primerdesign und Bioinformatik

Die Gensequenzen für die Entwicklung und Überprüfung von Primern wurden der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)-Datenbank entnommen ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Die Primer wurden mit dem Programm Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000) und einer Anwendung von GeneScript (<https://www.genscript.com/ssl->

bin/app/primer) entwickelt. Alle Primer wurden mit Primer3 auf die Bildung ungünstiger Sekundärstrukturen und mögliche falsche Anlagerung an andere Sequenzen des humanen Genoms überprüft. Bezogen wurden die Oligonukleotide von Sigma-Genosys (Hamburg).

**Tabelle 3.10: Liste der Primerpaare für die QRT-PCR**

Gen	Sequenz 5' -> 3'	Produkt	quantifizierte Transkripte <sup>a</sup>
<b>GAPDH</b>	TCATTGACCTCAACTACATGGTTTACA CTTCCCGTTCTCAGCCTTGA	89bp	NM_002046
<b>RPL13A</b>	CCCTGGAGGAGAAGAGGAAAGA TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCA	127bp	NM_012423
<b>ST6GAL1</b>	CCTCTGGGATGCTTGGTATC GTGCAGGCACTATCGAAGAA	130bp	NM_173216; NM_173217; NM003032
<b>ST3GAL6</b>	TATTGGGTGGCACCTGTGGA TGAAACCTCAGCAGAGAGGCAA	89bp	NM_003032

<sup>a</sup> Die Ausdrücke bezeichnen die Zugangsnamen für die NCBI-Datenbankeinträge der einzelnen Transkripte.

Die ST6GAL1-Primer binden in einer Region am 3'-Ende der kodierenden Sequenz, die allen bekannten Transkriptvarianten gemeinsam ist. Auf diese Art kann die Gesamttranskriptmenge von ST6GAL1 bestimmt werden.

Die SYBR Green Detektionsmethode bei der QRT-PCR weist jegliche zweisträngige DNA nach, so dass auch (i) Artefakte, die durch die unspezifische Bindung von Primern entstehen, und/oder (ii) Produkte, die zwar durch spezifische Bindung von Primern, aber durch die Amplifikation von kontaminierender genomischer DNA entstehen, das gemessene Signal bestimmen können. Um Kontamination von genomischer DNA zu vermeiden, wurde bei der RNA-Reinigung ein DNase I-Verdau eingeführt und bei der reversen Transkription ein *genomic DNA wipe out buffer* verwendet (Kapitel 3.7.2 und 3.7.3). Um weiterhin eine mögliche Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen, wurde beim Entwerfen der Primerpaare darauf geachtet, dass mindestens ein Primer auf einer Exon-Exon-Schnittstelle bindet. Die Sequenz dieser Schnittstellen, die erst bei der Prozessierung entsteht, ist einzigartig und somit spezifisch für das Transkript.

Eine Ausnahme bilden die Primer für RPL13A, diese flankieren jedoch eine Exon-Exon-Schnittstelle, was bei der Amplifikation genomischer DNA zu einem sehr langen Syntheseprodukt führen würde. Durch kurze Elongationszeiten in den QRT-PCR-Läufen wird dies unterbunden, so dass genomische DNA, wenn sie vorliegt, nicht zur exponentiellen Amplifikation beiträgt.



### 3.7.2 RNA-Isolierung

#### Probenmaterial:

Aliquots von Schock-gefrorenen HCC-Gewebeproben wurden bis zur Verwendung in PrepProtect (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) bei -20 °C gelagert.

#### Vorbereitung:

Für die RNA-Extraktion wurde ein separater Arbeitsplatz eingerichtet. Der Arbeitsplatz und alle Gerätschaften wurden regelmäßig mit RNaseZap<sup>®</sup> (Sigma) von Ribonukleasen befreit. Zum Pipettieren wurden spezielle Filterspitzen eingesetzt.

#### Durchführung:

Die RNA-Extraktion wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Gewebeproben in einem Extraktionspuffer (RLT-Puffer) für 40 s mit einem Dispergierapparat (Model TH, Omni, Marietta, GA, USA) homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 20800 x g (Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg) wurde der Überstand auf sogenannte *spin columns* überführt. Dies sind kleine Chromatographiesäulen, bei denen ein Fluss der mobilen Phase durch das Säulenbett über Zentrifugation erreicht wird. Entsprechend der Herstellerangaben wurde der optionale DNase I-Verdau (RNase-free DNase Set, Qiagen) während der RNA-Reinigung auf der Festphase durchgeführt. Nach mehreren Waschschrinen wurde die RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser eluiert.

#### Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit:

Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurden spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurde ein 2 µl-Aliquot des Eluats mit 60 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5) vermischt und die Absorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt (Biophotometer 6131, Eppendorf AG, Hamburg). Die Konzentration wurde über Absorption bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorptionseinheit einer Konzentration von 44 µg/ml gleichgesetzt wurde. Die Reinheit wurde über das Verhältnis von der Absorption bei 260 nm zu 280 nm,  $A_{260}/A_{280}$ , bestimmt. Dieser Wert liegt bei reiner RNA im Bereich von 1,9 bis 2,1. Proben mangelnder Reinheit wurden nicht für weitere Schritte verwendet, sondern einer erneuten Reinigung mit dem RNeasy Kit unterzogen.

### 3.7.3 Reverse Transkription

Über Reverse Transkription wurde aus Proben-RNA cDNA synthetisiert. Dazu wurde das QuantiTect RT-PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Für einen Reaktionsansatz mit 20  $\mu\text{l}$  wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA eingesetzt.

### 3.7.4 Quantitative real-time PCR

Die Analysen wurden an einem ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) im 384er-Mikrotiterplatten-Format durchgeführt. Das Gerät wurde mit SDS Software (Version 2.2.2, Applied Biosystems) gesteuert. Die Reaktionen wurden mit Hilfe des QuantiTect SYBR Green PCR Kits (Qiagen) angesetzt, das das ROX Fluorophor als passive Referenz für erhöhte Messgenauigkeit enthält. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 3.11 beschrieben. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.10 aufgeführt. Für alle Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde cDNA aus HL-60 Zellen verwendet und als Negativkontrolle wurde dem Reaktionsansatz Wasser anstelle von Proben-cDNA zugegeben.

Der Ablauf eines QRT-PCR-Laufs ist in Tabelle 3.12 aufgelistet. Nach einem cDNA-Denaturierungs- bzw. Polymerase-Aktivierungsschritt wurden 40 Amplifikationszyklen durchlaufen, bei denen in jedem Zyklus die Menge an Produkt über Fluoreszenzmessung bestimmt wurde. Am Ende eines jeden Laufs wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die unspezifische Produkte aufgrund ihrer Differenzen in der Schmelztemperatur nachweisen kann.

**Tabelle 3.11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die QRT-PCR.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
MasterMix SYBR Green	10 $\mu\text{l}$
Primer A (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
Primer B (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
Wasser	7 $\mu\text{l}$
Proben-cDNA	1 $\mu\text{l}$

**Tabelle 3.12: Programm der QRT-PCR Analyse.**

Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
cDNA Denaturierung / Aktivierung der <i>hot start</i> -Polymerase	15 min	95 °C	1
Denaturierung	15 s	94 °C	
Annealing	30 s	60 °C	40
Elongation	30 s	72 °C	
Schmelzkurvenanalyse	-	60-95 °C	1

### 3.7.5 Datenauswertung

Die Ct-Werte der einzelnen Messungen wurden mit der SDS-Software (Applied Biosystems) bestimmt. Eine weitere Auswertung und Berechnung der NRQ erfolgte mit qBASE (Version 1.3.5, Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Entwickler: Jan Hellemans und Jo Vandesompele) (Hellemans *et al.* 2007).

Für die Normalisierung wurden GAPDH und RPL13A, die in gesundem und pathologischem Lebergewebe stabil exprimiert werden (Kim & Kim 2003), als *housekeeping* Gene eingesetzt.

Die Amplifikationseffizienzen für jedes Primerpaar wurden über Verdünnungsreihen mit HL-60-cDNA ermittelt.

### 3.8 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurden sogenannte nichtparametrische Tests eingesetzt. Diese werden auch als verteilungsfreie Tests bezeichnet, da sie keine genauen Annahmen über die Verteilungsform der Merkmale der betrachteten Stichproben machen. Im Gegensatz dazu stehen parametrische bzw. verteilungsgebundene Tests, wie z.B. der t-Test, der auf den Annahmen basiert, dass die Stichproben normalverteilt sind und gleiche Varianzen besitzen. Nichtparametrische Tests sind weniger restriktiv und können angewendet werden, wenn die Messvariablen ordinal- oder nominalskaliert sind oder wenn sie zwar metrisch skaliert, aber eben nicht normalverteilt sind. Sie besitzen jedoch gegenüber parametrischen Tests eine geringere Trennschärfe bzw. Teststärke, gerade weil die Annahmen über die Verteilung nicht mit in den Test eingehen. Nichtparametrische Tests basieren in der Regel auf Rangziffern oder Häufigkeiten von Variablenwerten. Die Verwendung von z.B. Rangziffern an Stelle von

Variablenwerten führt zu einem gewissen Informationsverlust, der die geringere Teststärke begründet (Janssen & Laatz 2007).

Um z.B. Unterschiede von Mittelwerten bzw. zentrale Lagen der Verteilung zweier oder mehrerer Stichproben aufzuzeigen, werden statistische Hypothesen-Tests verwendet. Dabei wird eine Forschungshypothese aufgestellt, die einen Unterschied zwischen zwei untersuchten Populationen postuliert. Die Forschungshypothese kann gerichtet oder ungerichtet sein und wird in eine Alternativhypothese ( $H_1$ ) überführt. Die  $H_1$  kann postulieren, dass sich der Populationsparameter  $\mu$ , z.B. der Mittelwert, der Populationen A und B unterscheidet (ungerichtete Hypothese) oder dass  $\mu$  in einer Population (A) größer ist als in der anderen (B) (gerichtete Hypothese). Dagegen geht die Nullhypothese ( $H_0$ ) davon aus, dass die Vorschläge der  $H_1$  nicht zutreffen.

$H_1: \mu_A \neq \mu_B$  und  $H_0: \mu_A = \mu_B$  (ungerichtete Hypothese)

$H_1: \mu_A > \mu_B$  und  $H_0: \mu_A \leq \mu_B$  (gerichtete Hypothese)

Die Überprüfung der ursprünglichen Forschungshypothese findet über eine Art indirekte Beweisführung statt. Die verwendeten Tests prüfen erst, in welchem Maß sich die  $H_0$  mit den Untersuchungsergebnissen vereinbaren lässt. Dazu wird die Überschreitungswahrscheinlichkeit berechnet, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass bei Gültigkeit von  $H_0$  das Untersuchungsergebnis oder ein noch extremeres Ergebnis erhalten wird. Ist die Gültigkeit von  $H_0$  bei den vorliegenden Untersuchungsergebnissen sehr unwahrscheinlich, wird angenommen, dass die aus der Forschungshypothese abgeleitete Alternativhypothese,  $H_1$ , zutrifft.

Vor der Durchführung statistischer Tests wird im Allgemeinen ein Signifikanzniveau festgelegt. Es kennzeichnet die maximal tolerierbare  $\alpha$ -Fehlerwahrscheinlichkeit, d.h. die Wahrscheinlichkeit, mit der sich irrtümlich für  $H_1$  entschieden wurde obwohl eigentlich  $H_0$  gültig ist ( $\alpha$ -Fehler). Das Signifikanzniveau wird anhand der Konsequenzen einer Fehlentscheidung festgelegt und beträgt üblicherweise 5% ( $\alpha = 0,05$ ) oder 1% ( $\alpha = 0,01$ ) (Bortz & Lienert 2003).

### 3.8.1 Vergleich verbundener Stichproben

Zur Untersuchung der Unterschiede von Gen- oder GSL-Expressionsniveaus zwischen Normal- und Tumorgewebe wurde der Wilcoxon-Test verwendet, der die zentrale Tendenz der Verteilungen von Merkmalen aus zwei verbundenen Stichproben vergleicht. Bei den

Expressionsdaten aus den malignen und gesunden Geweben handelt es sich um abhängige bzw. verbundene Stichproben, da Gewebeproben aus jeweils dem gleichen Patient verglichen werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Proben den Zustand des Gewebes vor und nach neoplastischer Transformation widerspiegeln. Die Expressionswerte eines bestimmten GSLs oder Gens, die für die beiden Gewebetypen eines Patienten bestimmt wurden, werden als Messwertpaare betrachtet.

Der Wilcoxon-Test beruht auf Rängen von Differenzen in den Variablenwerten. Differenzen der Messwertpaare werden berechnet und nach absoluten Werten in eine Rangordnung gebracht. Danach werden die Rangziffern jeweils für die positiven und die negativen Differenzen aufsummiert. Als Prüfgröße für den Test wird die Differenz der Summen berechnet. Besteht kein Unterschied in der Lage der beiden Verteilungen, trifft also  $H_0$  zu, beträgt die Differenz der Summen im Idealfall Null. Für kleine Stichprobenumfänge können kritische Prüfgrößenwerte zur Ablehnung von  $H_0$  Tabellen entnommen werden. Bei Stichproben mit  $N > 25$  ist die Prüfgröße approximativ normalverteilt, was zur Berechnung der Überschreitungswahrscheinlichkeit genutzt werden kann (Bortz & Lienert 2003).

### **3.8.2 Vergleich unabhängiger Stichproben**

Um den Einfluss von klinischen Parametern wie Tumorausdehnung, Metastasierungsverhalten und Differenzierungsgrad auf die Gen- bzw. GSL-Expression zu untersuchen, wurden statistische Tests verwendet, die Unterschiede der zentralen Tendenzen von Merkmalsverteilungen aus unabhängigen Stichproben aufzeigen. Da die zu vergleichenden Werte aus unterschiedlichen Individuen stammten, wurden sie als voneinander unabhängig betrachtet.

Lagen zwei Stichproben vor, z.B. zwei Patientengruppen mit und ohne Metastasen, wurde der Mann-Whitney-U (MWU)-Test angewendet, bei mehreren Stichproben der Kruskal-Wallis-H (KWH)-Test.

Die Tests wurden sowohl mit primären als auch sekundären Daten durchgeführt. Primäre Daten sind mit Hilfe von Densitometrie bestimmte GSL-Signale. Sekundäre Daten ergaben sich über Subtraktion der GSL-Signale aus Tumor- und Normalgewebe. Die Differenzen dienten als Maß für die Veränderung der Expressionsstärke.

Der MWU-Test basiert auf Rangplätzen. Die Werte beider Stichproben werden in einer Rangordnung aufsteigend sortiert, bevor die Prüfvariable  $U$  bestimmt wird.  $U$  entspricht der Anzahl an Messwerten der Stichprobe A, die vor denen der Stichprobe B liegen.  $U'$  entspricht umgekehrt der Anzahl an Messwerten der Stichprobe B, die vor denen der Stichprobe A

liegen. Der jeweils kleinere Wert wird als Prüfvariable  $U$  weiter verwendet. Bei kleinen Stichproben kann die Wahrscheinlichkeit, dass  $H_0$  zutrifft, von Tabellen mit kritischen Werten abgelesen werden (Bortz *et al.* 2000). Bei größeren Stichproben wird die Überschreitungswahrscheinlichkeit über die Normalverteilungsapproximation von  $U$  berechnet.

Für den KWH-Test werden Messwerte aller  $k$  Stichproben in eine gemeinsame Rangordnung gebracht, aus der die Prüfgröße  $H$  berechnet wird (Janssen & Laatz 2007).

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k R_i^2 / n_i - 3(n+1) \quad (4.10)$$

$R_i$  : Summe der Rangziffern der Stichprobe  $i$

$n_i$  : Fallzahl der Stichprobe  $i$

$n$  : Summe des Stichprobenumfangs aller  $k$  Gruppen

Bei großen Stichproben ist  $H$  approximativ  $\chi^2$ -verteilt mit  $k-1$  Freiheitsgraden.

### 3.8.3 Rangkorrelation

Als Maß für den Zusammenhang zwischen zwei Variablen wurde der Rangkorrelationskoeffizient  $\tau$  nach Kendall berechnet. Er testet auf einen stetigen Zusammenhang von zwei Variablen und kann auch nicht-lineare Zusammenhänge aufzeigen. Der Test erfolgt auf Ordinalskalenniveau, d.h. dass die vorliegenden Messvariablen in zwei Rangreihenfolgen eingeteilt werden. Der Test nach Kendall nutzt nur die relative Anordnung der Ränge von Messwertpaaren zueinander. Kendall's Korrelationskoeffizient  $\tau$  kann Werte zwischen  $-1$  und  $1$  annehmen. Die Ausprägung von  $\tau$  ist ein Maß für die Stärke und die Richtung des Zusammenhangs. Beträgt  $\tau = -1$  liegen zwei perfekt entgegengesetzt angeordnete Ranglisten bzw. ein inverser Zusammenhang vor. Beträgt  $\tau = 1$  sind die beiden Ranglisten perfekt gleich geordnet und es liegt ein gleichgerichteter Zusammenhang vor. Liegt ein Wert von  $0$  vor, wurde kein Zusammenhang gefunden. Kendalls  $\tau$  kann auch angewendet werden, wenn nicht-normalverteilte Variablen vorliegen und ist durch die ausschließliche Verwendung von ordinalen Zusammenhängen robust gegenüber Ausreißern. Aufgrund dessen wurde der Korrelationstest nach Kendall dem nach Spearman vorgezogen (Bortz & Lienert 2003).

### **3.8.4 Software-unterstützte Datenauswertung**

Alle Messdaten wurden mit SPSS (Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ausgewertet. Es wurden zweiseitige Tests zur Überprüfung ungerichteter Hypothesen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Um den Einfluss von Bindungen und kleinen Stichprobenumfängen zu berücksichtigen, wurden exakte Tests durchgeführt (Janssen & Laatz 2007). Im Fall des Kruskal-Wallis-H-Tests wurde die Monte-Carlo-Methode zur Bestimmung der Signifikanz verwendet.

## 4 Ergebnisse

### **4.1 *GSL-Expressionsanalyse durch DC, kombiniert mit immunchemischer Mehrfachfärbung und IR-MALDI-MS***

Die DC ist eine weit verbreitete Technik zur Analyse von GSL und ermöglicht in Verbindung mit dem Overlay-Assay eine hohe Sensitivität und Spezifität beim GSL-Nachweis (siehe Kapitel 3.5). Die Detektion mittels Overlay-Assay ist zerstörungsfrei und erlaubt somit eine zusätzliche massenspektrometrische Untersuchung der detektierten GSL. Dies kann indirekt nach Abkratzen der detektierten Banden und Extraktion der GSL oder auch direkt durch die Einführung der DC-Platte in ein Massenspektrometer und sofortige Desorption/Ionisation der GSL aus dem Kieselgel erfolgen (siehe Kapitel 3.6).

Ein großer Nachteil des einfachen Overlay-Assays ist jedoch, dass aufgrund der Verwendung eines einzelnen spezifischen Antikörpers nur ein Bruchteil der GSL nachgewiesen wird, die in komplexen Gemischen vorliegen. Trotz der Auftragung und DC-Trennung eines großen Spektrums von GSL-Spezies wird somit der Großteil der Probe gar nicht untersucht.

Für eine effizientere Nutzung der Proben und einen erhöhten Informationsgehalt der Analysen wurde im Rahmen dieser Arbeit das Verfahren der DC-Mehrfachimmunfärbung entwickelt. Dieses ermöglicht, bis zu drei Overlay-Assays auf einer DC-Platte durchzuführen und so bis zu drei GSL-Determinanten pro DC-Lauf nachzuweisen. Diese Vorgehensweise ist besonders vorteilhaft bei biologischen Proben, die nur in begrenzten Mengen vorliegen und mit größtmöglicher Informationsausbeute analysiert werden sollen, da mit der gleichen Menge an Probenmaterial die dreifache Anzahl an Analysen durchgeführt werden kann.

#### **4.1.1 Entwicklung der Methode**

Ein Verlaufschaema für die GSL-Expressionsanalyse durch DC-Mehrfachimmunfärbung und IR-MALDI-o-TOF-MS ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Sie besteht im Wesentlichen aus drei Schritten:

- (I) Auftrennung von komplexen GSL-Gemischen mittels DC.



- (II) Mehrfachimmunfärbung von GSL durch sequenzielle Anwendung von bis zu drei Overlay-Assays. In jeder Overlay-Assay-Runde wird eine zusätzliche GSL-Struktur nachgewiesen.
- (III) Weiterführende Strukturaufklärung der detektierten GSL über direkte Kopplung mit IR-MALDI-o-TOF-MS.

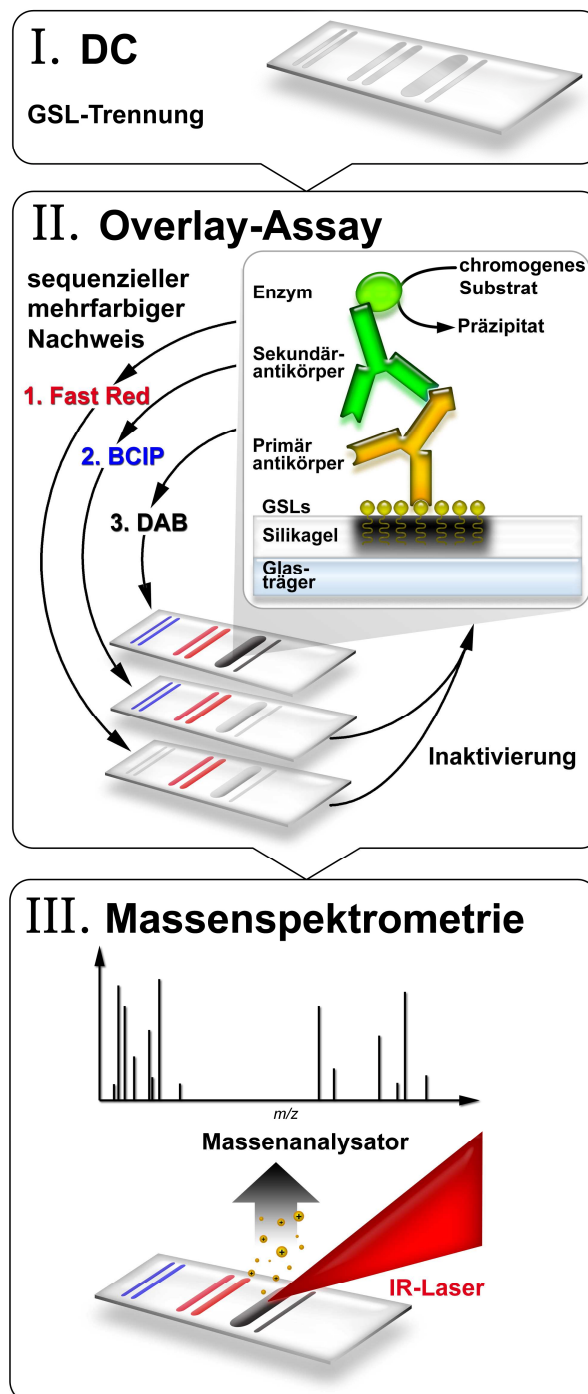


Abbildung 4.1: Schema des Arbeitsablaufs bei der GSL-Expressionsanalyse mittels DC-Mehrfachimmunfärbung und IR-MALDI-o-TOF-Massenspektrometrie. Quelle: modifiziert nach Souady *et al.* (2009).

Dabei werden im zweiten Schritt der Mehrfachimmunfärbung die Overlay-Assays aufeinander folgend durchgeführt. Jeder Assay beinhaltet die Verwendung eines Primärantikörpers, der an spezifische GSL-Strukturen bindet, und eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers, der an den Primärantikörper bindet. Das Enzym vermittelt im Detektionsschritt die Umsetzung eines Substrats in ein chromophores Präzipitat, so dass eine Färbung an den Stellen der nachzuweisenden GSL entsteht.

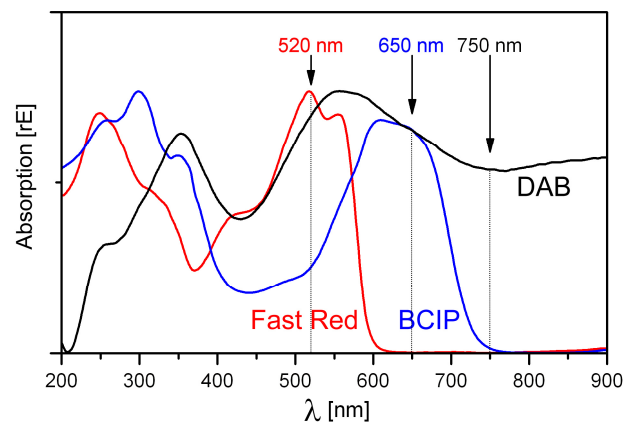
Zur Unterscheidung der detektierten GSL wurden unterschiedliche Enzym-Substrat-Systeme eingeführt, die Präzipitate unterschiedlicher Färbung produzieren. Für eine Dreifachimmunfärbung wurde Fast Red in Kombination mit Naphthol AS-MX-Phosphat als Substrat für die alkalische Phosphatase(AP)-katalysierte Färbung in der ersten Overlay-Assay-Runde eingesetzt. Dieses System produziert ein rotes Präzipitat. Für den zweiten Overlay-Assay wurde 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP) eingesetzt, das von AP in ein blaues Präzipitat umgesetzt wird. Im dritten Overlay-Assay wurde Diaminobenzidin (DAB) zum Nachweis von GSL verwendet, das in einer Meerrettichperoxidase (HRP)-vermittelten Reaktion und unter Zugabe von Nickelsalzen ein schwarzes Präzipitat liefert.

#### **4.1.1.1 Entwicklung eines mehrfarbigen immunchemischen Detektionssystems**

BCIP ist das Substrat, das bisher routinemäßig für den GSL-Overlay-Assay eingesetzt wurde. Für den Einsatz bei der Mehrfachimmunfärbung von GSL wurden verschiedene zusätzliche Substrate, die von AP und HRP zu farbigen Präzipitaten umgesetzt werden und sich deswegen für immunchemische Festphasenassays eignen, getestet. Hierzu zählen Neu Fuchsin, Fast Red, Variaminblau und NBT/BCIP für die AP, und AEC, DAB-Imidazol und DAB-Ni/Co für die HRP (siehe Kapitel 3.5.4).

Fast Red, BCIP und DAB wurden als beste Kombination ermittelt. Alle drei Substrate wiesen eine ähnliche Sensitivität auf. Färbungen von GSL-Verdünnungsreihen ergaben bei der Verwendung der drei Substrate vergleichbare Nachweisgrenzen (nicht gezeigt). Diese drei Substrate bieten gegenüber anderen vor allem den Vorteil, dass sie Präzipitate mit komplementären Absorptionsspektren produzieren, die eine spezifische densitometrische Quantifizierung der erhaltenen Signale erlauben. In Abbildung 4.2 sind die normierten Absorptionsspektren der Färbungen von Fast Red, BCIP und DAB für den Bereich von 200 nm bis 900 nm dargestellt. Fast Red zeigt die stärkste Absorption bei 520 nm, jedoch keine über 600 nm. BCIP weist maximale Absorption im Bereich um 300 nm und 650 nm auf, jedoch keine über 750 nm. DAB hingegen absorbiert, abgesehen vom Bereich um 200 nm,

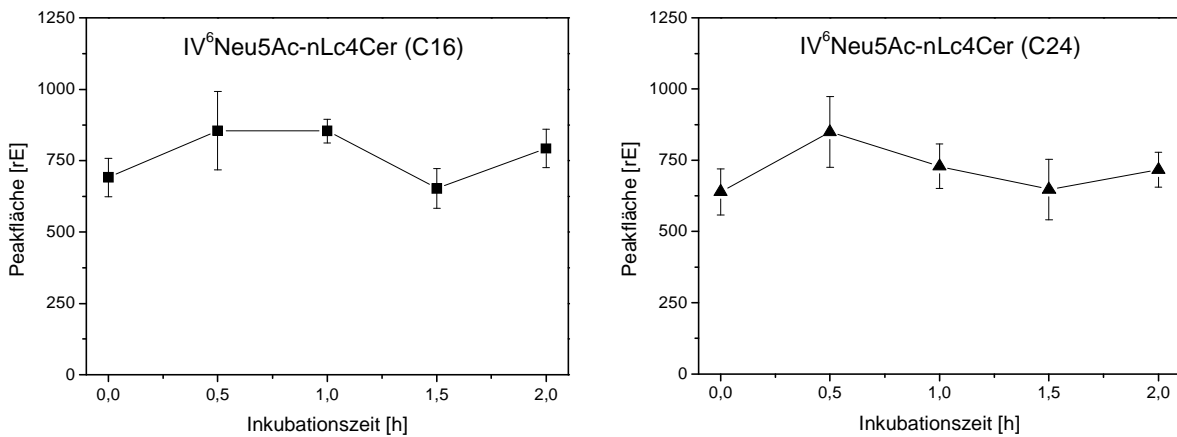
über das ganze gemessene Spektrum. Daraus folgt, dass DAB bei Wellenlängen über 750 nm trotz anwesender Färbungen von Fast Red und DAB spezifisch detektiert werden kann. BCIP kann ebenfalls bei Anwesenheit von Fast Red Signalen spezifisch bei Wellenlängen über 600 nm nachgewiesen werden. Bei der Mehrfachfärbung wurden demzufolge die Substrate in der Reihenfolge (1.) Fast Red, (2.) BCIP und (3.) DAB eingesetzt. Die Färbungen wurden jeweils direkt nach den Färbeschritten densitometrisch bei unterschiedlichen Wellenlängen analysiert. Signale von Fast Red und BCIP wurden, um eine größtmögliche Empfindlichkeit zu erreichen, bei ihren Absorptionsmaxima 520 nm bzw. 650 nm und DAB als letztes bei 750 nm detektiert. Durch diese Messungen ist es anschließend möglich Expressionsniveaus unterschiedlicher GSL aus verschiedenen Proben miteinander zu vergleichen, wie z.B. Tumor- und Normalgewebe.



**Abbildung 4.2:** Absorptionsspektren der in der Mehrfachimmunfärbung entstehenden Chromophore von Fast Red, BCIP und DAB. Die Spektren wurden von gefärbten GSL-Banden aufgenommen und entsprechend ihrer Maxima normalisiert. Die Wellenlängen für die densitometrische Detektion von Fast Red, BCIP und DAB sind 520, 650 bzw. 750 nm. Für eine spezifische Detektion müssen die Färbungen in dieser Reihenfolge stattfinden und die Densitometrie jeweils direkt im Anschluss an die jeweiligen Färbungen erfolgen (Souady *et al.* 2009).

#### 4.1.1.2 Inaktivierung zur Kopplung mehrerer Overlay-Assay-Runden

Die repetitive Immundetektion der GSL auf einer einzigen DC-Platte wirft einige Probleme auf. Zum einen kann die Verwendung von Primärantikörpern aus derselben Spezies dazu führen, dass die Sekundärantikörper bei einem nachfolgenden Assay eine Signalentwicklung auch an Stellen einer vorangegangenen Detektion verursachen. Zum anderen kann die wiederholte Verwendung der Enzyme AP und HRP ohne vorangehende Inaktivierung durch Restaktivität ein unerwünschtes Signal induzieren. Auf diese Weise käme es zu einigen Fehlinterpretationen.



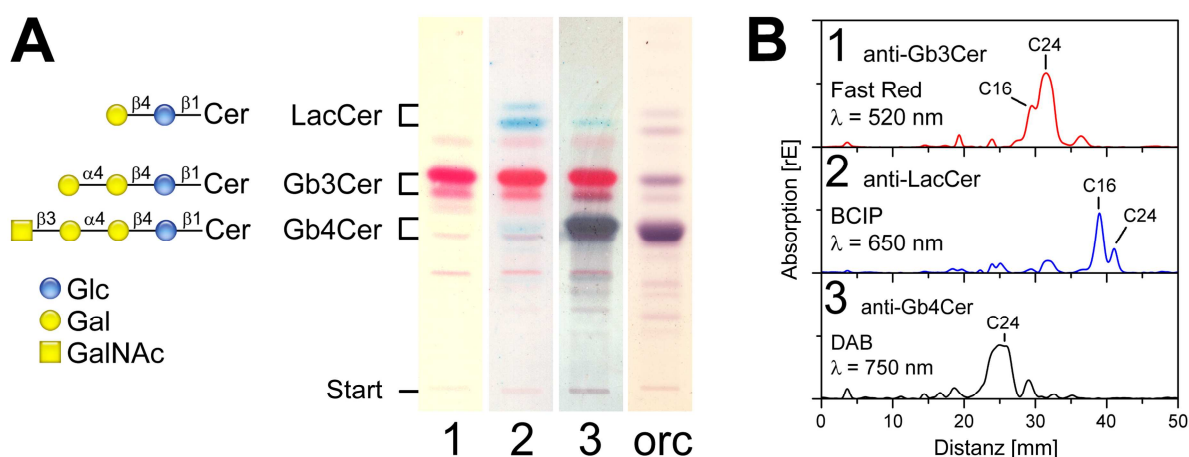
**Abbildung 4.3: Effekt der Hitzeinaktivierung auf die Signalausbeute des folgenden Overlay-Assays. Streifen von DC-Platten mit gleichen Mengen getrennter Ganglioside (aus humanen Granulozyten, JM07/7-1) wurden bis zu 2 h lang bei 140 °C trockener Hitze inkubiert. Danach erfolgte ein Overlay-Assay zum Nachweis von CD75s-Gangliosiden. Die Signalintensitäten für IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer mit C24- und C16-Fettsäure (obere bzw. untere Bande) wurden über Densitometrie bestimmt und gegen die Hitze-Inkubationsdauer aufgetragen. Es wurden Dreifachbestimmungen für jeden Zeitpunkt durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.**

Um diese Verschleppungseffekte zu vermeiden, wurden verschiedene Inaktivierungsmethoden untersucht.

Zur AP-Inaktivierung wurden Citrat- und EDTA-Lösungen bei erhöhten Temperaturen eingesetzt, da die AP auf zweiwertige Kationen angewiesen ist. Diese Kofaktoren werden durch Citrat und EDTA komplexiert, was zu einer Inhibierung der Aktivität und bei hohen Konzentrationen des Komplexbildners zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms führt (Deininger & Meyermann 1998). In einem weiteren Versuch wurden immungefärbte DC-Platten zur globalen Inaktivierung von Enzymen und Antikörpern einem Trypsinverdau unterzogen. Beide Methoden, die Komplexierung von Kationen und der Trypsinverdau, ließen sich jedoch nicht auf DC-Platten anwenden. Sie führten wiederholt und trotz vorangegangener Fixierung mit Plexigum zu einem Ablösen und Zerfall der Kieselgelschicht. Eine erfolgreiche Inaktivierung und Vermeidung von Verschleppungseffekten wurde über die Anwendung von trockener Hitze erzielt. Eine Inkubation über bis zu 2 h bei 140 °C zeigte bei DC-getrennten Gangliosiden keine Verringerung der Signalstärke im anschließenden Overlay-Assay, verhinderte jedoch erfolgreich Verschleppungseffekte (Abbildung 4.3). Auch über Massenspektrometrie wurden keine temperaturbedingten Strukturveränderungen offensichtlich (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurde daher als Verbindungsschritt zwischen zwei Overlay-Assay-Runden die Hitzeinaktivierung mit einer Inkubationsdauer von 90 min durchgeführt.

### 4.1.1.3 Nachweis und Charakterisierung von neutralen GSL mittels DC-Mehrfachimmunfärbung

Das Verfahren der Mehrfachimmunfärbung wurde anhand einer Referenzmischung von neutralen GSL aus humanen Erythrozyten entwickelt. Wie aus der Orcin-Färbung in Abbildung 4.4A ersichtlich wird, beinhaltet die Referenzmischung drei Hauptkomponenten: Laktosylceramid (LacCer, Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer), Globotriaosylceramid (Gb3Cer, Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer, GalNAc $\beta$ 3Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc $\beta$ 1Cer). Die neutralen GSL wurden mittels DC in erster Linie aufgrund ihrer Glykostruktur und darüber hinaus aufgrund der N-Acylgruppe ihres Ceramidteils aufgetrennt, was im Fall von LacCer und Gb3Cer zur Auftrennung Doppelbanden führt. Die oberen und unteren Banden enthalten hauptsächlich GSL mit langkettigen C24- bzw. kurzkettigen C16-Fettsäuren, die jeweils als Amid an Sphingosin (d18:1) gebunden sind.



**Abbildung 4.4:** Mehrfachimmunfärbung von DC-getrennten neutralen GSL aus humanen Erythrozyten. (A) GSL wurden in einer Gesamtmenge von 8  $\mu$ g und 4  $\mu$ g für die Orcin- (orc) bzw. Mehrfachimmunfärbung aufgetragen. Bei der Mehrfachfärbung wurden sequenziell drei unterschiedliche GSL in einer Bahn mit jeweils verschiedenen Antikörpern und Detektionssystemen nachgewiesen: (1) Gb3Cer mit Fast Red, (2) LacCer mit BCIP und (3) Gb4Cer mit DAB. (B) Durch Densitometrie ermittelte Chromatogramme der einzelnen Färbungen. Diese sind durch direkte Messung nach den jeweiligen Overlay-Assay-Runden und durch die Variation der Detektionswellenlänge ( $\lambda = 520 / 650 / 750$  nm) spezifisch für die jeweilige Färbung (Souady *et al.* 2009).

Mit Hilfe der Mehrfachimmunfärbung konnten alle drei Komponenten in einer Bahn nachgewiesen werden (Abbildung 4.4A, Bahnen 1-3). Dabei wurde Gb3Cer als erstes mit Fast Red, LacCer als zweites mit BCIP und Gb4Cer als drittes mit DAB nachgewiesen. Die

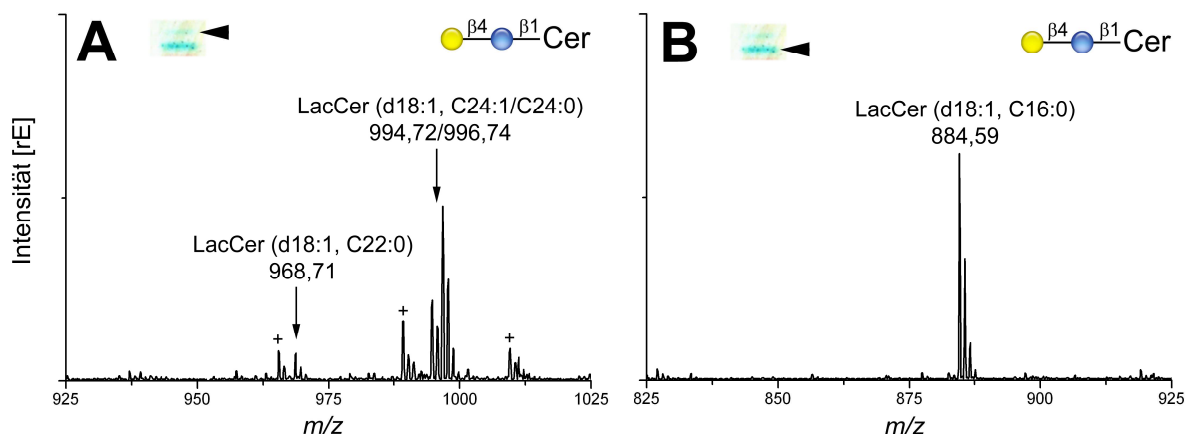
GSL-bindenden Antikörper waren in allen drei Assay-Runden polyklonale Huhn IgY Antikörper, jeweils spezifisch für Gb3Cer, LacCer und Gb4Cer. Der Einsatz von drei unterschiedlichen Substraten ermöglicht eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Färbungen. Diese konnten zudem densitometrisch spezifisch quantifiziert werden (Abbildung 4.4B). Die einzelnen Chromatogramme zeigen keine Beeinflussung durch die jeweiligen vorhergehenden Färbungen. Mit Ausnahme der BCIP-Färbung von LacCer, deren Intensität leicht abnahm, waren alle Farbstoffe über die Mehrfachfärbung stabil.

#### **4.1.1.4 DC-IR-MALDI-o-TOF-MS von mehrfach immungefärbten GSL**

Die immungefärbten GSL LacCer, Gb3Cer und Gb4Cer aus der Dreifachfärbung (vgl. Abbildung 4.4A) wurden mit Hilfe der IR-MALDI-o-TOF-MS genauer charakterisiert. Massenspektren wurden im Positivionenmodus aufgenommen und sind in Abbildung 4.5 bis Abbildung 4.7 dargestellt.

Die GSL wurden hauptsächlich als einfach geladene Natrium-Addukte des Typs  $[M+Na]^+$ , in wenigen Fällen auch als zweifach-Addukte des Typs  $[M+2Na-H]^+$  detektiert. Bei sogenannten „heißen“ Bedingungen, d.h. hoher Laserintensität und niedrigem Gasdruck in der Ionenquelle, wurden zusätzliche Signale von protonierten GSL-Molekülen,  $[M+H]^+$ , sowie von deren Produkten nach Eliminierung von  $H_2O$ ,  $[M-OH]^+$ , erhalten. Über diese Signalaufspaltung verringert sich die Sensitivität der Messung und es kann aufgrund der zunehmenden Komplexität des Spektrums zu einer Überlagerung von Signalen verschiedener GSL-Spezies kommen. Zusätzlich nimmt das Maß der Fragmentierung bei „heißen“ Bedingungen zu, da die Analyten durch erhöhte Laserintensität stärker angeregt werden und diese Energie aufgrund des geringeren Drucks in der Ionenquelle nicht über Kollisionen mit dem umgebenden Gas abbauen können. Bei kalten Bedingungen (entsprechend geringe Laserintensität und hoher Druck) wird hingegen pro Laserschuss eine geringere Ionenausbeute erzielt. Dafür sinkt das Ausmaß der Fragmentierung von GSL-Ionen. Die Bedingungen bei der Ionisation wurden gerade so „kalt“ eingestellt, dass GSL nur als Natrium-Addukte detektiert wurden und somit eine möglichst hohe Sensitivität erreicht wurde. Unter den optimierten Bedingungen wurde nur ein geringes Maß an Fragmentierung beobachtet.

Die Nachweisgrenzen der Mehrfachimmunfärbung und der IR-MALDI-o-TOF-MS für die neutralen GSL wurden über Verdünnungsreihen bestimmt und sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

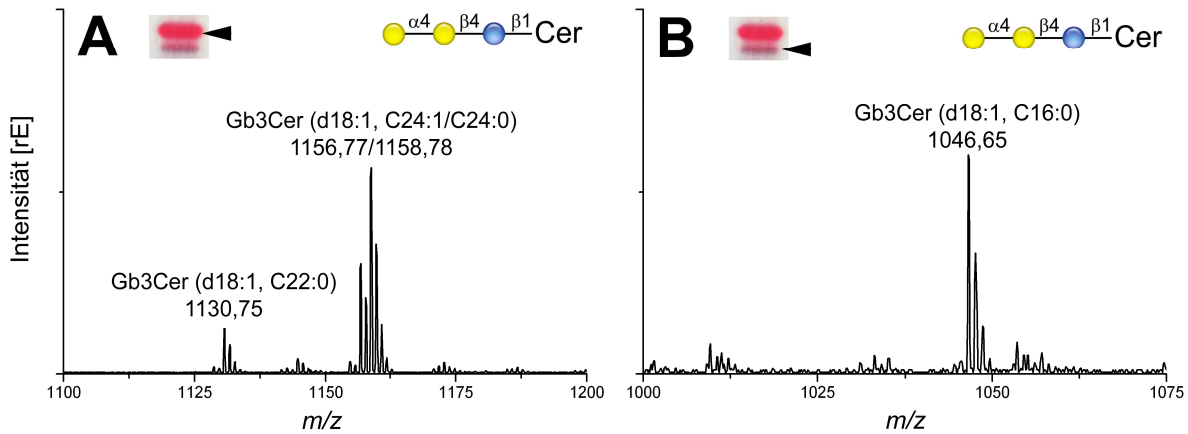


**Abbildung 4.5:** (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von LacCer. Massenspektren wurden nach der Overlay-Assay-Mehrfachimmunfärbung direkt von der oberen (A) und unteren (B) BCIP-gefärbten, LacCer-positiven Bande aufgenommen (vgl. Abbildung 4.4). Die jeweils untersuchte Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. GSL wurden als  $[M+Na]^+$  Ionen detektiert. Kreuze markieren Signale unbekannter Substanzen (Souady *et al.* 2009).

Abbildung 4.5 zeigt die Massenspektren von den Anti-LacCer, BCIP-gefärbten Banden aus der Mehrfachfärbung. In der schwach gefärbten oberen Bande wurde LacCer mit gesättigter und einfach ungesättigter C24 Fettsäure, LacCer (d18:1, C24:0) und LacCer (d18:1, C24:1), mit  $m/z$  994,72 bzw. 996,74 detektiert (Abbildung 4.5A). Als schwaches Signal konnte LacCer (d18:1, C22:0) bei  $m/z$  968,71 nachgewiesen werden. In der intensiven unteren Bande wurde LacCer mit einer kurzkettigen Fettsäure, LacCer (d18:1, C16:0) mit  $m/z$  884,59, detektiert (Abbildung 4.5B).

Der blaue Indigo-Farbstoff, 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo, der bei der Umsetzung von BCIP entsteht (Holt & Sadler 1958), wurde als Molekülion  $M^{++}$  mit  $m/z$  485,81 detektiert, beeinträchtigte jedoch nicht die MS-Analyse der GSL (nicht gezeigt).

Die LacCer-Massenspektren wurden von Banden mit 105 ng LacCer (d18:1, C24:1/C24:0) und 224 ng LacCer (d18:1, C16:0) aufgenommen. Die Nachweisgrenzen für LacCer betragen bei der MS-Analyse 52,7 ng bzw. 44,8 ng und bei der Mehrfachimmunfärbung jeweils 10,5 ng bzw. 11,2 ng für die Spezies mit der langkettigen und kurzkettigen Fettsäure (vgl. Tabelle 4.1).



**Abbildung 4.6:** (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von Gb3Cer. Massenspektren wurden nach der Overlay-Assay-Mehrfachimmunfärbung direkt von der oberen (A) und unteren (B) Fast Red-gefärbten, Gb3Cer-positiven Bande aufgenommen (vgl. Abbildung 4.4). GSL wurden als  $[M+Na]^+$  Ionen detektiert (Souady *et al.* 2009).

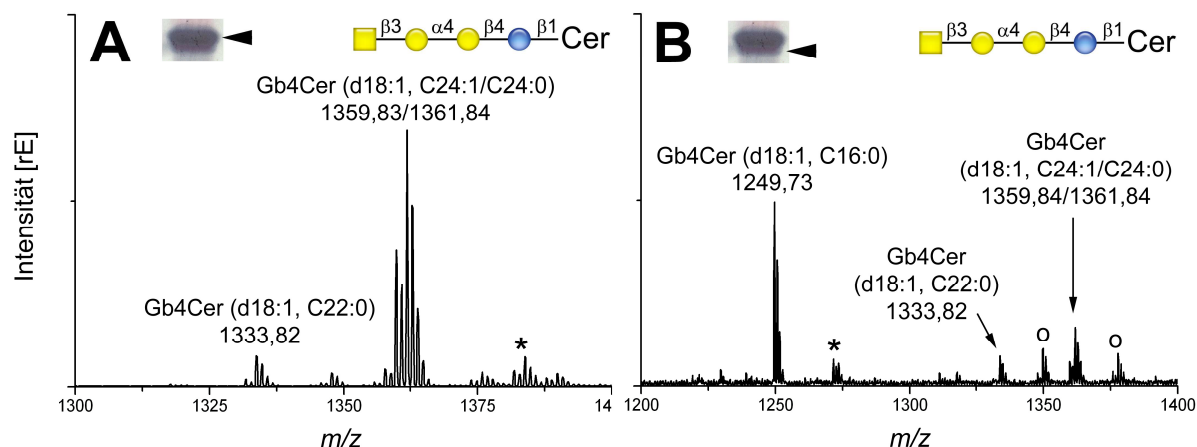
DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von der roten, Fast Red-gefärbten Anti-Gb3Cer-Doppelbande sind in Abbildung 4.6 dargestellt. In der stark gefärbten oberen Bande wurden Gb3Cer (d18:1, C24:0) und Gb3Cer (d18:1, C24:1) als  $[M+Na]^+$ -Ionen mit  $m/z$  1156,77 bzw. 1158,78 als Hauptkomponenten detektiert (Abbildung 4.6A). Mit geringerer Intensität wurden Signale von Gb3Cer (d18:1, C22:0) bei  $m/z$  1130,75 und Gb3Cer-Spezies mit ungewöhnlichen Fettsäuren nachgewiesen. Hierzu zählen Gb3Cer-Spezies mit besonders langkettigen Fettsäuren, C26:1 und C26:0 bei  $m/z$  1184,80 bzw. 1186,79, und solche mit einer Fettsäure, die eine ungerade Anzahl an Kohlenstoffatomen aufweist, C23:0, C25:1 und C25:0 bei  $m/z$  1144,76, 1170,77 bzw. 1172,78 (vgl. Tabelle 4.2).

In der schwächeren unteren Fast Red-gefärbten Bande wurden Ionen von Gb3Cer (d18:0, C16:0) mit  $m/z$  1046,65 detektiert (Abbildung 4.6B).

Es wurden keine Signale gefunden, die dem Azo-Farbstoff zugeordnet werden konnten, der bei der AP-katalysierten Reaktion von Fast Red und Naphthol-AS-MX-Phosphat entsteht. Dies ist durch die Löslichkeit des Farbstoffs in organischen Lösungsmitteln zu erklären. Der Farbstoff wird bei der Vorbereitung der Platten für die MS Analyse zusammen mit dem Fixativ Plexigum durch Chloroform aus dem Kieselgel extrahiert.

Die Gb3Cer-Massenspektren aus Abbildung 4.6 wurden von Banden mit 681 ng Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) und 168 ng Gb3Cer (d18:1, C16:0) aufgenommen. Die Nachweisgrenzen für Gb3Cer betragen bei der MS-Analyse 34,1 ng und 33,6 ng, bei der Mehrfachimmunfärbung 6,8 ng und 8,4 ng für die Spezies mit der langkettigen bzw. kurzkettigen Fettsäure (vgl. Tabelle 4.1).





**Abbildung 4.7:** (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von Gb4Cer. Massenspektren wurden nach der Overlay-Assay-Mehrfachimmunfärbung direkt von der oberen (A) und unteren (B) DAB-gefärbten, Gb4Cer-positiven Bande aufgenommen (vgl. Abbildung 4.4). GSL wurden vorwiegend als  $[M+Na]^+$  Ionen detektiert, seltener als  $[M+2Na-H]^+$  Ionen (mit Sternchen markiert). Signale von GSL mit hydroxylierten Fettsäuren sind mit Kreisen gekennzeichnet (vgl. Tabelle 4.2) (Souady *et al.* 2009).

Die Massenspektren von DAB-gefärbten Anti-Gb4Cer Banden sind in Abbildung 4.7 gezeigt. Die Färbung ergab eine sehr dominante obere Bande, in der als Hauptkomponenten Gb4Cer (d18:1, C24:1) und Gb4Cer (d18:1, C24:0) als  $[M+Na]^+$ -Ionen mit  $m/z$  1359,83 bzw. 1361,84 und als  $[M+2Na-H]^+$ -Ionen mit  $m/z$  1381,80 bzw. 1383,82 detektiert wurden (Abbildung 4.7A). Daneben konnte Gb4Cer (d18:1, C22:0) mit  $m/z$  1333,82 nachgewiesen werden. Analog zu den Massenspektren von Gb3Cer wurden auch hier seltene Ionen von Gb4Cer Spezies mit besonders langen Fettsäureketten, C26:1 und C26:0 mit  $m/z$  1387,86 bzw. 1389,88, und ungeraden Fettsäurekettenlängen, C23:0, C25:1 und C25:0 mit  $m/z$  1347,83, 1373,84 bzw. 1375,85, detektiert.

In der schwach gefärbten unteren Bande wurden neben der Hauptkomponente Gb4Cer (d18:1, C16:0) bei  $m/z$  1249,73 ( $[M+Na]^+$ ) und  $m/z$  1271,73 ( $[M+2Na-H]^+$ ) auch Spezies mit langen *N*-Acylgruppen nachgewiesen, die im Fall von Gb4Cer mit C22:0-, C24:1- und C24:0-Fettsäuren ( $m/z$  1349,83, 1375,82 bzw. 1377,85) aufgrund der unvollständigen Trennung der Doppelbanden im Massenspektrum der unteren Bande erscheinen (Abbildung 4.7B). Im Fall der Signale bei  $m/z$  1349,83, 1375,82 und 1377,85 handelt es sich um Gb4Cer Spezies mit den hydroxylierten Fettsäuren h22:0, h24:1 bzw. h24:0. Aufgrund der zusätzlichen Hydroxylierung zeigen diese Gb4Cer Spezies mit langkettigen Fettsäuren eine erhöhte Retention im Kieselgel und demzufolge eine geringere Laufhöhe bei der DC-Trennung.

Die Strukturvorschläge für die GSL Spezies wurden durch nanoESI-QTOF-MS bestätigt (Souady *et al.* 2009, *Supporting Information*). Dazu wurden Lithium-Addukte von den neutralen GSL erzeugt. Diese erlaubten durch CID-Experimente eine Aufklärung der

Ceramidstruktur. Sowohl GSL mit Fettsäuren, die eine ungerade Anzahl an Kohlenstoffatomen besitzen, als auch solche mit einer zusätzlichen Hydroxylierung konnten charakterisiert werden. Fragmentierungsexperimente der hydroxylierten Spezies lieferten diagnostische Ionen für  $\alpha$ -Hydroxyfettsäuren (Souady *et al.* 2009).

Bei der HRP-katalysierten Farbreaktion wird DAB in ein stark verzweigtes Phenazin-Polymer umgesetzt (Graham & Karnovsky 1966; Seligman *et al.* 1968), das jedoch nicht mit der direkten IR-MALDI-MS-Analyse der gefärbten GSL interferierte.

Die Gb4Cer-Massenspektren aus Abbildung 4.7 wurden von Banden mit 2,3  $\mu$ g Gb4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) und 57 ng Gb4Cer (d18:1, C16:0) aufgenommen. Die Nachweisgrenzen für Gb4Cer betragen bei der MS-Analyse 22,8 ng und 28,7 ng, bei der Mehrfachimmunfärbung 11,4 ng und 2,9 ng für die Spezies mit der langkettigen bzw. kurzkettigen Fettsäure (vgl. Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Nachweisgrenzen der DC-Mehrfachimmunfärbung und der darauffolgende Analyse mit IR-MALDI-o-TOF-MS von neutralen GSL aus humanen Erythrozyten (Souady *et al.* 2009).**

GSL <sup>a</sup>	DC- Immunfärbung <sup>b</sup> [ng]	IR-MALDI- o-TOF-MS <sup>c</sup> [ng]	Färbung
LacCer (C24)	10.5	52.7	BCIP-AP
LacCer (C16)	11.2	44.8	BCIP-AP
Gb3Cer (C24)	6.8	34.1	Fast Red-AP
Gb3Cer (C16)	8.4	33.6	Fast Red-AP
Gb4Cer (C24)	11.4	22.8	DAB-HRP
Gb4Cer (C16)	2.9	28.7	DAB-HRP

<sup>a</sup> neutrale GSL wurden mittels DC in eine obere (C24) und untere (C16) Bande getrennt (siehe Abbildung 4.4)

<sup>b</sup> die Nachweisgrenzen wurden über densitometrische Messungen von mehrfach immungefärbten GSL-Verdünnungsreihen bestimmt.

<sup>c</sup> die Nachweisgrenzen wurden mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS von mehrfach immungefärbten GSL-Verdünnungsreihen bestimmt.

**Tabelle 4.2:** Auflistung aller mit DC-IR-MALDI-o-TOF-MS detektierten, mehrfach-immungefärbten, neutralen GSL aus humanen Erythrozyten. Für die jeweiligen untersuchten GSL-Banden werden Strukturvorschläge mit experimentell bestimmten und den theoretischen monoisotopischen  $m/z$ -Werten gezeigt (Souady *et al.* 2009).

Untersuchte Bande <sup>a</sup>	Strukturvorschlag <sup>b</sup>	$m/z$ (exp.) <sup>c</sup>	$m/z$ (theoret.)
Obere Bande	LacCer (d18:1, C22:0)	968.71	968.70
	<b>LacCer (d18:1, C24:1)</b>	994.72	994.72
	<b>LacCer (d18:1, C24:0)</b>	996.74	996.73
Untere Bande	<b>LacCer (d18:1, C16:0)</b>	884.59	884.61
Obere Bande	Gb3Cer (d18:1, C22:1)	1128.74	1128.74
	Gb3Cer (d18:1, C22:0)	1130.75	1130.75
	Gb3Cer (d18:1, C23:0)	1144.76	1144.77
	<b>Gb3Cer (d18:1, C24:1)</b>	1156.77	1156.77
	<b>Gb3Cer (d18:1, C24:0)</b>	1158.78	1158.79
	Gb3Cer (d18:1, C25:1)	1170.77	1170.79
	Gb3Cer (d18:1, C25:0)	1172.78	1172.80
	Gb3Cer (d18:1, C26:1)	1184.80	1184.80
	Gb3Cer (d18:1, C26:0)	1186.79	1186.82
Untere Bande	<b>Gb3Cer (d18:1, C16:0)</b>	1046.65	1046.66
Obere Bande	Gb4Cer (d18:1, C22:1)	1331.79	1331.82
	Gb4Cer (d18:1, C22:0)	1333.82	1333.83
	Gb4Cer (d18:1, C23:0)	1347.83	1347.85
	<b>Gb4Cer (d18:1, C24:1)</b>	1359.83	1359.85
	<b>Gb4Cer (d18:1, C24:0)</b>	1361.84	1361.86
	Gb4Cer (d18:1, C25:1)	1373.84	1373.86
	Gb4Cer (d18:1, C25:0)	1375.85	1375.88
	Gb4Cer (d18:1, C24:1)*	1381.80*	1381.83
	Gb4Cer (d18:1, C24:0)*	1383.82*	1383.85
	Gb4Cer (d18:1, C26:1)	1387.86	1387.88
	Gb4Cer (d18:1, C26:0)	1389.88	1389.90
Untere Bande	<b>Gb4Cer (d18:1, C16:0)</b>	<b>1249.73</b>	<b>1249.74</b>
	Gb4Cer (d18:1, C16:0)*	1271.73*	1271.72
	Gb4Cer (d18:1, h22:0)	1349.83	1349.83
	Gb4Cer (d18:1, h24:1)	1375.82	1375.84
	Gb4Cer (d18:1, h24:0)	1377.85	1377.86

<sup>a</sup> Immunfärbung in Verbindung mit BCIP (LacCer, siehe Abbildung 4.5), Fast Red (Gb3Cer, siehe Abbildung 4.6) und DAB (Gb4Cer, siehe Abbildung 4.7)

<sup>b</sup> Hauptkomponenten einer Bande sind fett gedruckt

<sup>c</sup> detektierte Ionen sind Natriumaddukte vom Typ  $[M+Na]^+$ , Ausnahmen bilden seltene  $[M+2Na-H]^+$ -Ionen bei Gb4Cer (mit „\*“ markiert).

## 4.2 GSL-Expression von HCC

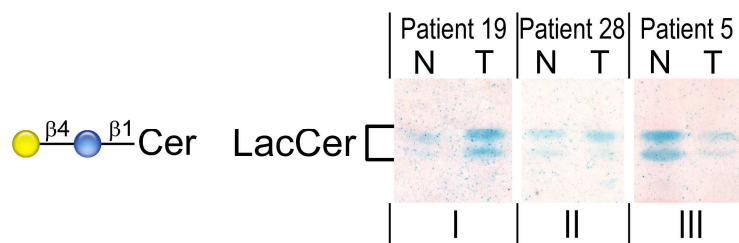
Die GSL-Expression in Gewebeproben von Patienten mit HCC wurde mittels DC-Overlay-Assays untersucht, um Tumor-assoziierte GSL zu identifizieren. Eine weitere Charakterisierung der GSL-Strukturen erfolgte mit Hilfe der Massenspektrometrie.

Es wurden vergleichende Expressionsanalysen durchgeführt, d.h., dass für jeden Patienten die GSL-Expressionsniveaus sowohl im malignen als auch normalen Lebergewebe bestimmt und einander gegenübergestellt wurden. Um vergleichbare Ergebnisse aus allen Gewebeproben zu erhalten, wurden die Lipid-Rohextrakte bei der DC auf ein konstantes Gewebegewicht normiert aufgetragen.

Es wurden Untersuchungen für die neutralen GSL LacCer, Gb3Cer und Gb4Cer mit Hilfe des zuvor entwickelten DC-Overlay-Assays mit Mehrfachfärbung durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Expression von Gangliosiden mit terminalen CD75s- und iso-CD75s-Epitopen untersucht.

### 4.2.1 LacCer

Im Rahmen der Mehrfachfärbung von neutralen GSL in HCC wurde die Expression von LacCer, der zentralen Vorstufe in der Biosynthese komplexer GSL, untersucht. Es dient dabei als Substrat, um das die verschiedenen Glykosyltransferasen konkurrieren, die die Grundstrukturen für die einzelnen GSL-Serien bilden.



**Abbildung 4.8: Anti-LacCer-Overlay-Assay von Lipidextrakten aus Tumor- (T) und normalem Vergleichsgewebe (N) der Leber. Die LacCer-Expression wurde im zweiten Zyklus der GSL-Mehrfachfärbung mit Hilfe eines anti-LacCer Antikörpers und dem BCIP-Detektionssystem bestimmt. Bei der Analyse wurden Probenmengen eingesetzt, die einem Gewebegewicht von 1,5 mg entsprechen. Patienten wurden in drei Kategorien eingeteilt: (I) LacCer-Überexpression, (II) gleiche Expression und (III) verringerte Expression im Tumorgewebe.**

Zur LacCer-Expressionsanalyse wurden Lipid-Rohextrakte in Mengen entsprechend einem konstanten Gewebegewicht von 1,5 mg aufgetragen. Wie bereits zuvor beschrieben (Kapitel 4.1.1.3) wurde LacCer in der zweiten Runde der Mehrfachfärbung mit einem Anti-LacCer Antikörper und durch das BCIP-Detektionssystem nachgewiesen. Dies ergibt eine blaue LacCer-positive Banden, was in Abbildung 4.8 für drei Probenpaare beispielhaft dargestellt ist.

Die Patienten wurden anhand der Differenz ihrer LacCer-Expression in Normal- und Tumorgewebe in drei Kategorien eingeteilt: (I) Überexpression in malignem Gewebe, (II) gleiche Expression und (III) verringerte Expression in malignem Gewebe. Wie aus Tabelle 8.2 zu entnehmen ist, wurde nur in 9,4% aller Patienten eine Überexpression festgestellt; 12,5% zeigten keine Veränderung der Expression; während mit 78,1% für die Mehrheit der Proben eine verringerte Expression im Tumorgewebe festgestellt werden konnte.

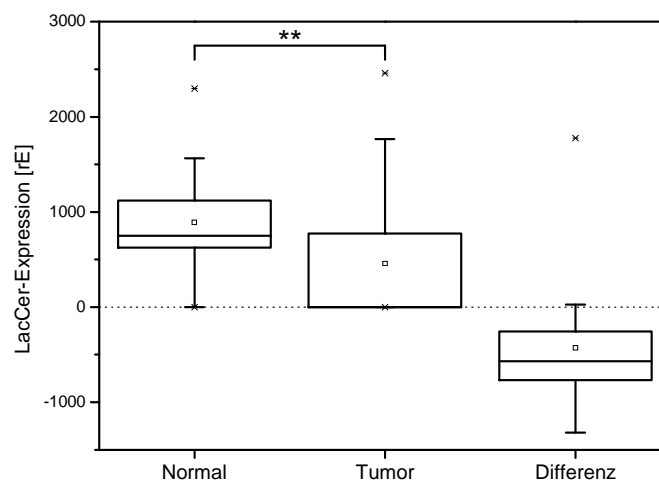
Die Verteilungen der LacCer-Expression in Tumor- und Normalgewebe werden in Abbildung 4.9 in Form von Box-Plot-Diagrammen veranschaulicht. Dabei markieren die waagerechten Striche der „Box“ die Höhe der Quartile, d.h. unter dem untersten Strich befinden sich 25%, unter dem mittleren Strich 50% und unter dem oberen Strich 75% der Datenpunkte. Das 50%-Quartil wird auch als Median bezeichnet und ist neben dem arithmetischen Mittel (in der Box als kleines Quadrat eingezeichnet) ein Maß für die zentrale Tendenz der Verteilung. Der Median ist weniger empfindlich gegenüber Ausreißern als das arithmetische Mittel. Die „Whisker“ markieren die Werte, unter denen sich 5% und 95% der Messwerte befinden, und werden auch als 5%- und 95%-Quantile bezeichnet. Die Maxima und Minima der Verteilungen werden durch Kreuze markiert. Die LacCer-Expression in HCC-Gewebe zeigt im Vergleich zum entsprechenden normalen Gewebe eine deutliche Abnahme. In vielen HCC-Proben lag die LacCer-Konzentration unter der Nachweisgrenze. Aus der Auftragung der Differenzwerte, die sich aus der Subtraktion der Expressionswerte des normalen von malignen Gewebe eines jeden Patienten ergeben, wird dies besonders deutlich. Der Unterschied in der LacCer-Expression ist statistisch hoch signifikant ( $p = 0,001$ ).

Trotz der unterschiedlichen Expression wurde ein stetiger Zusammenhang zwischen der LacCer-Expressionstärke in normalem und malignem Lebergewebe gefunden ( $p = 0,004$  /  $\tau = 0,391$ ). Das bedeutet, dass ein Patient, der im Vergleich zu anderen Patienten eine relativ hohe LacCer-Expression in normalem Lebergewebe hat, auch tendenziell eine hohe LacCer-Expression im HCC-Gewebe relativ zu der anderer Patienten besitzt.

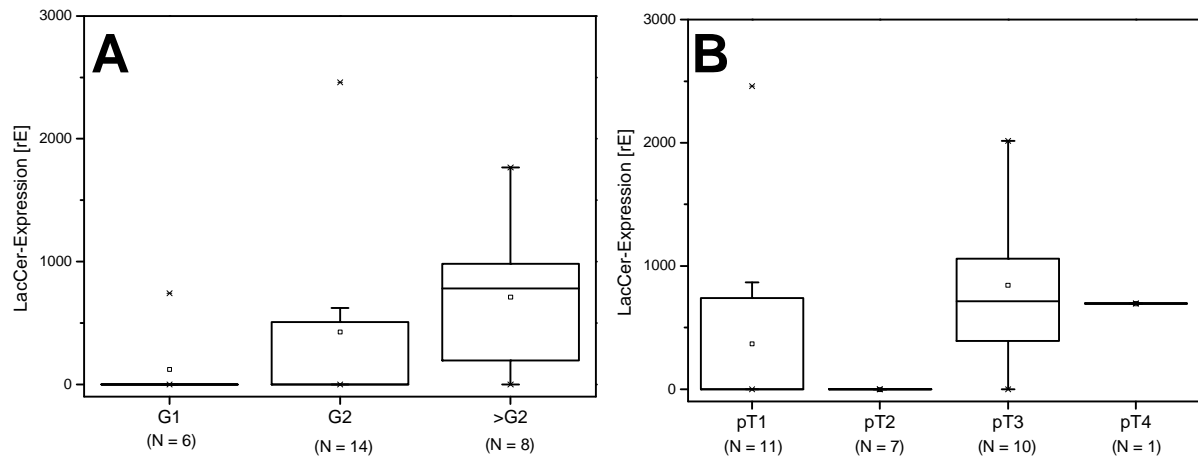
Über Korrelationstests wurden Zusammenhänge zwischen der LacCer-Expression und verschiedenen pathologischen Parametern, wie der Ausdehnung des Primärtumors pT, dem Differenzierungsgrad G und dem Zirrhose-Status untersucht. Parameter, wie das Auftreten von regionalen Lymphknotenmetastasen pN und Fernmetastasen pM, konnten nicht untersucht werden, da der HCC-Datensatz für diese Parameter nur unzureichende Stichprobengrößen bereitstellt, die keine zuverlässigen statistischen Tests zulassen. So wurden beispielsweise nur bei drei Patienten Fernmetastasen diagnostiziert. Ebenso wurde nur bei zwei Patienten ein Befall der Lymphknoten ermittelt. Dies ist durch die Operationsmethode zu erklären, die bei der Mehrheit der Patienten durchgeführt wurde. Im Rahmen der Resektionen hepatozellulärer Karzinome wurde keine Lymphadenektomie durchgeführt, so dass eine Aussage zum N-Status nicht möglich war.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse von LacCer-Expression und pathologischen Parametern ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Die LacCer-Expression in beiden Gewebetypen zeigte einen Zusammenhang mit der Ausdehnung des Primärtumors, pT, (Abbildung 4.10B; Normalgewebe:  $p = 0,017 / \tau = 0,353$ ; Tumorgewebe  $p = 0,012 / \tau = 0,399$ ). Für die LacCer-Expression im Tumorgewebe wurde zusätzlich ein Zusammenhang mit fehlender Differenzierung gefunden (Abbildung 4.10A;  $p = 0,029 / \tau = 0,363$ ).

Zwischen LacCer-Expression und dem Zirrhose-Status der Patienten konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden.



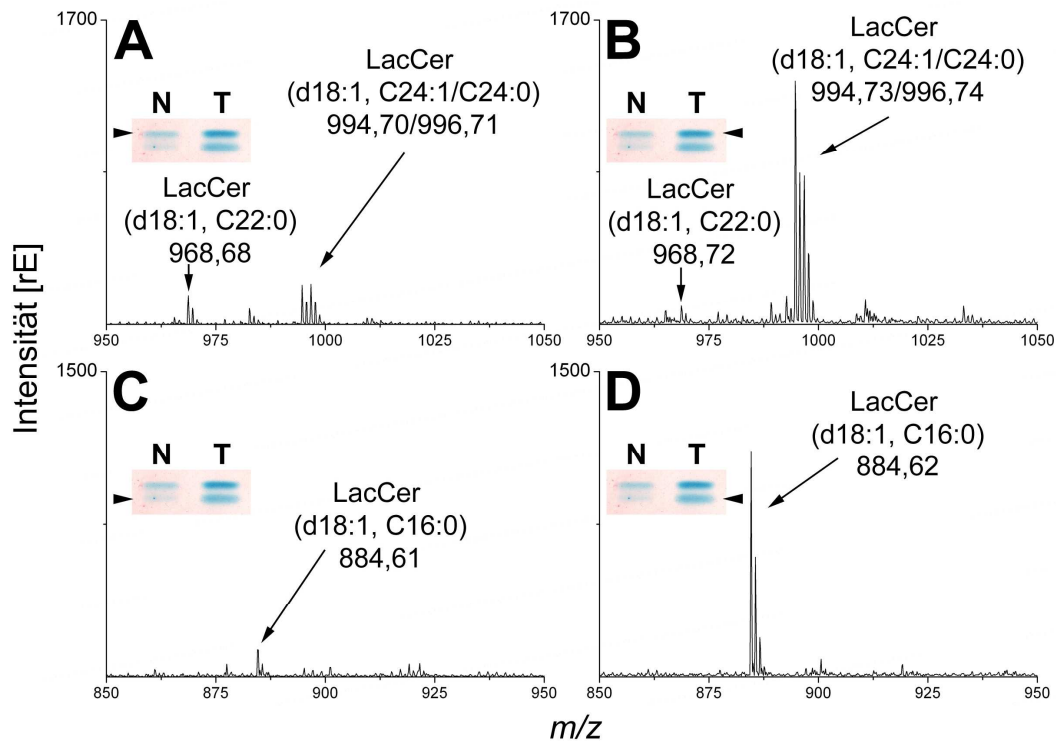
**Abbildung 4.9: Box-Plot-Diagramm der LacCer-Expression in Normal- und Tumorgewebe von 32 HCC-Patienten. Die Differenz ist ein Maß für die Änderung der LacCer-Expression mit Entartung des Gewebes und wurde über die Subtraktion der Expressionswerte des normalen vom malignen Gewebe eines jeden Patienten erhalten. Die LacCer-Expression ist in HCC signifikant verringert ( $p = 0,001$ ).**



**Abbildung 4.10: Box-Plot-Diagramm der LacCer-Expression in HCC in Abhängigkeit von pathologischen Eigenschaften. Die LacCer-Expression korreliert (A) mit schlechter Differenzierung (G1 bis >G2) der Tumorzellen ( $p = 0,029$  /  $\tau = 0,363$ ) und (B) der Ausdehnung des Primärtumors (T1 bis T4) ( $p = 0,012$  /  $\tau = 0,399$ ).**

Zur genauen strukturellen Charakterisierung wurden die Overlay-Assay-detektierten GSL mit Hilfe der IR-MALDI-o-TOF-MS untersucht. In Abbildung 4.11 sind beispielhaft die Massenspektren von jeweils beiden LacCer-positiver Banden der Normal- und Tumorgewebeproben aus Patient 7 dargestellt. In allen Banden wurden LacCer-Spezies als einfach geladene Natrium-Addukte des Typs  $[M+Na]^+$  detektiert. Die GSL bei den verschiedenen Laufhöhen unterscheiden sich in den *N*-Acylgruppen ihrer Ceramide. In den oberen Banden wurden LacCer-Varianten mit langkettigen Fettsäuren, hauptsächlich LacCer (d18:1, C24:1) und LacCer (d18:1, C24:0) mit  $m/z$  994,70 bzw. 996,71 sowie LacCer (d18:1, C22:0) mit  $m/z$  968,68, detektiert (Abbildung 4.11A und B). In Massenspektren der unteren Banden dominierten Signale von LacCer (d18:1, C16:0) bei  $m/z$  884,61 (Abbildung 4.11C und D).

Die Signalintensitäten der MS-Signale von LacCer korrelieren mit denen des Overlay-Assays. Bei Patient 7 wurde im HCC-Gewebe mittels Overlay-Assay eine höhere LacCer-Expression als im Vergleichsgewebe festgestellt. Dies wird auch durch die Massenspektren widergespiegelt, bei denen die der HCC für die Ionen aller LacCer-Spezies eine größere Intensität zeigen.



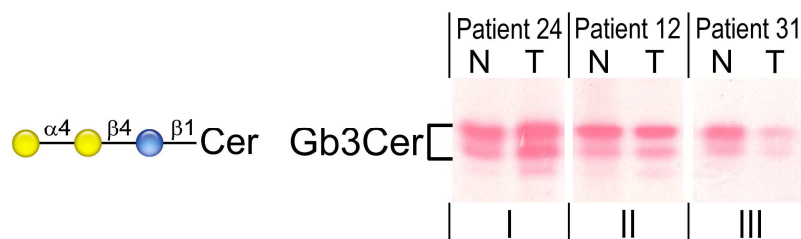
**Abbildung 4.11: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von LacCer.** Massenspektren wurden nach der Mehrfachimmunfärbung jeweils direkt von den oberen und unteren BCIP-gefärbten, LacCer-positiven Banden der Normal- (N) und Tumorgewebeproben (T) von Patient 7 aufgenommen. LacCer Spezies wurden als  $[M+Na]^+$ -Ionen detektiert.

#### 4.2.2 Gb3Cer

Die Expression von Globotriaoslyceramid (Gb3Cer), das auch als CD77 oder Pk Antigen bezeichnet wird, ist von besonderem Interesse, da es für das potenzielle Therapeutikum Stx1 als Zelloberflächenrezeptor fungiert (siehe Kapitel 1.2.7.2). Gb3Cer wird in der GSL-Biosynthese aus der Vorstufe LacCer, deren Expression im vorigen Kapitel untersucht wurde, gebildet. Die Synthese von Gb3Cer wird von der Laktosylceramid-4- $\alpha$ -Galaktosyltransferase katalysiert. Gb3Cer wiederum stellt die Vorläuferstruktur für alle Globo-Serie-GSL dar.

Im Rahmen der Mehrfachimmunfärbung neutraler GSL aus Gewebeproben von 32 HCC-Patienten wurde Gb3Cer mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Fast Red-Detektionssystems. In Abbildung 4.12 sind beispielhaft die Anti-Gb3Cer-Overlay-Assays von Lipidextrakten aus HCC- und Vergleichsgewebeproben von drei Patienten dargestellt.



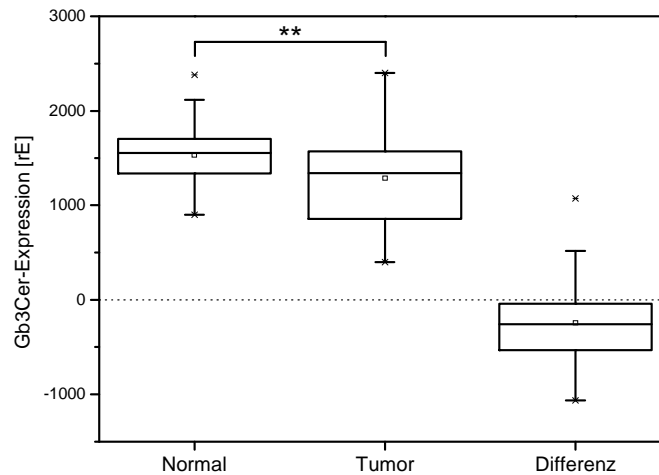


**Abbildung 4.12: Anti-Gb3Cer-Overlay-Assay von Lipidextrakten aus Tumor- (T) und normalem Vergleichsgewebe (N) der Leber. Die Gb3Cer-Expression wurde im ersten Zyklus der GSL-Mehrfachimmunfärbung mit Hilfe eines Anti-Gb3Cer-Antikörpers und dem Fast Red-Detektionssystem bestimmt. Bei der Analyse wurden Probenmengen eingesetzt, die einem Gewebegewicht von 1,5 mg entsprachen. Patienten wurden in drei Kategorien eingeteilt: (I) Gb3Cer-Überexpression, (II) gleiche Expression und (III) verringerte Expression im Tumorgewebe.**

Die Patienten wurden aufgrund ihrer Expressionsunterschiede in Normal- und Tumorgewebe in Expressionsgruppen eingeteilt. Die Zuweisung der Patienten in die jeweiligen Kategorien ist in Tabelle 8.3 zusammengefasst. In 15,6% der Fälle wurde eine Überexpression von Gb3Cer im Tumorgewebe festgestellt, in ebenfalls 15,6% der Fälle zeigte sich eine unveränderte Expression und in 68,8% aller Patienten eine verringerte Expression.

In Abbildung 4.13 wird die Gb3Cer-Expression in Normal- und Tumorgewebe in Form von Box-Plot-Diagrammen gegenübergestellt. Die Verteilung der Gb3Cer-Expression zeigt eine größere Varianz im malignen Gewebe. Sowohl der Maximalwert als auch der Minimalwert der Expression wurde in HCC-Gewebe gefunden, was die hohe Varianz bestätigt. Ein weiterer Unterschied besteht in der zentralen Tendenzen der Verteilungen der Gb3Cer-Expression, die statistisch signifikant ist ( $p = 0,005$ ). Wie zuvor auch schon aus der Einteilung der Patienten in Expressionsgruppen hervorgeht, liegt eine verringerte Gb3Cer-Expression im HCC-Gewebe vor. Dies wird durch die Auftragung der Expressionsdifferenzen deutlich, die im Wesentlichen negative Werte zeigt.

Es wurden Untersuchungen zur Korrelation der Gb3Cer-Expression mit pathologischen Parametern durchgeführt, jedoch ohne statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Ein gleichgerichteter Zusammenhang wurde dafür zwischen der Gb3Cer-Expression und der Biosynthese-Vorstufe LacCer gefunden. Dies betrifft allerdings nur das Normalgewebe ( $p = 0,039$  /  $\tau = 0,256$ ) und nicht das Tumorgewebe, bei dem der Gb3Cer-Gehalt demnach von anderen Faktoren außer der Verfügbarkeit der Vorstufe bestimmt wird.



**Abbildung 4.13: Box-Plot-Diagramm der Gb3Cer-Expression in Normal- und Tumorgewebe von 32 HCC-Patienten. Die Differenz ist ein Maß für die Änderung der Gb3Cer-Expression mit Entartung des Gewebes und wurde über die Subtraktion der Expressionswerte des normalen vom malignen Gewebe eines jeden Patienten erhalten. Die Gb3Cer-Expression ist in HCC signifikant verringert ( $p = 0,005$ ).**

### 4.2.3 Gb4Cer

Gb4Cer wird auch als Globosid oder P Antigen bezeichnet. Es ist ein Blutgruppenantigen, das hauptsächlich von Erythrozyten und dem Urothel exprimiert wird.

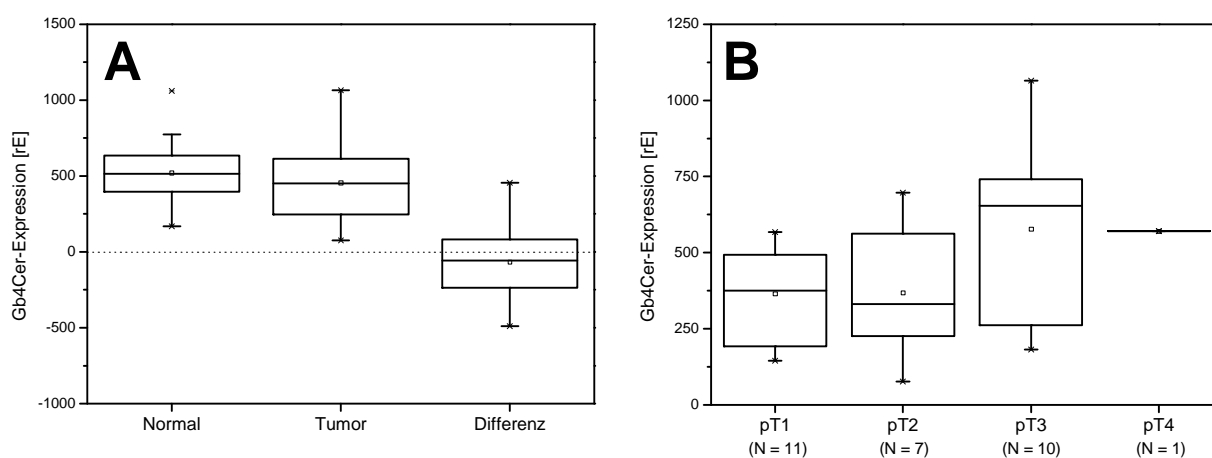
Gb4Cer spielt bei verschiedenen pathologischen Prozessen als Rezeptorstruktur eine wichtige Rolle. Die Adhäsion uropathogener *E. coli* ans Urothelium wird unter anderem über Gb4Cer vermittelt. Zudem gilt Gb4Cer als sogenannter “low-affinity”-Rezeptor für viele Shiga Toxine (Stx), wobei Stx2e eine Ausnahme bildet und mit höherer Affinität bindet (Müthing *et al.* 2009). Der Parvovirus B19 bindet ebenfalls Gb4Cer als Zielstruktur auf Zelloberflächen (Brown *et al.* 1993). In der GSL-Biosynthese wird Gb4Cer durch die Aktivität einer 3- $\beta$ -N-Acetylgalaktosaminyltransferase aus Gb3Cer als Vorstufe synthetisiert.

Die Gb4Cer Expression in HCC und entsprechenden Vergleichsgeweben wurde wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.1) im dritten Zyklus der DC-Mehrfachimmunfärbung von neutralen GSL aus Gewebeproben von HCC-Patienten bestimmt. Dabei wurde ein Gb4Cer-spezifischer polyklonaler Antikörper und das Nickel-dotierte DAB-Detektionssystem eingesetzt, das Gb4Cer durch Bildung eines schwarzen Präzipitats nachweist.



**Abbildung 4.14:** Anti-Gb4Cer-Overlay-Assay von Lipidextrakten aus Tumor- (T) und normalem Vergleichsgewebe (N) der Leber. Die Gb4Cer Expression wurde im dritten Zyklus der GSL-Mehrfachimmunfärbung mit Hilfe eines Anti-Gb4Cer Antikörpers und dem DAB-Detektionssystem bestimmt. Bei der Analyse wurden Probenmengen eingesetzt, die einem Gewebegewicht von 1,5 mg entsprechen. Patienten wurden in drei Kategorien eingeteilt: (I) Gb4Cer-Überexpression, (II) gleiche Expression und (III) verringerte Expression im Tumorgewebe.

Über den Vergleich der Gb4Cer-Expression in normalem und malignem Gewebe der Patienten wurden diese in drei Kategorien eingeteilt. Dabei wurden 37,5% der Patienten aufgrund einer erhöhten Expression in Tumorgewebe der Kategorie I zugeordnet, 12,5% der Kategorie II für gleich bleibende Expression und 50% der Kategorie III für verringerte Expression.

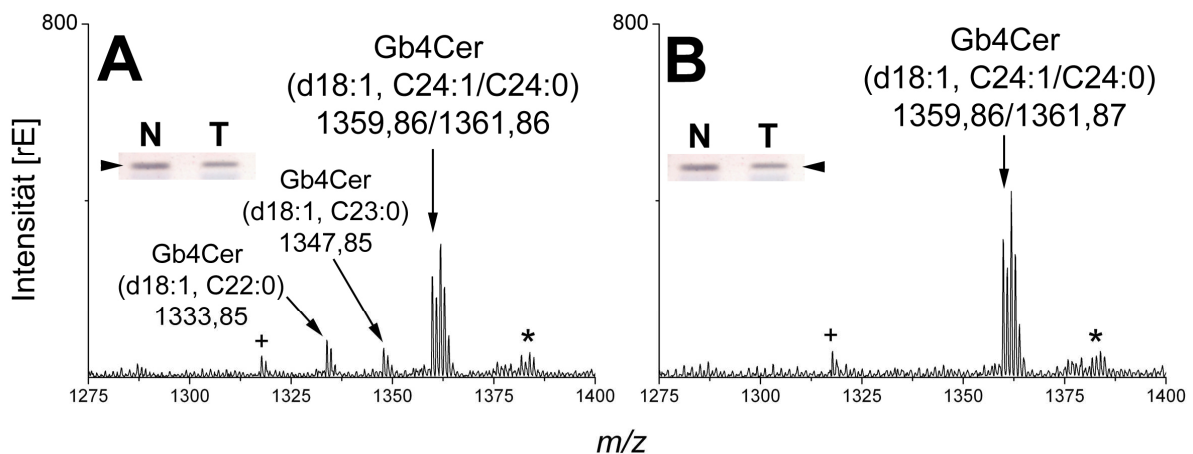


**Abbildung 4.15:** (A) Box-Plot-Diagramm der Gb4Cer-Expression in Normal- und Tumorgewebe von 32 HCC-Patienten. Die Differenz ist ein Maß für die Änderung der Gb4Cer-Expression mit Entartung des Gewebes und wurde über die Subtraktion der Expressionswerte des normale vom malignen Gewebe eines jeden Patienten erhalten. (B) Gb4Cer-Expression im HCC-Gewebe in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Primärtumors pT. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,048$  /  $\tau = 0,291$ ).

Die Expressionsniveaus in den beiden Gewebetypen sind in Abbildung 4.15A in Form von Box-Plot-Diagrammen dargestellt. Obwohl die Entartung des Lebergewebes in mehr Patienten mit einer Reduktion anstatt einer Erhöhung der Gb4Cer-Expression einhergeht, wurde kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt.

Allerdings wurde eine signifikante Korrelation der Gb4Cer-Expression im HCC-Gewebe mit der Ausdehnung des Primärtumors pT gefunden ( $p = 0,048 / \tau = 0,291$ ). Die Gb4Cer-Expression liegt im Anfangsstadium (pT1) auf einem subnormalen Niveau, nimmt aber zu fortgeschrittenen Stadien hin zu. Die Gb4Cer-Expression korreliert ebenfalls mit der ihrer Biosynthese-Vorstufe Gb3Cer und zwar jeweils in Normal- und Tumorgewebe ( $p = 0,001 / \tau = 0,423$  bzw.  $p < 0,001 / \tau = 0,593$ ).

Auch von den Anti-Gb4Cer gefärbten Banden wurden Massenspektren mit der IR-MALDI-Technik aufgenommen (Abbildung 4.16). In Normal- und Tumorgewebe konnte Gb4Cer nachgewiesen werden. Wie jedoch bereits von den Overlay-Assays zu erwarten, wo im Gegensatz zu zuvor untersuchten GSL-Strukturen nur einzelne Banden je Bahn detektiert wurden (vgl. Abbildung 4.14), zeigten die detektierten Gb4Cer-Spezies weniger strukturelle Variationen im Ceramidteil. In Normalgewebe wurden hauptsächlich Gb4Cer-Spezies mit langkettiger C24-N-Acylgruppe detektiert. Dazu gehören Gb4Cer (d18:1, C24:1) und Gb4Cer (d18:1, C24:0) mit  $m/z$  1359,86 bzw. 1361,86, aber auch seltenere Ionen von Gb4Cer (d18:1, C23:0) und Gb4Cer (d18:1, C22:0) mit  $m/z$  1347,85 bzw. 1333,85. Im Tumorgewebe wurden ausschließlich Gb4Cer (d18:1, C24:1) und Gb4Cer (d18:1, C24:0) mit  $m/z$  1359,86/1361,87 detektiert. Die GSL-Ionen traten häufig als Natrium-Addukte des Typs  $[M+Na]^+$  und seltener als  $[M+2Na-H]^+$  auf.

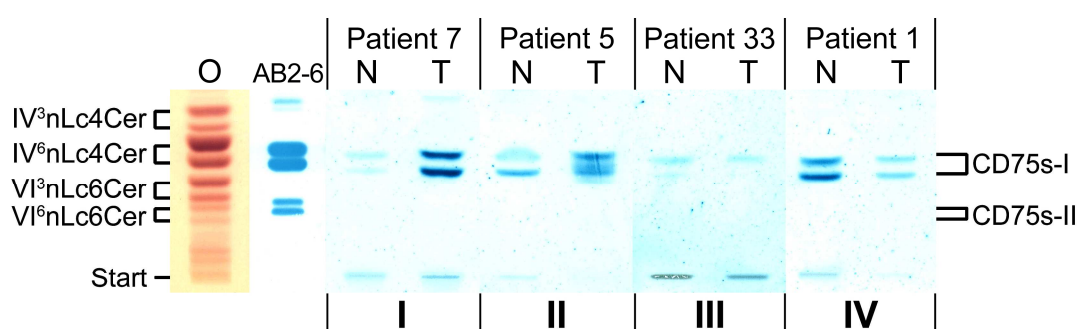


**Abbildung 4.16:** (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von Gb4Cer. Massenspektren wurden nach der Mehrfachimmunfärbung jeweils von den oberen und unteren BCIP-gefärbten, Gb4Cer-positiven Banden der Normal- (N) und Tumorgewebe (T) von Patient 7 aufgenommen. Gb4Cer Spezies wurden hauptsächlich als  $[M+Na]^+$ -Ionen und seltener als  $[M+2Na-H]^+$ -Ionen (mit Sternchen gekennzeichnet) detektiert. Signale, die nicht zugewiesen werden konnten, sind mit Kreuzen markiert.

#### 4.2.4 CD75s-Ganglioside

Die Entartung von Zellen geht häufig mit einer Überexpression von Glykostrukturen einher, die Neuraminsäuren aufweisen. Dies gilt auch für GSL, wo häufig Ganglioside überexprimiert werden (Kapitel 1.2.5). Zusätzlich zur Erhöhung der Zahl der an der Zelloberfläche präsentierten Neuraminsäuren wurde auch ein Wechsel im Typus der Sialylierung festgestellt, die mit einer Zunahme an  $\alpha$ 2,6-sialylierten Strukturen einhergeht (Hedlund *et al.* 2008).

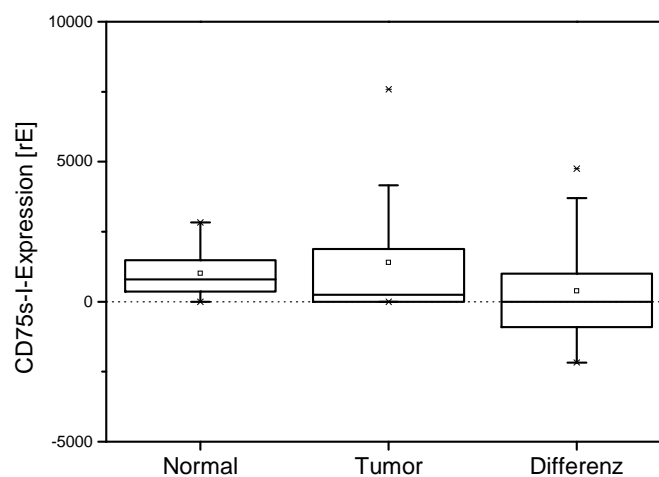
CD75s-Ganglioside weisen eine terminale Neu5Ac $\alpha$ 6Gal $\beta$ 4GlcNAc-Struktur auf und bilden die Zielstrukturen des potenziellen Krebstherapeutikums Viscumin (Kapitel 1.2.7.1). Um die mögliche Anwendbarkeit von Viscumin in der Therapie von HCC zu testen, wurde die Expression der CD75s-Zielstruktur auf Gangliosiden in HCC- und normalem Vergleichsgewebe untersucht. Dazu wurden GSL-Extrakte aus Gewebeproben von 29 Patienten in Mengen entsprechend 2 mg Gewebegewicht auf DC-Platten aufgetragen und getrennt. Die Expression von CD75s-Gangliosiden wurde mit Hilfe des polyklonalen AB2-6 Antikörpers in einem Overlay-Assay bestimmt. In Abbildung 4.17 sind beispielhaft die Ergebnisse des Anti-CD75s-Overlay-Assays von vier Patienten dargestellt. Im Gegensatz zu den Referenzgangliosiden aus humanen Granulozyten, die sowohl CD75s-I- als auch CD75s-II-Ganglioside mit nLc4Cer bzw. nLc6Cer-Grundstruktur aufweisen, wurde in den Gewebeproben der HCC-Patienten ausschließlich das weniger komplexe CD75s-I detektiert.



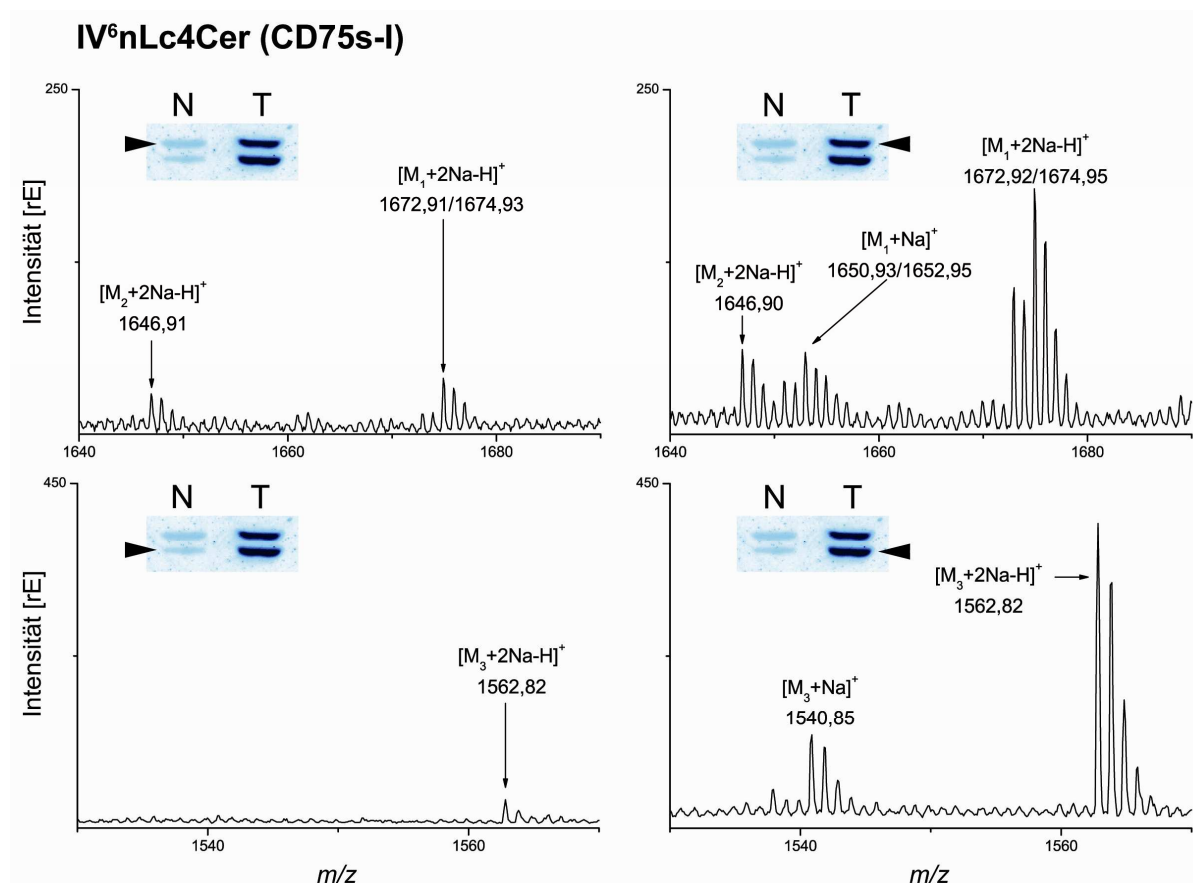
**Abbildung 4.17:** DC-Overlay-Assay zum Nachweis von CD75s-Gangliosiden in Tumor- (T) und normalem Vergleichsgewebe. Rohlipidextrakte entsprechend 2 mg Gewebegewicht wurden parallel zueinander aufgetragen und mittels DC getrennt. CD75s-I- und CD75s-II-Ganglioside wurden mit dem AB2-6 Antikörper nachgewiesen. Die Patienten wurden aufgrund ihrer Expressionsunterschiede in vier Kategorien eingeteilt: (I) hohe Überexpression, (II) moderate Überexpression, (III) keine/gleiche Expression und (IV) verringerte Expression im Tumorgewebe. Für jede Kategorie sind die gefärbten Proben jeweils eines Patienten exemplarisch dargestellt. Als Referenz wurden Ganglioside aus humanen Granulozyten eingesetzt und über eine Orcin-Färbung (O, 10  $\mu$ g) und den Overlay-Assay mit dem AB2-6-Antikörper nachgewiesen (AB2-6, 1,5  $\mu$ g).

Die Patienten wurden entsprechend den Differenzwerten der CD75s-Gangliosid-Expression zwischen normalem und malignem Lebergewebe in vier Kategorien eingeteilt (Tabelle 8.5). Es wurden 20,7% der Patienten der Kategorie I, hohe Überexpression in HCC-Gewebe, zugeteilt, 13,8% der Kategorie II, moderate Überexpression, 20,7% der Kategorie III, gleichgebliebene Expression und 44,8% der Kategorie IV, verringerte Expression. Insgesamt zeigen demnach 34,5% der Patienten eine deutlich erhöhte Expression. Dem steht jedoch mit 44,8% ein größerer Anteil von Patienten mit verringerter Expression gegenüber.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von CD75s-Gangliosiden sind in Abbildung 4.18 veranschaulicht. Aus dem Box-Plot-Diagramm für CD75s-I im Normalgewebe wird deutlich, dass CD75s-I konstitutiv in normalen humanen Lebergeweben exprimiert wird. Dem Box-Plot-Diagramm für CD75s-I im Tumorgewebe ist zu entnehmen, dass eine ungerichtete Veränderung der CD75s-I-Expression vorliegt. Einerseits werden die höchsten Werte in HCC-Proben gefunden, andererseits kann in einem erhöhten Anteil der Patienten kein CD75s-I nachgewiesen werden. Der Unterschied der Gangliosid-Expression spiegelt sich demnach in der zunehmenden Varianz wider und weniger in der gerichteten Veränderung des Expressionsniveaus. Dies ist auch dem Box-Plot-Diagramm für die Differenz der CD75s-I-Werte der einzelnen Patienten zu entnehmen, das einen Median nahe Null aufweist. Dementsprechend wurde mit einem Test auf Unterschiede in der zentralen Tendenz von zwei Stichproben, wie dem Wilcoxon-Test (Kapitel 3.8.1), kein signifikantes Ergebnis erhalten. Ebenso wenig konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen der CD75s-I-Expression und den pathologischen Parametern Differenzierungsgrad und Ausdehnung des Primärtumors festgestellt werden.



**Abbildung 4.18: Box-Plot-Diagramm der CD75s-I-Expression in Normal- und Tumorgewebe von 29 HCC-Patienten. Die Differenz ist ein Maß für die Änderung der CD75s-I-Expression mit Entartung des Gewebes und wurde über die Subtraktion der Expressionswerte des normalen vom malignen Gewebe eines jeden Patienten erhalten.**



**Abbildung 4.19:** (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von CD75s-I-Gangliosiden aus immungefärbten Banden. Spektren wurden von CD75s-positiven Banden der normalen (N) und malignen (T) Lebergewebeproben des Patienten 7 aufgezeichnet. CD75s-I-Ganglioside mit unterschiedlichen *N*-Acylgruppen wurden nachgewiesen.  $M_1$  entspricht IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0),  $M_2$  IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0) und  $M_3$  IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0).

Die strukturelle Charakterisierung der immundetektierten CD75s-I-Ganglioside mit ihren Fettsäure-Heterogenitäten erfolgte wieder mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS. Auch Ganglioside wurden im Positivionen-Modus als einfach geladene Natrium-Addukte detektiert. Bei monosialylierten Gangliosiden wurden jedoch häufiger  $[M+2Na-H]^+$ -Ionen als solche des Typs  $[M+Na]^+$  detektiert. Massenspektren wurden von immungefärbten Banden von HCC- und Vergleichsproben aufgenommen. In Abbildung 4.19 sind die für Patient 7 (Kategorie I) dargestellt (vgl. Abbildung 4.17). Bei der Untersuchung der jeweils oberen immungefärbten Banden wurden mit großer Häufigkeit Ionen mit  $m/z$  1646,91, 1672,91 und 1674,93 im Normalgewebe und  $m/z$  1646,91, 1672,91 und 1674,93 im Tumorgewebe detektiert, die auf die Präsenz von CD75s-I-Gangliosiden mit langkettigen Fettsäuren hinweisen, und zwar IV<sup>6</sup>nLc4Cer (d18:1, C22:0), IV<sup>6</sup>nLc4Cer (d18:1, C24:1) und IV<sup>6</sup>nLc4Cer (d18:1, C24:0). In den jeweiligen unteren immungefärbten Banden dominieren Signale eines CD75s-I-

Gangliosids mit kurzer C16-*N*-Acylgruppe, IV<sup>6</sup>nLc4Cer (d18:1, C16:0), bei *m/z* 1562,83 in Normal- und Tumorgewebe. In den Spektren der Tumorprobe wurden höhere Signalintensitäten für die Ganglioside erzielt, was auch mit den Ergebnissen des Overlay-Assays korreliert.

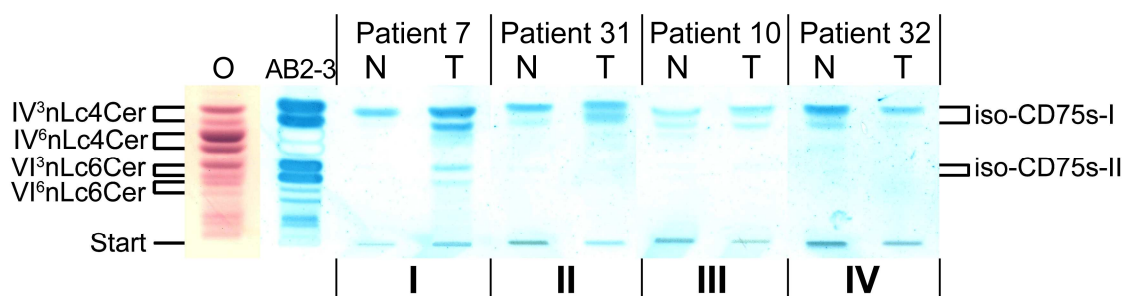
#### 4.2.5 Iso-CD75s-Ganglioside

Zusätzlich zu CD75s-Gangliosiden wurde die Expression von isomeren Gangliosiden untersucht, die ebenfalls der Neolacto-Serie angehören, jedoch eine terminale Neuraminsäure in  $\alpha$ 2,3-Konfiguration aufweisen. In Analogie zu CD75s (Neu5Ac $\alpha$ 6Gal $\beta$ 4GlcNAc-R) wird diese Struktur als iso-CD75s (Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc-R) bezeichnet.

Die Expression von iso-CD75s-Gangliosiden in Geweben von 29 HCC-Patienten wurde zunächst wieder mit Hilfe des DC-Overlay-Assays untersucht. Dabei wurden Lipidextrakte in Mengen entsprechend einem konstanten Gewebegewicht von 2 mg eingesetzt. Iso-CD75s-Ganglioside wurden mit dem polyklonalen AB2-3 Antikörper unter Verwendung des BCIP-Detektionssystems nachgewiesen (Abbildung 4.20). Die Spezifität des verwendeten Antikörpers wird durch den Vergleich von Orcin-Färbung (O) und Overlay-Assay (AB2-3) deutlich. Es wurde eine komplexe Mischung von Gangliosiden aus humanen Granulozyten angefärbt, die als Referenz diente. Die Orcin-Färbung weist allgemein Zuckerstrukturen nach, während über den Overlay-Assay spezifisch iso-CD75s-I- und iso-CD75s-II-Ganglioside, IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer bzw. VI<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc6Cer, angefärbt wurden. In den Normal- und Tumorgeweben der HCC-Patienten konnte mit dem Overlay-Assay im Wesentlichen die einfacheren Glykoform iso-CD75s-I nachgewiesen werden.

Aufgrund der unterschiedlichen iso-CD75s-I-Expression in normalem und malignem Lebergewebe wurden die Patienten in vier Kategorien eingeteilt (Tabelle 8.6). Dabei wurden 10,3% der Patienten aufgrund einer starken Überexpression in Tumorgewebe der Kategorie I zugewiesen, 31,0% der Kategorie II für moderate Überexpression, 20,7% der Kategorie III für gleich bleibende und 37,9% der Kategorie III für verringerte Expression. In Abbildung 4.20 (I-IV) sind beispielhaft iso-CD75s-Overlay-Assays für jeweils einen HCC-Patienten der vier Kategorien dargestellt.

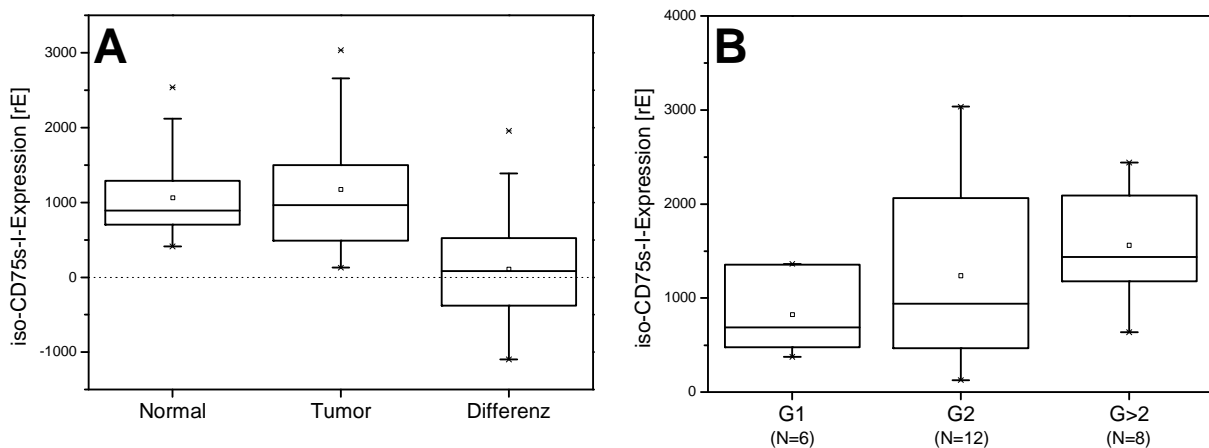




**Abbildung 4.20: DC-Overlay-Assay zum Nachweis von iso-CD75s-Gangliosiden in Tumor- (T) und normalem Vergleichsgewebe.** Rohlipidextrakte entsprechend 2 mg Gewebegewicht wurden parallel zueinander aufgetragen und mittels DC getrennt. Iso-CD75s-I- und iso-CD75s-II-Ganglioside wurden mit dem AB2-3 Antikörper nachgewiesen. Die Patienten wurden aufgrund ihrer Expressionsunterschiede in vier Kategorien eingeteilt: (I) hohe Überexpression, (II) moderate Überexpression, (III) keine/gleiche Expression und (IV) verringerte Expression im Tumorgewebe. Für jede Kategorie sind die gefärbten Proben jeweils eines Patient exemplarisch dargestellt. Als Referenz wurden Ganglioside aus humanen Granulozyten eingesetzt und über eine Orcin-Färbung (O, 10 µg) und Overlay-Assay mit dem AB2-3-Antikörper (1,5 µg) nachgewiesen.

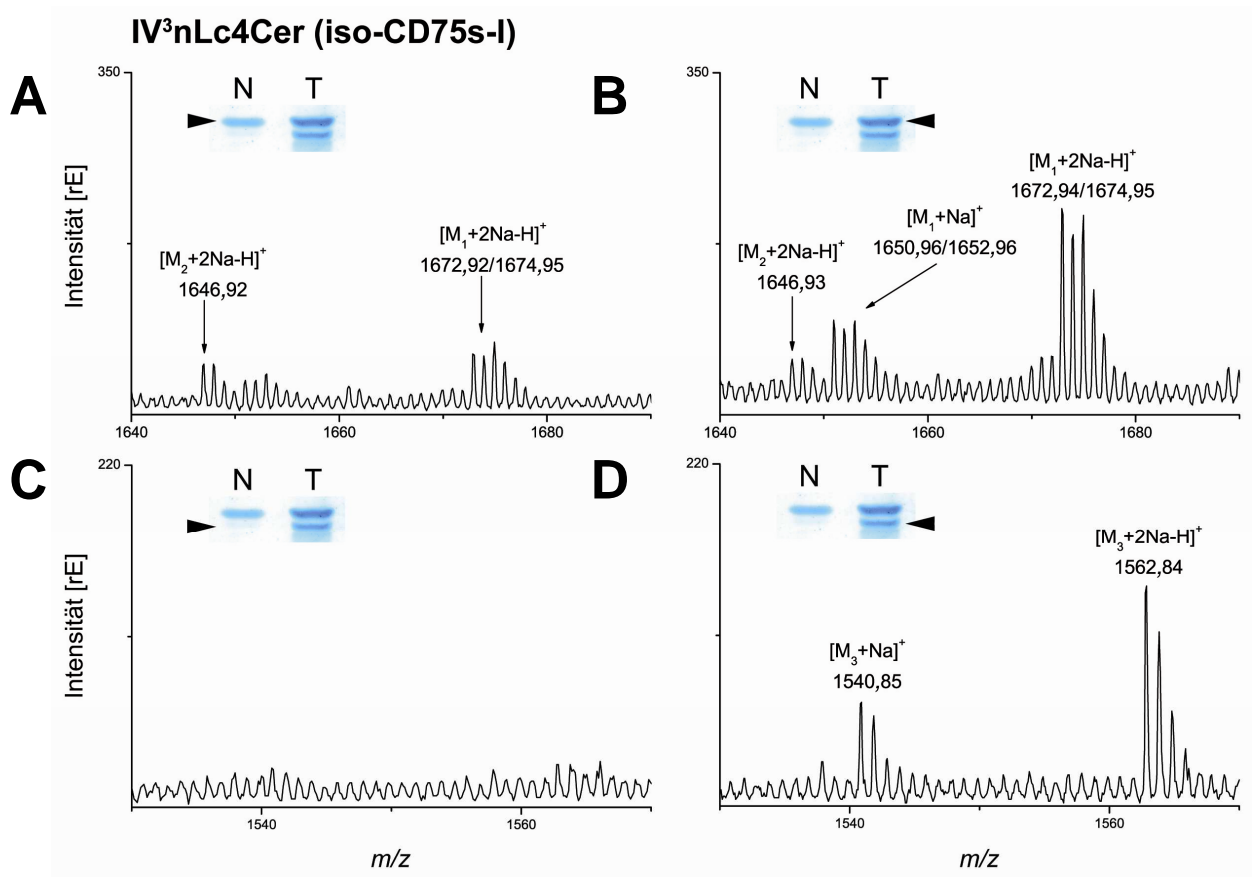
Die Ergebnisse des iso-CD75s-Overlay-Assays werden in Abbildung 4.21A in Form von Box-Plot-Diagrammen veranschaulicht. Die Verteilung der Expressionswerte in Normal- und Tumorgewebe zeigen eine ähnliche zentrale Lage, wie aus dem Vergleich der Mediane deutlich wird. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im Expressionsniveau von iso-CD75s-I zwischen den Gewebetypen festgestellt werden. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass der Median der Expressionsdifferenz, die als Maß für die Veränderung berechnet wurde, nahe Null liegt. Ähnlich wie zuvor bei der CD75s-Expression kann jedoch eine Zunahme in der Varianz der iso-CD75s-Expression (vgl. Abbildung 4.18) im Tumorgewebe festgestellt werden, was auf eine ungerichtete Deregulierung hinweist. Tatsächlich korreliert die iso-CD75s-I-Expression in Normal- und Tumorgewebe mit der von CD75s-I ( $p = 0,003 / \tau = 0,392$  bzw.  $P < 0,001 / \tau = 0,650$ ). Dagegen wurde keine Korrelation zwischen der iso-CD75s-I-Expression in normalem und malignem Gewebe gefunden.

Bei Überprüfung der iso-CD75s-I-Expression auf statistische Zusammenhänge mit pathologischen Parametern wurde eine signifikante Korrelation mit dem Differenzierungsgrad festgestellt ( $p = 0,045 / \tau = 0,317$ ). In Abbildung 4.21B ist die iso-CD75s-Expression in HCC-Gewebe gegen den Differenzierungsgrad G aufgetragen, der in drei Gruppen unterteilt wurde, G1, G2 und G>2. Es wird deutlich, dass das Expressionsniveau von iso-CD75s-I mit abnehmender Differenzierung der Tumorzellen steigt.



**Abbildung 4.21:** (A) Box-Plot-Diagramme der iso-CD75s-I-Expression in Normal- und Tumorgewebe von 29 HCC-Patienten. Die Differenz ist ein Maß für die Änderung der iso-CD75s-I-Expression mit Entartung des Gewebes und wurde über die Subtraktion der Expressionswerte des normalen vom malignen Gewebe eines jeden Patienten erhalten. Die iso-CD75s-I-Expression im HCC-Gewebe zeigt keine Veränderung des Expressionsniveaus gegenüber dem Vergleichsgewebe; dennoch besteht ein signifikanter Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen ( $p = 0,045 / \tau = 0,317$ ) (B).

Von den iso-CD75s-immungefärbten Banden wurden mit Hilfe der IR-MALDI-Technik Massenspektren aufgenommen (Abbildung 4.22). Iso-CD75s-Ganglioside konnten in der HCC-Gewebeprobe und in dem normalen Vergleichsgewebe bevorzugt als  $[M+2Na-H]^+$  Ionen (dominierende Gangliosid-Spezies auch als seltenere  $[M+Na]^+$ -Ionen) nachgewiesen werden. In den oberen Banden wurden iso-CD75s-Ganglioside mit langkettigen C22- und C24-Fettsäuren detektiert. Dies sind  $IV^3nLc4Cer$  (d18:1, C22:0) mit  $m/z$  1646,92 bzw. 1646,93 sowie  $IV^3nLc4Cer$  (d18:1, C24:1) und  $IV^3nLc4Cer$  (d18:1, C24:0) mit  $m/z$  1672,92 und 1674,95 bzw. 1672,94 und 1674,95 in Normal- und Tumorgewebe (Abbildung 4.22A und B). Die iso-CD75s-I-Spezies mit kurzer C16-Fettsäure,  $IV^3nLc4Cer$  (d18:1, C16:0) mit  $m/z$  1646,92 konnte bei diesem Patienten dagegen nur im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen des Overlay-Assays, bei dem im Normalgewebe nur eine immunpositive Bande gefärbt wurde (Abbildung 4.22C und D).

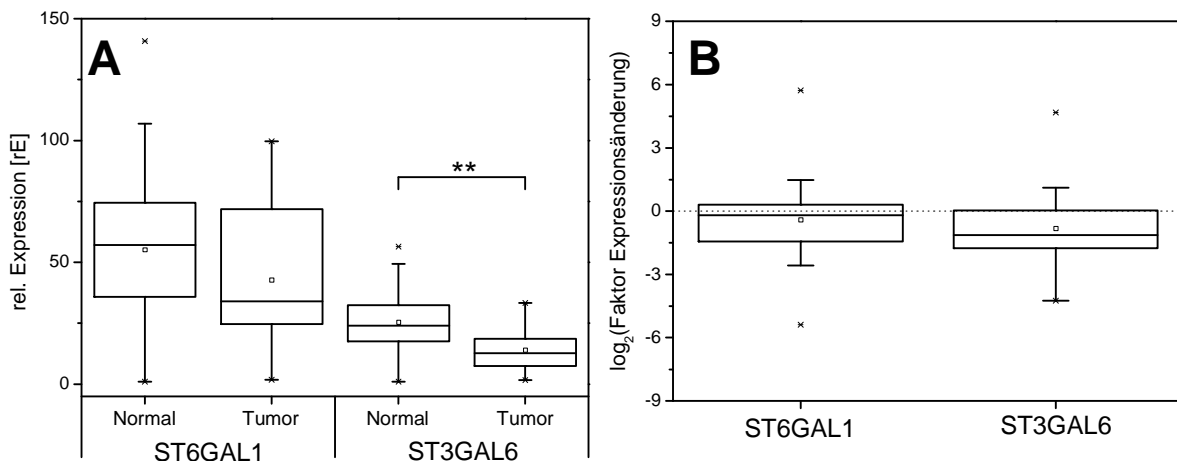


**Abbildung 4.22:** (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von iso-CD75s-I-Gangliosiden aus immungefärbten Banden. Spektren wurden von iso-CD75s-positiven Banden der normalen (N) und malignen (T) Lebergewebeproben des Patienten 7 aufgezeichnet. Iso-CD75s-I-Ganglioside mit unterschiedlichen *N*-Acylgruppen wurden nachgewiesen.  $M_1$  entspricht IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0),  $M_2$  IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0) und  $M_3$  IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0).

### 4.3 Expression von ST6GAL1 und ST3GAL6 in HCC

Die isomeren CD75s- und iso-CD75s-Ganglioside werden in der Zelle aus den gleichen Vorläuferstrukturen gebildet. Im Fall von CD75s-I und iso-CD75s-I ist das Tetraosylceramid nLc4Cer die gemeinsame Vorstufe, bei CD75s-II und iso-CD75s-II das Hexaosylceramid nLc6Cer. Die terminale Sialylierung dieser Grundstrukturen stellt den letzten Schritt in der Biosynthese dar und wird von Sialyltransferasen vermittelt. Die  $\alpha$ 2,6-Sialylierung von Typ 2-Ketten wird von der  $\beta$ -Galaktosid  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase I (ST6Gal1) katalysiert. Sie setzt aktivierte Neuraminsäure CMP-Neu5Ac und Typ 2-Laktosamine in CD75s-Strukturen um (Weinstein *et al.* 1982). Die  $\beta$ -Galaktosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase VI (ST3GAL6) nutzt die gleichen Substrate, vermittelt jedoch die Bindung in  $\alpha$ 2,3-Konfiguration, so dass iso-CD75s-Strukturen entstehen (Okajima *et al.* 1999).

Mit Hilfe der QRT-PCR wurde die Expression beider Sialyltransferasen in Tumor- und normalem Vergleichsgewebe von 30 HCC-Patienten untersucht und mit der Expression der entsprechenden Ganglioside verglichen.



**Abbildung 4.23: Box-Plot-Diagramme der Sialyltransferase-Expression in HCC. (A) Über QRT-PCR bestimmte relative Expression von ST6GAL1 und ST3GAL6 in Normal- und Tumorgewebe von 30 HCC Patienten. Die Werte für die ST6GAL1 und ST3GAL6-Expression wurden jeweils zum gemeinsamen Minimalwert aus Normal- und Tumorgewebe in Relation gesetzt. Die Expression von ST3GAL6 in beiden Gewebetypen unterscheidet sich signifikant ( $p = 0,003$ ). (B) Box-Plot-Diagramme der Faktoren, um die sich die Expression von ST6GAL1 und ST3GAL6 in normalem und malignem Lebergewebe ändert.**

Relative ST6GAL1- und ST3GAL6-Expressionswerte jeweils für das Normal- und Tumorgewebe sind als Box-Plot-Diagramme in Abbildung 4.23A dargestellt. Abbildung

4.23B zeigt die Expressionsänderung der beiden Sialyltransferasen in logarithmischer Auftragung. Als Maß der Änderung wurde der Faktor berechnet, um den sich die Genexpression im Tumorgewebe im Vergleich zu der im normalen Gewebe unterscheidet. Beide Sialyltransferasen weisen tendenziell eine geringere Expression in HCC-Gewebe auf; dies ist jedoch nur im Fall von ST3GAL6 statistisch signifikant ( $p = 0,003$ ). Etwa 75% aller Patienten zeigen eine Verringerung der ST3GAL6-Expression mit maligner Transformation (Abbildung 4.23B). Die ST3GAL6-Expression scheint jedoch schwach reguliert zu werden, da sie im Mittel nur um den Faktor 2 verringert ist.

Weder die ST6GAL1- und ST3GAL6-Expressionswerte noch das Maß ihrer Änderung konnte mit pathologischen Werten wie der Tumorausdehnung pT, dem Differenzierungsgrad G und dem Zirrhose-Status in Zusammenhang gebracht werden. Zwischen der Expression der Sialyltransferasen und dem Expressionsniveau der entsprechenden Ganglioside wurde ebenfalls keine Korrelation festgestellt.

#### **4.4 Serum-GSL von Pankreasadenokarzinom- und Magenkarzinom-Patienten**

Die Identifizierung von Biomarkern in Blut bzw. Serum ist von besonderer Bedeutung, da diese Flüssigkeiten durch nicht-invasive Eingriffe praktisch jederzeit und ohne großen operativen Aufwand zugänglich sind. Bei Kenntnis von Serummarkern wären somit regelmäßige Routinediagnosen denkbar, die potenziell die Erkennung von Krebserkrankungen in Frühstadien ermöglichen würden. Dies wäre besonders bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts wünschenswert, die erst in späten Stadien signifikante Symptome verursachen. Auch eine Rolle von Serummarkern in der Aufklärung der genauen Krankheitsurache bei unspezifischer Symptomatik, die häufig bei Gastrointestinaltumoren vorliegt, ist denkbar.

Wie in Kapitel 1.2.6 beschrieben, werden GSL von Zellen in den extrazellulären Raum freigesetzt. Tumorzellen scheinen dies sogar in erhöhter Rate zu tun, so dass insbesondere aus Tumoren stammende Ganglioside im Blutstrom nachgewiesen wurden. Sie sind somit potenzielle Tumor-assoziierte Strukturen mit diagnostischem Potential.

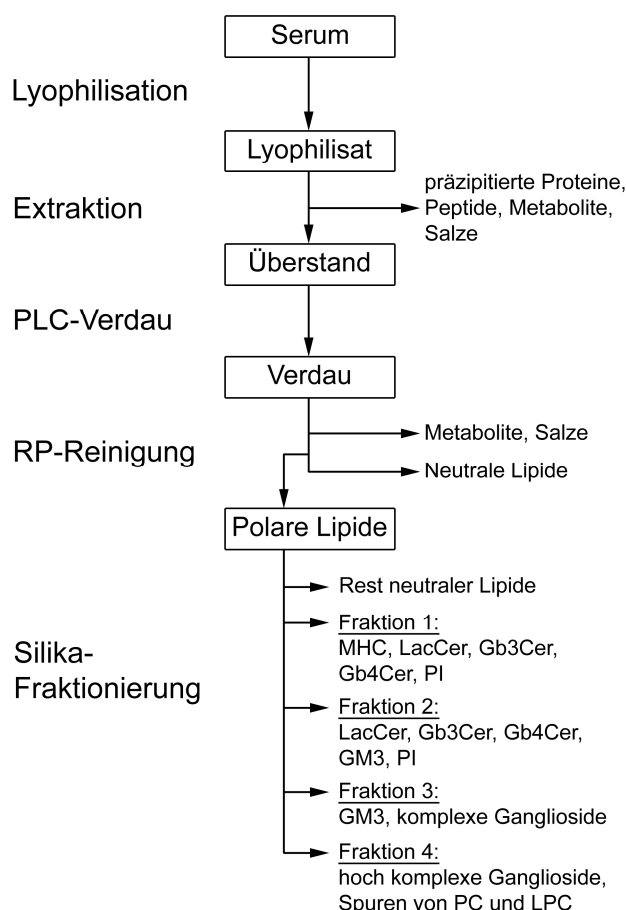
Im Folgenden wird die Untersuchung von Serum-GSL aus Magenkarzinom- und Pankreasadenokarzinom-Patienten beschrieben. Dazu wurde eine Extraktionsmethode entwickelt, die eine massenspektrometrische Charakterisierung von Serum-GSL und die Analyse mit Hilfe von DC-Overlay-Assays erlaubt. Mit Hilfe einer adaptierten Overlay-Assay-Mehrfachfärbung wurden hoch komplexe Serumganglioside als potenzielle Tumormarker in Serum von Magenkarzinom- und Pankreasadenokarzinom-Patienten untersucht.

##### **4.4.1 Entwicklung einer Extraktionsmethode für Serum-GSL**

Eine Prozedur zur Extraktion von GSL aus kleinen Volumina (300  $\mu$ l) humanen Serums wurde entwickelt. Eine Übersicht des Arbeitsablaufs ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Bei der Extraktion wurden große Lösungsmittelvolumina und eine große Anzahl von Gefäßen vermieden, um den Verlust von GSL durch Adsorption an Oberflächen zu minimieren.

Anstatt einer Flüssig-Flüssig-Extraktion im Zweiphasensystem, z.B. der klassischen Methoden nach Folch (Folch *et al.* 1957) oder Bligh und Dyer (Bligh & Dyer 1959), wurde ein Einphasensystem eingesetzt. Dazu wurden die Serumproben lyophilisiert, um

anschließend mit einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Chloroform/Methanol/Wasser (30/60/8) (v/v/v) extrahiert zu werden. Die Lyophilisation ermöglicht das Arbeiten mit kleinen Volumina bei definiertem geringen Wasseranteil im Extraktionsgemisch. Bei diesem Schritt wurden Proteine, Peptide, Metabolite und verschiedene Salze präzipitiert und nach Zentrifugation abgetrennt. Um eine möglichst vollständige Ausbeute an GSL zu erzielen, wurde der präzipitierte Rückstand ein weiteres Mal auf gleiche Weise nachextrahiert.



**Abbildung 4.24: Arbeitsablauf der Extraktion und Fraktionierung von GSL aus Serum.**

Bei dieser Prozedur wurden die Gesamtlipide aus dem Serum isoliert. Dabei handelt es sich um (i) neutrale Lipide, wie z.B. Triacylglyceride, Diazylglyceride, Monoacylglyceride, Cholesterin und Cholesterinester; (ii) Phospholipide, hauptsächlich Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SM), lyso-Phosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinositol (PI) und (iii) neutrale GSL und Ganglioside. Da neutrale Lipide und Phospholipide im Vergleich zu GSL in einem großen Überschuss vorliegen, stellen sie Matrixsubstanzen dar, die bei der Analyse der GSL stören. Die Mehrheit der Phospholipide wurde durch einen Phospholipase-Verdau abgereichert.

Dabei wurde die Phospholipase C aus *Bacillus cereus* eingesetzt, die die Mehrheit der in Serum vorhandenen Phospholipide zu Diacylglyceriden und Phosphatsalzen abbaut. Im Fall von Sphingomyelin, das auch gespalten wird, entsteht freies Ceramid und Phosphocholin.

Die Produkte des enzymatischen Verdaus und auch die eingesetzten Puffer-Salze wurden über eine stationäre Phase mit Umkehrphasenmaterial von den GSL getrennt. Dabei wurde der wässrige Verdau-Ansatz direkt aufgetragen. Salze binden nicht an die C18-Phase und wurden durch ausgiebiges Waschen entfernt. Mit Methanol, einem Lösungsmittel mittlerer eluotroper Stärke, wurden bevorzugt polare Lipide eluiert, während neutrale Lipide auf der Säule verblieben. GSL aus der Fraktion der polaren Lipide wurden weiter auf einer Silika-Säule über eine schrittweise Elution fraktioniert. GSL eluierten mit steigender Polarität. Dabei wurden vier GSL-haltige Fraktionen erzeugt, die der MS-Analyse zugeführt wurden.

#### 4.4.2 MS-Charakterisierung von Serum-GSL

Die erhaltenen Serum-GSL-Fraktionen wurden mit Hilfe von nanoESI-QTOF-MS untersucht. In den Spektren der Fraktionen 1 und 2 sind im Wesentlichen Ionen von einfachen, neutralen GSL von Monohexosylceramiden bis Tetraosylceramiden enthalten. In den Fraktionen 3 und 4 dominieren Ganglioside, die teilweise sehr komplexe Glykanstrukturen aufweisen.

Ein (+)nanoESI-QTOF-Massenspektrum der Fraktion 2 ist in Abbildung 8.1 dargestellt. Die entsprechende Peakliste ist in Tabelle 8.7 zu finden. Es wurden neutrale GSL als Natrium-Addukte detektiert, die in MS/MS-Experimenten charakterisiert und GlcCer, LacCer, Gb3Cer, Gb4Cer und nLc4Cer zugeordnet wurden (Souady *et al.* 2010). Dabei weist nLc4Cer allerdings nur einen geringen Anteil auf.

In Abbildung 4.25 ist ein Negativionenspektrum der Fraktion 3 dargestellt. Diese Fraktion weist ein breites Spektrum von Gangliosid-Ionen auf, die präliminär der Ganglio- und Neolakto-Serie zugeordnet werden konnten. Ganglioside wurden hauptsächlich als deprotonierte Moleküle detektiert. Eine vollständige Auflistung der Gangliosid-Ionen dieses Spektrums ist in Tabelle 8.8 zu finden.

Als einfachste aber dominierende Spezies wurde GM3 detektiert, das eine große Bandbreite an Lipiformen von GM3 (d18:1, C14:0) mit  $m/z$  1123,70 bis GM3 (d18:1, C25:0) mit  $m/z$  1278,85 zeigt. Es wurden ebenfalls mehrfach sialylierte Ganglioside mit bis zu drei Sialinsäuren detektiert. Aufgrund der Zusammensetzung ihrer Glykane wurden sie den Gangliosiden GM2, GD3, GD1 und GT1 zugeordnet (vgl. Tabelle 8.8).



Eine Serie von Ionen mit Masseninkrementen von 365 u deutet auf eine Reihe monosialylierter Ganglioside hin, deren Grundstrukturen sich wahrscheinlich um *N*-Acetyllaktosamin (LacNAc)-Einheiten verlängern. Zusätzlich können diese Ganglioside mehrere Desoxyhexosen, höchstwahrscheinlich Fukosen, aufweisen, was durch einen Massenzuwachs von 146 u gekennzeichnet wird. Diese Ganglioside wurden tentativ der Neolakto-Serie zugeordnet und besitzen teilweise äußerst komplexe, lineare Glykanstrukturen. So konnten Ionen bei  $m/z$  3415,47 detektiert werden, die auf ein monosialyliertes, dreifach fukosyliertes Gangliosid mit Dodecasaccharid-Grundstruktur, Neu5Ac-Fuc<sub>3</sub>-nLc12Cer (d18:1, C16:0), hinweisen.

In dem Spektrum dominieren Lipoformen mit kurzkettingen *N*-Acylgruppen. Dies trifft vor allem auf Ganglioside der Neolakto-Serie zu. Sehr komplexe Ganglioside ab nLc8Cer als Grundstruktur wurden ausschließlich mit C16:0-Fettsäuren nachgewiesen.

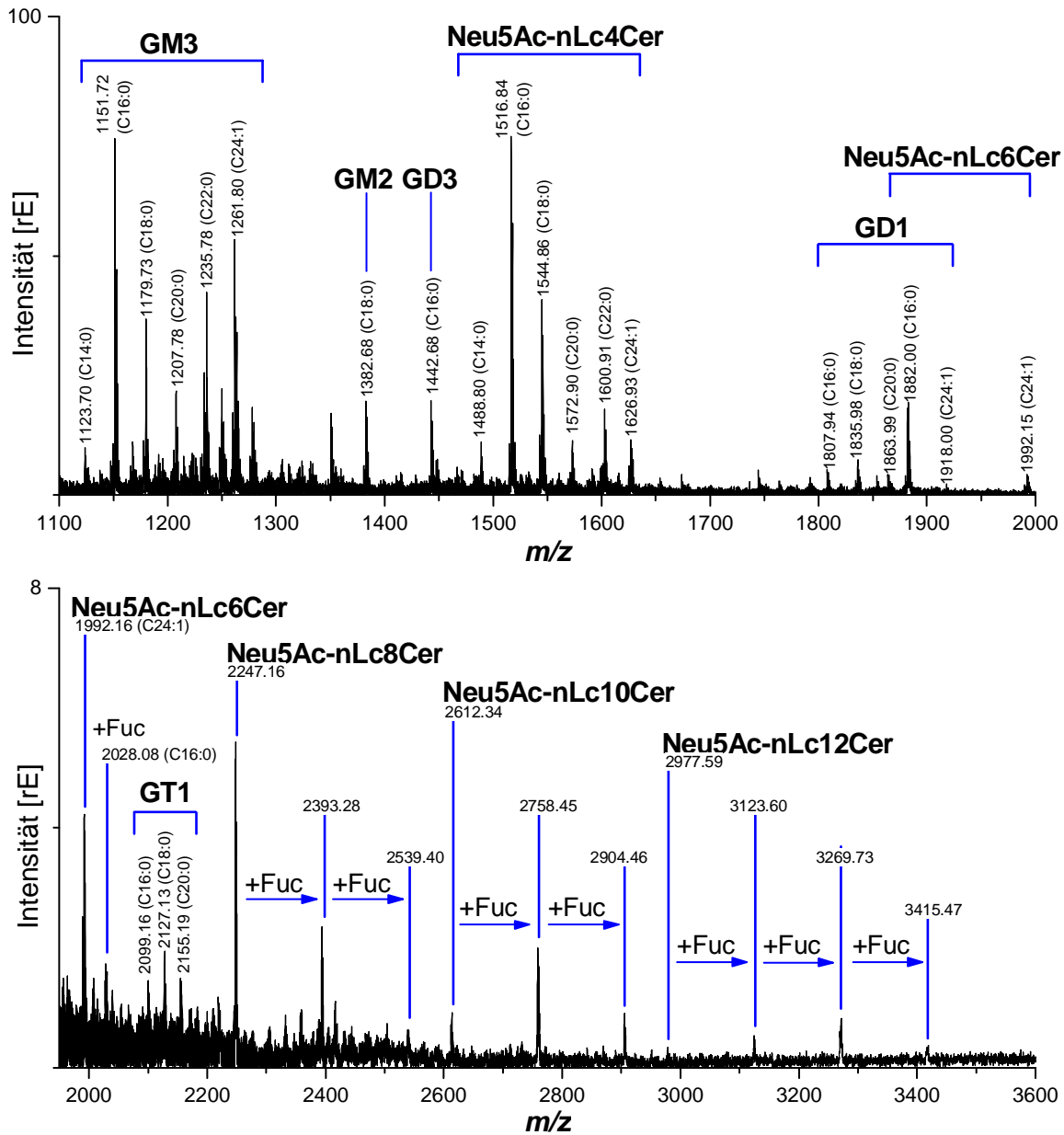


Abbildung 4.25: (-) nanoESI-QTOF-Massenspektrum von humanen Serumgangliosiden. Die eingesetzten Gangliosidmengen entsprechen dem Gehalt in 30  $\mu$ l Serum. Ganglioside wurden bevorzugt als  $[M-H]^-$ -Ionen detektiert. Eine vollständige Auflistung aller GSL-Ionen findet sich in Tabelle 8.8.

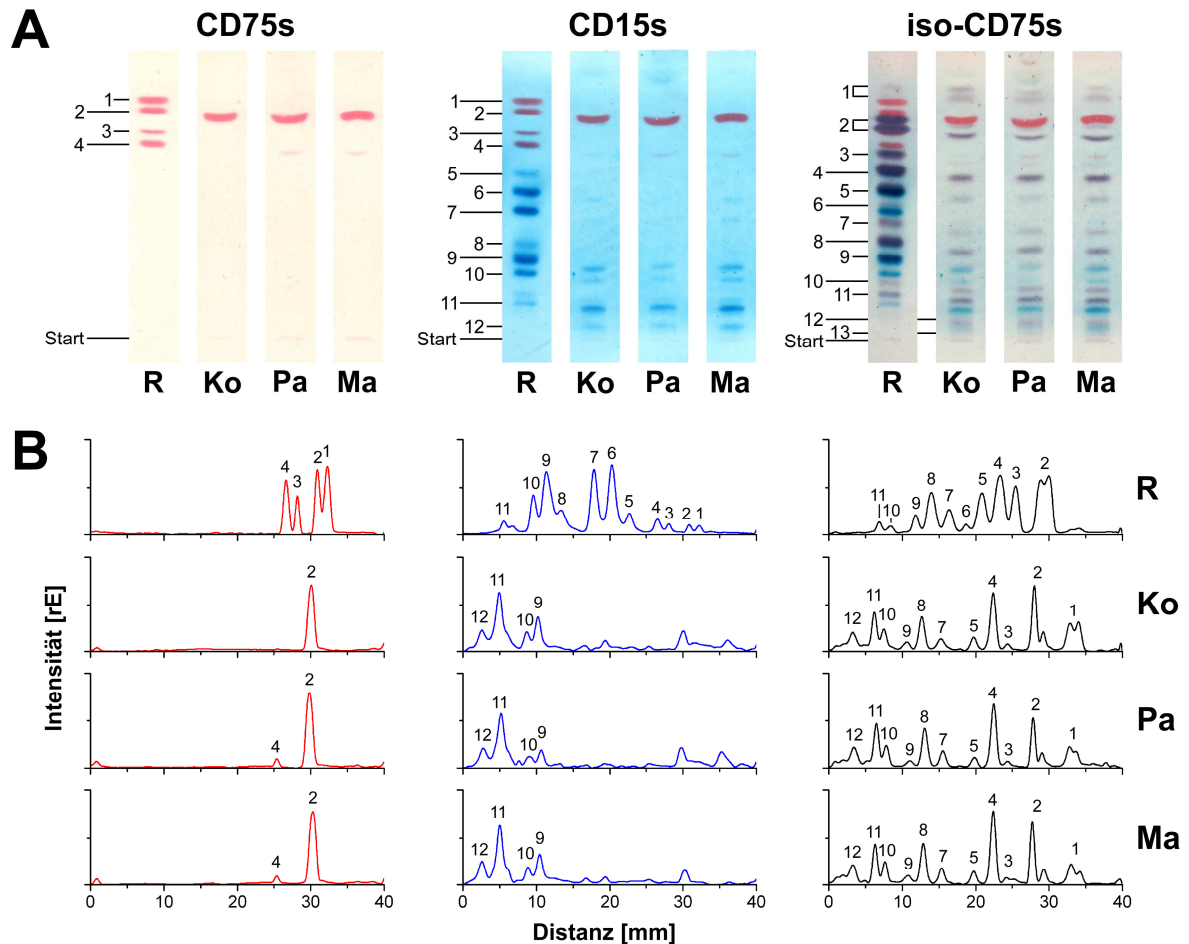
#### 4.4.3 Mehrfachfärbung hoch komplexer Serumganglioside

Mit Hilfe der DC-Overlay-Assay-Technik wurden die Profile hoch komplexer Serumganglioside von je 40 Patienten mit Pankreasadenokarzinomen und Magenkarzinomen untersucht und mit denen einer Kontrollgruppe bestehend aus 20 Individuen verglichen.

Dazu wurden die Gangliosid-haltigen Fraktionen 2, 3 und 4 vereinigt, in Mengen entsprechend 60 µl Serum auf DC-Platten aufgetragen und mit Laufmittel 3 für hochpolare Ganglioside getrennt. Ganglioside mit CD75s-, CD15s- und iso-CD75s-Determinanten wurden mittels Overlay-Assay-Mehrfachfärbung in drei Etappen in dieser Reihenfolge nachgewiesen (Abbildung 4.26). Die erste Färbung wurde mit dem polyklonalen Anti-CD75s Antikörper (AB2-6) und dem Fast Red-Detektionssystem durchgeführt und die zweite Färbung mit dem monoklonalen Anti-CD15s-Antikörper CSLEX-1 und BCIP als Substrat. Bei der dritten Färbung wurde das *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA) und das NBT/BCIP-Detektionssystem eingesetzt (Abbildung 4.26A).

Durch die Auftragung von Probenmengen entsprechend konstanter Serumvolumina konnten mittels Densitometrie relative Konzentrationen der Serumganglioside bestimmt werden (Abbildung 4.26B).

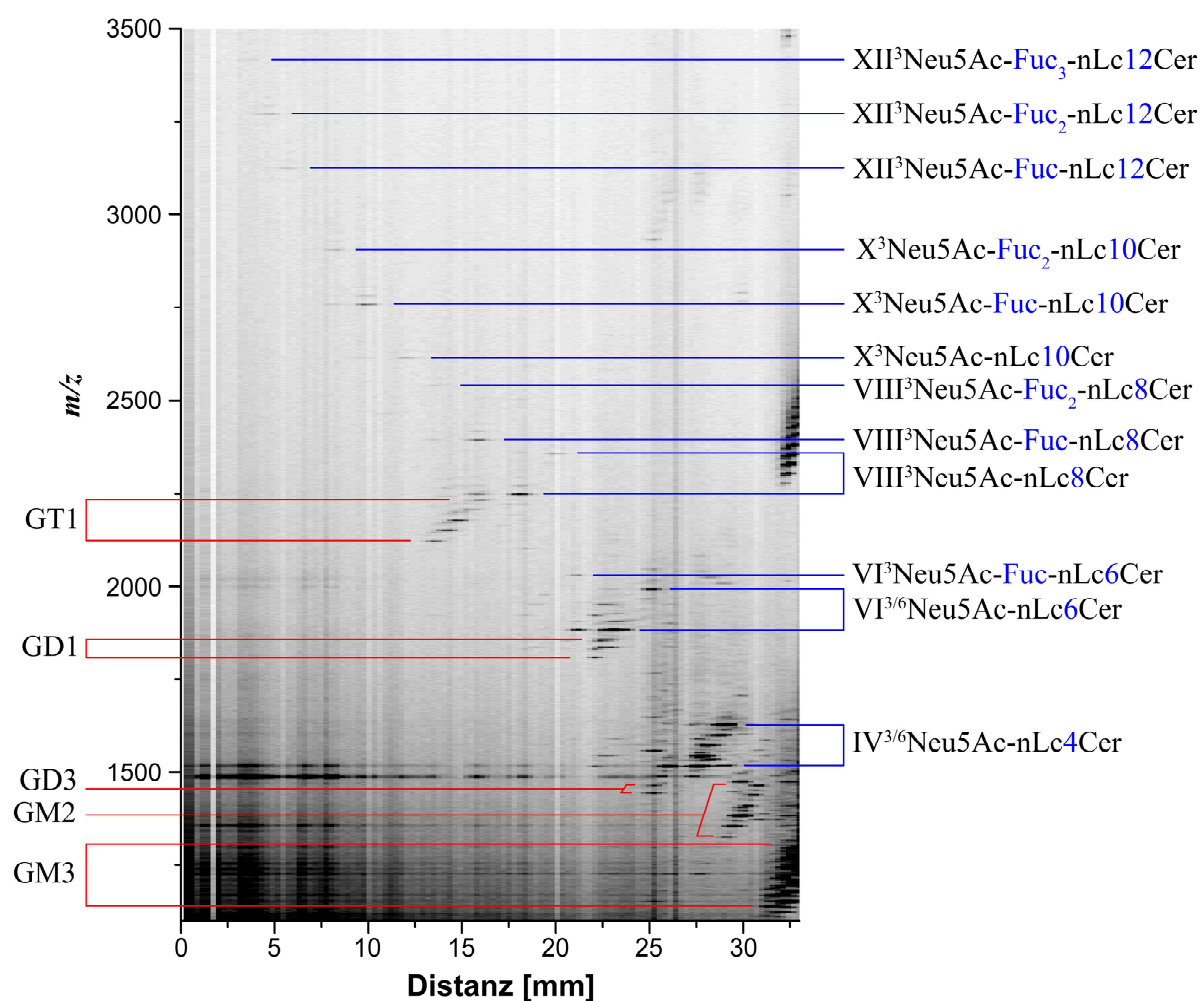
Im Folgenden werden die detektierten Strukturen über ihr Strukturmotiv und der Nummer, die sich aus der Reihenfolge ihrer chromatographischen Mobilität ergibt, bezeichnet, z.B. „CD15s-7“.



**Abbildung 4.26: Erstellung von Serumgangliosidprofilen für Patienten mit Pankreasadenokarzinomen (Pa) und Magenkarzinomen (Ma) sowie für Individuen einer Kontrollgruppe (Ko).** (A) DC-Overlay-Assay-Mehrfachfärbung von Gangliosiden aus 60  $\mu$ l Serum. CD75s-Ganglioside wurden im ersten (rot), CD15s-Ganglioside im zweiten (blau) und iso-CD75s-Ganglioside im dritten Assay (schwarz) nachgewiesen. (B) Mittels Densitometrie bestimmte spezifische Chromatogramme der einzelnen Färbungen. Die Bezeichnung der erhaltenen Signale erfolgt über ihre Nummerierung in der Reihenfolge der chromatographischen Mobilität. Als Referenz wurde eine Fraktion von polaren Gangliosiden aus humanen Granulozyten eingesetzt (JM07/7-3, 2,5  $\mu$ g).

#### 4.4.4 Strukturelle Charakterisierung Overlay-Assay-detektierter Serumganglioside

Zur Aufklärung der Strukturen der Overlay-Assay-detektierten Serumganglioside wurden DC-Bahnen über die IR-MALDI-o-TOF-MS im Abtastmodus untersucht. Hierfür wurden Spektren in kleinen, regelmäßigen Schritten entlang einer mehrfach gefärbten Bahn aufgenommen.



**Abbildung 4.27:** (-) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS im Abtastmodus. Massenspektren wurden in regelmäßigen Abständen entlang einer Bahn mit mehrfach DC-Overlay-Assay-gefärbten Serumgangliosiden aufgenommen. Auf der Bahn wurden Ganglioside aus 150  $\mu$ l Serum eines Kontroll-Patienten aufgetrennt. Signale von Gangliosiden der Neolakto-Serie sind blau gekennzeichnet, die der Ganglio-Serie und von GM3 sowie GD3 in rot. Eine vollständige Auflistung der detektierten Ganglioside findet sich in Tabelle 8.8.

Die Ergebnisse eines solchen Experiments sind in Abbildung 4.27 dargestellt, wo Laufhöhe gegen  $m/z$  aufgetragen wurde. Die für diese Bahn aufgetragene Gangliosidmenge entstammt aus 150  $\mu$ l Serum eines Krebs-freien Spenders. Die Ganglioside wurden entsprechend dem im vorherigen Kapitel eingeführten Protokoll getrennt und per Overlay-Assay-Mehrfachfärbung detektiert. Mit der DC-MALDI-Technik wurde eine Vielzahl von Gangliosidionen detektiert, die hauptsächlich der Ganglio- und Neolakto-Serie zugeordnet werden konnten. Das nachgewiesene Gangliosidprofil deckt sich größtenteils mit dem der direkten nanoESI-QTOF-MS-Messung (vgl. Abbildung 4.25). In Tabelle 8.8 sind alle Gangliosidspezies des DC-MALDI-MS- (Abbildung 4.27) und des nanoESI-QTOF-MS-Experiments (Abbildung 4.25) aufgelistet.

Einen tieferen Einblick in die Struktur der nachgewiesenen Ganglioside ermöglicht die Kombination der Informationen aus Overlay-Assay und Massenspektrometrie. Dies wird in Abbildung 4.28 gezeigt. Es wurden sogenannte Ionenchromatogramme für Gangliosid-Ionen erstellt. Dabei wurde die Intensität für bestimmte  $m/z$ , denen Ganglioside zugeordnet wurden, gegen die Migrationsdistanz aufgetragen. Über Korrelation können Signale der Ionenchromatogramme denen der Overlay-Assay-Mehrfachfärbung zugewiesen werden. In Abbildung 4.28 wurden Ionenchromatogramme für monosialylierte Ganglioside mit vermuteten nLc4Cer- (A), nLc6Cer- (B), nLc8Cer- (D), nLc10Cer- (E) und nLc12Cer- Grundstrukturen (F) aufgetragen. Sie zeigen starke Korrelationen mit Signalen des entsprechenden Mehrfach-Overlay-Assays gegen CD75s, CD15s und iso-CD75s (vgl. Abbildung 4.26).

### Isomere CD75s- und iso-CD75s-Ganglioside

Über die Kombination von Overlay-Assay- und MS-Daten wurden Molekülstrukturen für die Signale des Serumgangliosidprofils vorgeschlagen (Tabelle 4.3). Dabei wurden viele isomere Strukturen identifiziert. Dies betrifft CD75s- und iso-CD75s-Ganglioside jeweils abgeleitet von nLc4Cer und nLc6Cer-Grundstrukturen. Diese wurden über DC-Trennung räumlich aufgelöst, wie auch aus den Ionenchromatogrammen von IV<sup>6</sup>nLc4Cer (d18:1, C16:0) und IV<sup>3</sup>nLc4Cer (d18:1, C16:0) mit  $m/z$  1516 (Abbildung 4.28A) und VI<sup>6</sup>nLc6Cer (d18:1, C16:0) und VI<sup>3</sup>nLc6Cer (d18:1, C16:0) mit  $m/z$  1881 (Abbildung 4.28B) zu entnehmen ist. Über Korrelation mit den CD75s- und iso-CD75s-Signalen der Overlay-Assays konnte die Konfiguration der terminalen Neuraminsäure bestimmt werden. Es zeigt sich, dass CD75s-Ganglioside eine geringere chromatographische Mobilität besitzen und im Ionenchromatogramm bei geringeren Distanzen detektiert werden als ihre  $\alpha$ 2,3-sialylierten Isomere.

Über die DC-MS Methode wurde festgestellt, dass sich das Spektrum der CD75s- und iso-CD75s-Ganglioside in verschiedenen Aspekten unterscheidet. So weichen sie beispielsweise in den Profilen ihrer Grundstrukturen voneinander ab. CD75s-Determinanten treten hauptsächlich auf Gangliosiden mit kleinen nLc4- und nLc6-Glykangrundstrukturen auf. Im Vergleich dazu konnte das iso-CD75s-Motif auf Gangliosiden nachgewiesen werden, die sowohl nLc4- und nLc6- als auch nLc8- bis nLc12- Grundstrukturen besitzen. Zudem zeigen die isomeren Ganglioside eine unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung des Ceramidteils. Im Gegensatz zu CD75s-Gangliosiden weisen iso-CD75s-Ganglioside über kurz-kettige C16-*N*-Acylgruppen hinaus auch länger-kettige C18-, C20-, C22- und C24-*N*-Acylgruppen auf,

was besonders ausgeprägt bei den nLc4Cer-Gangliosiden auftritt (vgl. Abbildung 4.28A und B sowie Tabelle 4.3: iso-CD75s-1 vs. CD75s-2).

### Isomere fukosylierte Ganglioside

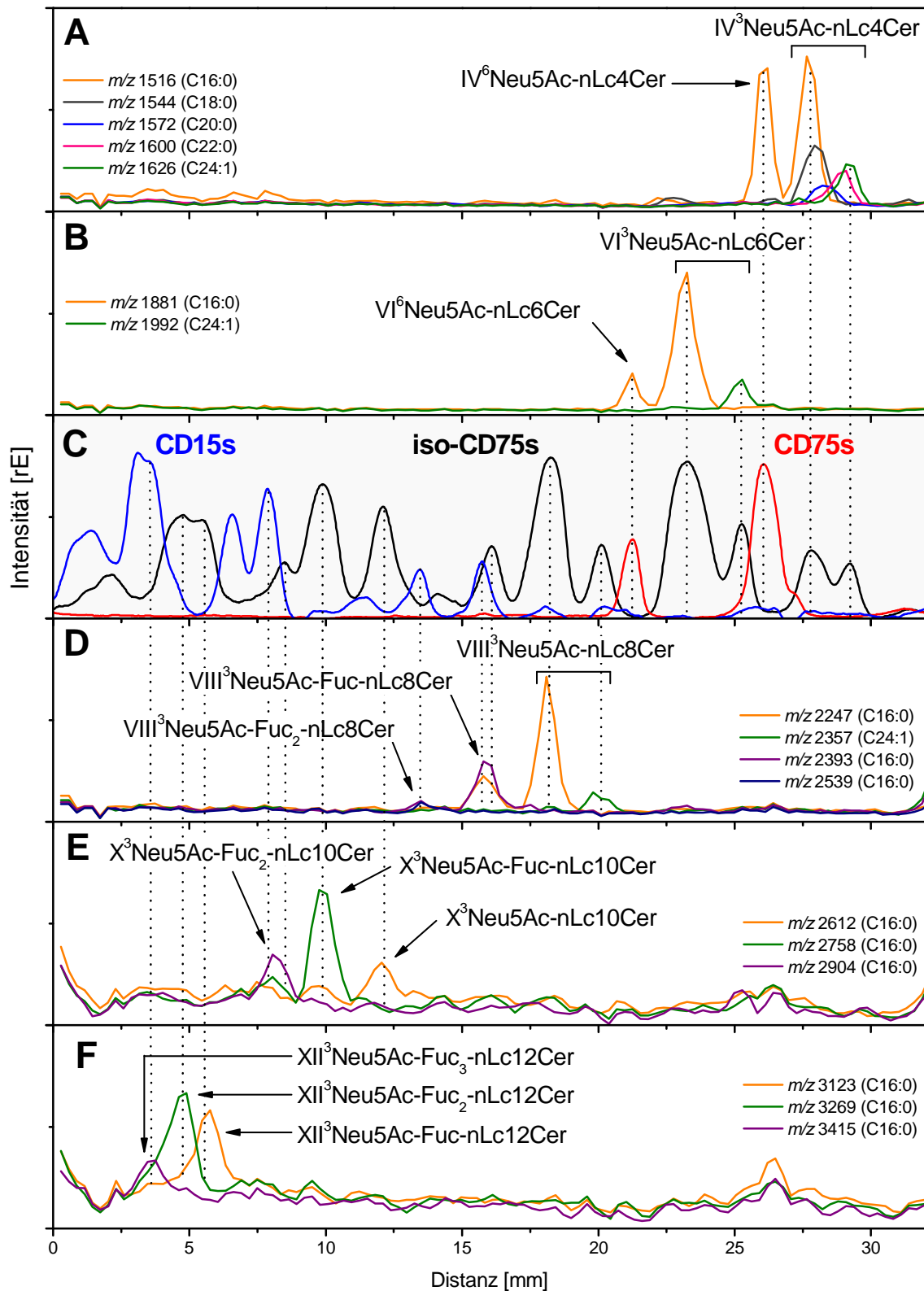
Auch auf Basis der differentiellen Fukosylierung können isomere Strukturen unterschieden werden. Komplexe Ganglioside mit langen Oligosaccharidketten können in unterschiedlichem Grad und an unterschiedlichen Positionen fukosyliert sein. Über die Verwendung des CSLEX-1-Antikörpers wurden spezifisch fukosylierte Ganglioside mit CD15s-Determinanten, die eine Fukose in  $\alpha$ 1,3-Konfiguration am subterminalen GlcNAc besitzen, nachgewiesen. Zusätzlich wurden mit der MAA-Färbung fukosylierte iso-CD75s-Ganglioside detektiert, die aufgrund der Bindungsspezifität von MAA höchstwahrscheinlich interne Fukosen besitzen.

Ein Beispiel für diese Isomere sind monofukosylierte, monosialylierte nLc8Cer-Ganglioside, die eine sehr ähnliche Laufhöhe aufweisen. Das Ionenchromatogramm in Abbildung 4.28D zeigt für das entsprechende  $m/z$  2393 nur ein Signal. Ein Vergleich mit den Chromatogrammen des Overlay-Assays in Abbildung 4.28C zeigt jedoch, dass mindestens zwei unterschiedliche Glykoformen vorliegen müssen, CD15s-Ganglioside, VIII<sup>3</sup>Neu5Ac-VII<sup>3</sup>Fuc-nLc8Cer (d18:1, C16:0), und intern fukosylierte, VIII<sup>3</sup>Neu5Ac-Fuc-nLc8Cer (d18:1, C16:0), bei denen die genaue Position der Fukosylierung unbekannt bleibt (vgl. Tabelle 4.3: CD15s-7 und iso-CD15s-5). Dabei zeigen die CD15s-Ganglioside eine geringere Mobilität bei der DC, was jedoch bei dem eingesetzten System nicht für eine vollständige Trennung dieser Strukturen reicht.

Für 16 der insgesamt 19 Overlay-Assay-detektierten Serumganglioside konnten über die MS-Messungen keine Strukturen abgeleitet werden. Ausnahmen bilden die mit CD15s-10, CD15s-12 und iso-CD75s-12 bezeichneten Ganglioside (Abbildung 4.26; Tabelle 4.3).

Im Fall von CD15s-10 liegt die Nachweisgrenze des MS-Verfahrens offensichtlich unter der des Overlay-Assays. Jedoch konnte auf einer Bahn mit der Referenzgangliosidmischung aus humanen Granulozyten X<sup>3</sup>Neu5Ac-IX<sup>3</sup>Fuc-Fuc<sub>2</sub>-nLc10Cer (d18:1, C16:0) mit  $m/z$  3050,46 in einer CD15s-positiven Bande gleicher Laufhöhe detektiert werden (Tabelle 8.9). Es wird angenommen, dass diese Struktur auch im Serum vorliegt.

Bei CD15s-12 und iso-CD75s-12, die nur in Serum nachgewiesen wurden handelt es sich wahrscheinlich um extrem polare Ganglioside mit Grundstrukturen größer als nLc12Cer. Aufgrund der geringen Laufstrecke ist jedoch nicht klar, ob aufgetrennte Einzelsubstanzen vorliegen. Eine genauere Strukturzuweisung ist mit den erhobenen Daten nicht möglich.



**Abbildung 4.28: Strukturaufklärung von Serumgangliosiden durch Kombination von DC-Overlay-Assay-Mehrfachfärbung und DC-IR-MALDI-o-TOF MS.** Ionenchromatogramme von Gangliosiden mit nLc4Cer- (A), nLc6Cer- (B), nLc8Cer- (D), nLc10Cer- (E) und nLc12Cer-Grundstruktur (F) (vgl. Abbildung 4.27) werden mit CD75s-, CD15s- und iso-CD75s-Signalen aus Overlay-Assay-Chromatogrammen (C) der gleichen Bahn korreliert (vgl. Abbildung 4.26). Eine Auflistung der zugeordneten Ganglioside mit Strukturvorschlägen ist in Tabelle 4.3 gegeben.



**Tabelle 4.3: Zuordnung von Gangliosid-Strukturen zu Signalen der Overlay-Assay-Mehrfachfärbung von Serumgangliosiden. Strukturvorschläge basieren auf DC-IR-MALDI-MS Daten (DC-MS) in Kombination mit Strukturinformation des Overlay-Assays (vgl. Abbildung 4.28).**

Signal Overlay- Assay	Strukturvorschlag	<i>m/z</i> (DC-MS) <sup>a</sup>	<i>m/z</i> (theoret.) <sup>a</sup>
CD75s-2	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	1516,84	1516,84
	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C18:0)	1544,88	1544,87
	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C20:0)	1572,94	1572,90
CD75s-4	VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0)	1881,98	1881,97
CD15s-6	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-VII <sup>3</sup> Fuc-nLc8Cer (d18:1, C16:0)	2393,20	2393,16
CD15s-7	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-VII <sup>3</sup> Fuc-Fuc-nLc8Cer (d18:1, C16:0)	2539,22	2539,22
CD15s-9	X <sup>3</sup> Neu5Ac-IX <sup>3</sup> Fuc-Fuc-nLc10Cer (d18:1, C16:0)	2904,43	2904,35
CD15s-10	<i>X<sup>3</sup>Neu5Ac-IX<sup>3</sup>Fuc-Fuc<sub>2</sub>-nLc10Cer (d18:1, C16:0)<sup>b</sup></i>	-	-
CD15s-11	XII <sup>3</sup> Neu5Ac-XI <sup>3</sup> Fuc-Fuc <sub>2</sub> -nLc12Cer (d18:1, C16:0)	3415,52	3415,54
CD15s-12	?	-	-
iso-CD75s-1	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C14:0)	1488,80	1488,81
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C15:0)	1502,82	1502,82
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:1)	1514,82	1514,82
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	1516,84	1516,84
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C18:1)	1542,86	1542,85
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C18:0)	1544,87	1544,87
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C20:1)	1570,87	1570,88
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C20:0)	1572,89	1572,90
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C21:0)	1586,92	1586,92
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:1)	1598,91	1598,92
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0)	1600,93	1600,93
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C23:1)	1612,92	1612,93
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C23:0)	1614,94	1614,95
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:2)	1624,94	1624,93
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)	1626,95	1626,95
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C25:1)	1640,98	1640,96
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, h24:1)	1642,95	1642,94
IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C25:0)	1642,96	1642,98	
iso-CD75s-2	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:1)	1879,94	1879,95
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0)	1881,97	1881,97
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C18:0)	1910,01	1910,00
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C22:0)	1966,03	1966,06
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:1)	1992,09	1992,08
iso-CD75s-3	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc8Cer (d18:1, C24:1)	2247,11	2357,21
iso-CD75s-4	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc8Cer (d18:1, C16:0)	2357,22	2247,10
iso-CD75s-5	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc8Cer (d18:1, C16:0)	2393,17	2393,16
iso-CD75s-7	X <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc10Cer (d18:1, C16:0)	2612,21	2612,23
iso-CD75s-8	X <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc10Cer (d18:1, C16:0)	2758,26	2758,29
iso-CD75s-9	X <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc <sub>2</sub> -nLc10Cer (d18:1, C16:0)	2904,35	2904,35
iso-CD75s-10	XII <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc12Cer (d18:1, C16:0)	3123,40	3123,42
iso-CD75s-11	XII <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc <sub>2</sub> -nLc12Cer (d18:1, C16:0)	3269,55	3269,48
iso-CD75s-12	?	-	-

<sup>a</sup> monoisotopische *m/z*-Werte der  $[M-H]^-$ -Ionen; <sup>b</sup> abgeleitet von Referenzgangliosiden (Tabelle 8.9).

#### 4.4.5 Statistische Auswertung

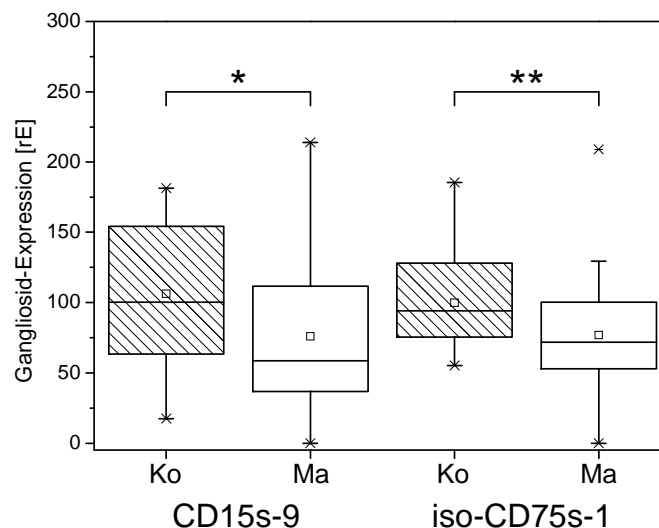
Die mittels DC-Overlay-Assay-Mehrfachfärbung bestimmten Serumgangliosidprofile der Patientenkollektive wurden statistisch ausgewertet. Es wurde nach Gangliosiden gesucht, deren relative Konzentrationen entweder mit der Präsenz eines Tumors oder auch mit pathologischen Parametern der Erkrankung in Verbindung stehen.

##### 4.4.5.1 Serumganglioside und Magenkarzinome

###### Assoziation mit maligner Transformation

Beim Vergleich der Serumgangliosidprofile von Patienten der Magenkrebs- und der Kontrollgruppe konnten keine Strukturen festgestellt werden, die spezifisch nur in einer Gruppe auftraten. Die Ganglioside, die identifiziert wurden, treten demnach sowohl in Serum von gesunden, als auch Krebspatienten auf.

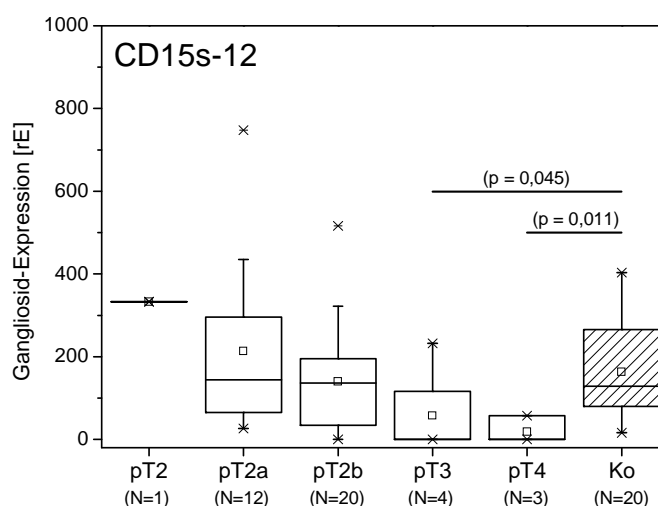
Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede in den Konzentrationen von CD15s-9 ( $p = 0,033$ ) und iso-CD75s-1 ( $p = 0,010$ ) (vgl. Tabelle 4.3), die beide in Serum von Magenkrebs-Patienten mit verringerten Konzentrationen auftreten. Box-Plot-Diagramme, die die Verteilungen der Gangliosidkonzentrationen in Serum der Kontrollgruppe und der Gruppe der Magenkarzinom-Patienten veranschaulichen, sind in Abbildung 4.29 dargestellt.



**Abbildung 4.29:** Box-Plot-Diagramme der Gangliosid-Konzentrationen von CD15s-9 und iso-CD75s-1 in Seren von Magenkarzinom-Patienten (Ma) (N = 40) und der Kontrollgruppe (Ko) (N = 20). Beide Ganglioside zeigen eine Reduktion bei den Krebspatienten (CD15s-9,  $p=0.033$ ; iso-CD75s-1,  $p=0.010$ )

### Assoziation mit der Größe des Primärtumors

Durch den Parameter pT wird die Ausdehnung des Primärtumors in der Magenschleimhaut und darüber hinaus beschrieben (Tabelle 1.2). Je größer der Wert von pT um so größer und invasiver der Tumor. Magenkarzinom-Patienten wurden anhand ihrer Tumorausdehnung in 5 Gruppen eingeteilt und Unterschiede in ihren Gangliosidprofilen untersucht. Dabei wurde ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration des Gangliosids CD15s-12 und pT gefunden ( $p = 0,004$  /  $\tau = -0,360$ ). Wie Abbildung 4.30 zu entnehmen ist, sinkt die CD15s-12-Konzentration im Serum mit zunehmender Ausdehnung des Primärtumors. Dabei ist sie bei geringer Ausdehnung des Tumors noch auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Bei Patienten mit pT3- und pT4-Tumoren ist die Serumkonzentration von CD15s-12-Gangliosiden im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert ( $p = 0,045$  bzw.  $p = 0,011$ ). Gleichgerichtete Trends wurden auch bei den hochpolaren Gangliosiden iso-CD75s-8 bis -12 und CD15s-9 und -10 festgestellt. Diese waren jedoch nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 4.30:** Box-Plot-Diagramme der CD15s-12-Gangliosidkonzentrationen im Seren von Magenkarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Primärtumors pT (vgl. Tabelle 1.2). Der stetige Zusammenhang zwischen der CD15s-12-Konzentration und pT ist signifikant ( $p = 0,004$  /  $\tau = -0,360$ ). Studien mit signifikant verringerten Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko) sind eingezeichnet.

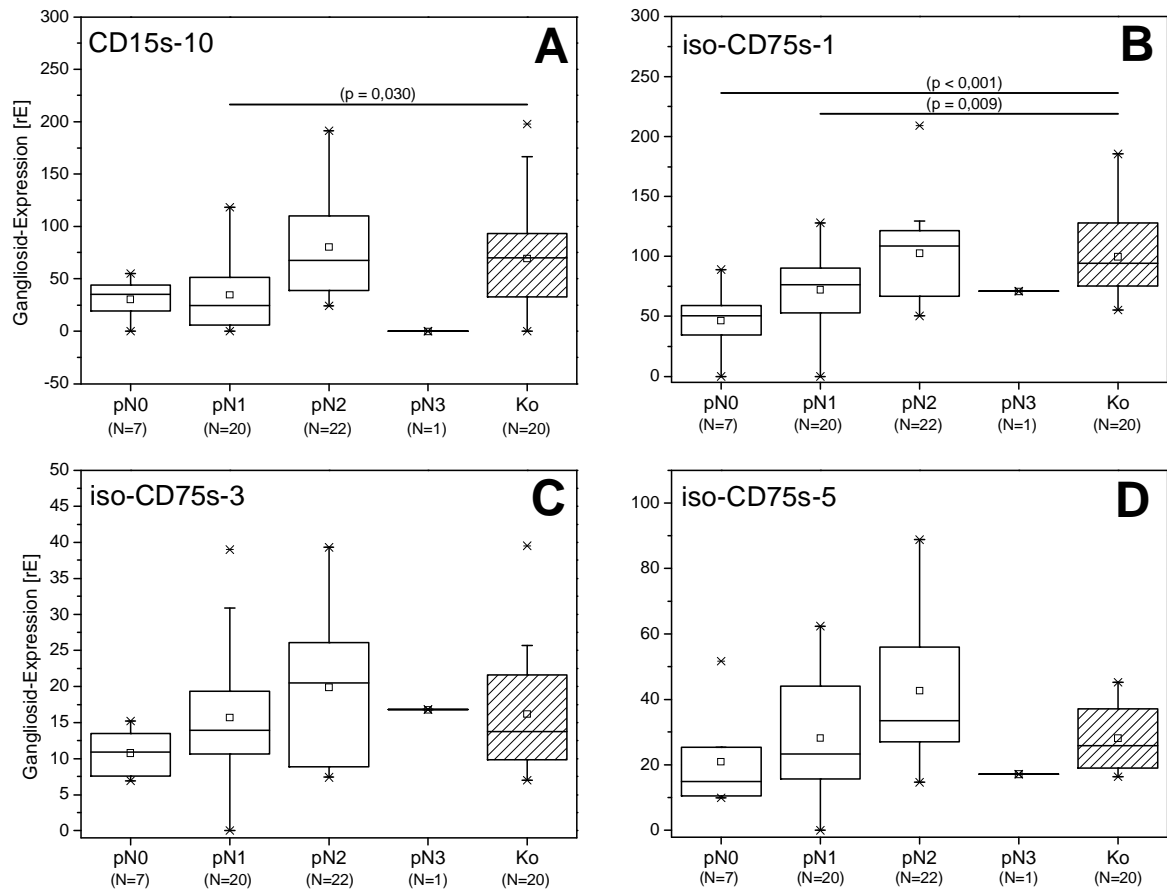
### Assoziation mit dem Metastasierungs-Status

Auch der Einfluss von Lymphknotenmetastasen auf die Konzentrationen von Serumgangliosiden wurde untersucht. Das Auftreten und die Anzahl von regionalen Lymphknotenmetastasen wird durch den Parameter pN beschrieben (Tabelle 1.2). Magenkarzinom-Patienten wurden aufgrund von N in vier Gruppen eingeteilt: N0, keine

Lymphknotenmetastasen; pN1, bis zu 6; pN2, bis zu 15 und pN3 mehr als 15 regionale Lymphknotenmetastasen.

Insgesamt vier der untersuchten Serumgangliosiden korrelierten mit dem Ausmaß der lymphogenen Ausbreitung der Krebserkrankung. Dies sind CD15s-10 ( $p = 0,043 / \tau = 0,256$ ), iso-CD75s-1 ( $p = 0,003 / \tau = 0,372$ ), iso-CD75s-3 ( $p = 0,044 / \tau = 0,252$ ) und iso-CD75s-5 ( $p = 0,036 / \tau = 0,263$ ). Die Verteilungen der Gangliosidkonzentrationen in Abhängigkeit von pN und die entsprechenden Verteilung in der Kontrollgruppe sind in Abbildung 4.31 in Form von Box-Plot-Diagrammen dargestellt. Alle vier Ganglioside zeigen den gleichen Trend. Ihre Konzentrationen steigen mit der Präsenz und der Anzahl der Metastasen. Dabei befinden sich bei der pN0- und pN1-Gruppe die Konzentrationen von CD15s-10 und iso-CD75s-1 teilweise signifikant unter dem entsprechenden Niveau der Kontrollgruppe (Abbildung 4.31A und B) und steigt bei pN2 auf Normalniveau. Bei iso-CD75s-3 und iso-CD75s-5 (Abbildung 4.31C und D) befinden sich die Konzentrationen in der pN0-Gruppe ebenfalls unter dem Niveau der Kontrollgruppe, steigen aber bis zur pN2-Gruppe leicht über das Normalniveau.

Die pN3-Gruppe beinhaltet nur ein Individuum und ist dementsprechend statistisch wenig repräsentativ.



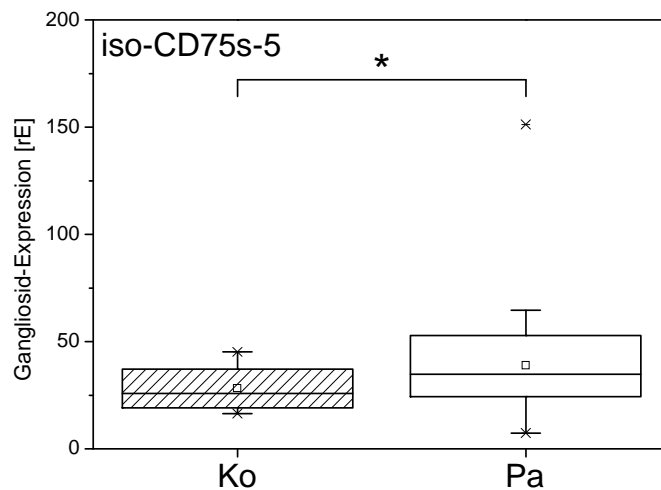
**Abbildung 4.31: Box-Plot-Diagramme der Konzentration von CD15s-10 (A), iso-CD75s-1 (B), iso-CD75s-3 (C) und iso-CD75s-5 (D) im Seren von Magenkarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der Existenz und der Anzahl von regionalen Lymphknotenmetastasen pN (vgl. Tabelle 1.2). Der stetige Zusammenhang zwischen den Gangliosidkonzentrationen und N ist signifikant (CD15s-10,  $p = 0,043$  /  $\tau = 0,256$ ; iso-CD75s-1,  $p = 0,003$  /  $\tau = 0,372$ ; iso-CD75s-3,  $p = 0,044$  /  $\tau = 0,252$  und iso-CD75s-5,  $p = 0,036$  /  $\tau = 0,263$ ). Stadien mit signifikant verschiedenen Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko) sind eingezeichnet.**

Untersuchungen auf Korrelation von Serumgangliosidkonzentrationen mit der Präsenz von Fernmetastasen, dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen und dem UICC-Tumorstadium ergaben keine signifikanten Zusammenhänge.

#### 4.4.5.2 Serumganglioside und Pankreaskarzinome

##### Assoziation mit maligner Transformation

Analog zu den Serumgangliosidprofilen des Magenkarzinom-Kollektivs wurden auch die des Pankreasadenokarzinom-Kollektivs mit der Kontrollgruppe verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte iso-CD75s-5-Konzentration im Kollektiv der Krebspatienten ( $p = 0,044$ ) (Abbildung 4.32).



**Abbildung 4.32: Box-Plot-Diagramme der Konzentrationen von iso-CD75s-5-Gangliosiden in Seren von Pankreasadenokarzinom-Patienten (Pa, N = 40) und der Kontrollgruppe (Ko, N = 20). Die Gangliosidkonzentration ist im Serum der Krebspatienten signifikant erhöht (p = 0,044).**

#### Assoziation mit der Größe des Primärtumors

Bei der Untersuchung der Gangliosidkonzentrationen in Verbindung mit pathologischen Parametern wurde eine Verbindung zwischen der Ausdehnung des Primärtumors pT und den Serumkonzentrationen von CD15s-10, CD15s-11, CD15s-12, iso-CD75s-5, iso-CD75s-9, iso-CD75s-10 und iso-CD75s-11 festgestellt (entsprechende Strukturen in Tabelle 4.3). In Abbildung 4.33 sind die Konzentrationsverteilungen dieser Ganglioside in Abhängigkeit von pT als Box-Plot-Diagramme dargestellt. Die Konzentrationen dieser Ganglioside zeigen signifikant, inverse Korrelationen mit der Tumorausdehnung, d.h., dass ihre Konzentrationen mit zunehmender Größe und Invasivität des Tumors sinken (iso-CD75s-5, p = 0,006 /  $\tau = -0,344$ ; iso-CD75s-9, p = 0,018 /  $\tau = -0,297$ ; iso-CD75s-10, p = 0,046 /  $\tau = -0,251$ ; iso-CD75s-11, p = 0,013 /  $\tau = -0,314$ ; CD15s-10, p = 0,021 /  $\tau = -0,291$ ; CD15s-11, p = 0,031 /  $\tau = -0,271$ ; CD15s-12, p = 0,030 /  $\tau = -0,273$ ).

Dabei zeigen Patienten im Frühstadium der Krankheit, pT1 und pT2, gegenüber der Kontrollgruppe generell ein erhöhtes Niveau, das sich stellenweise sogar signifikant unterscheidet, wie z.B. in Abbildung 4.33 im Fall von iso-CD75s-5 (A), iso-CD75s-9 (B) und iso-CD75s-11 (D). Die Konzentrationen sinken aber allgemein auf Subnormalniveau bei Patienten mit pT3. Die pT4-Gruppe beinhaltet lediglich einen Patienten, der entgegen dem Trend überdurchschnittlich hohe Gangliosidkonzentrationen aufweist. Da es sich jedoch bei diesen Einzelwerten um mögliche Ausreißer handelt, kann keine statistisch zuverlässige Aussage über das Verhalten dieser „Gruppe“ gemacht werden.

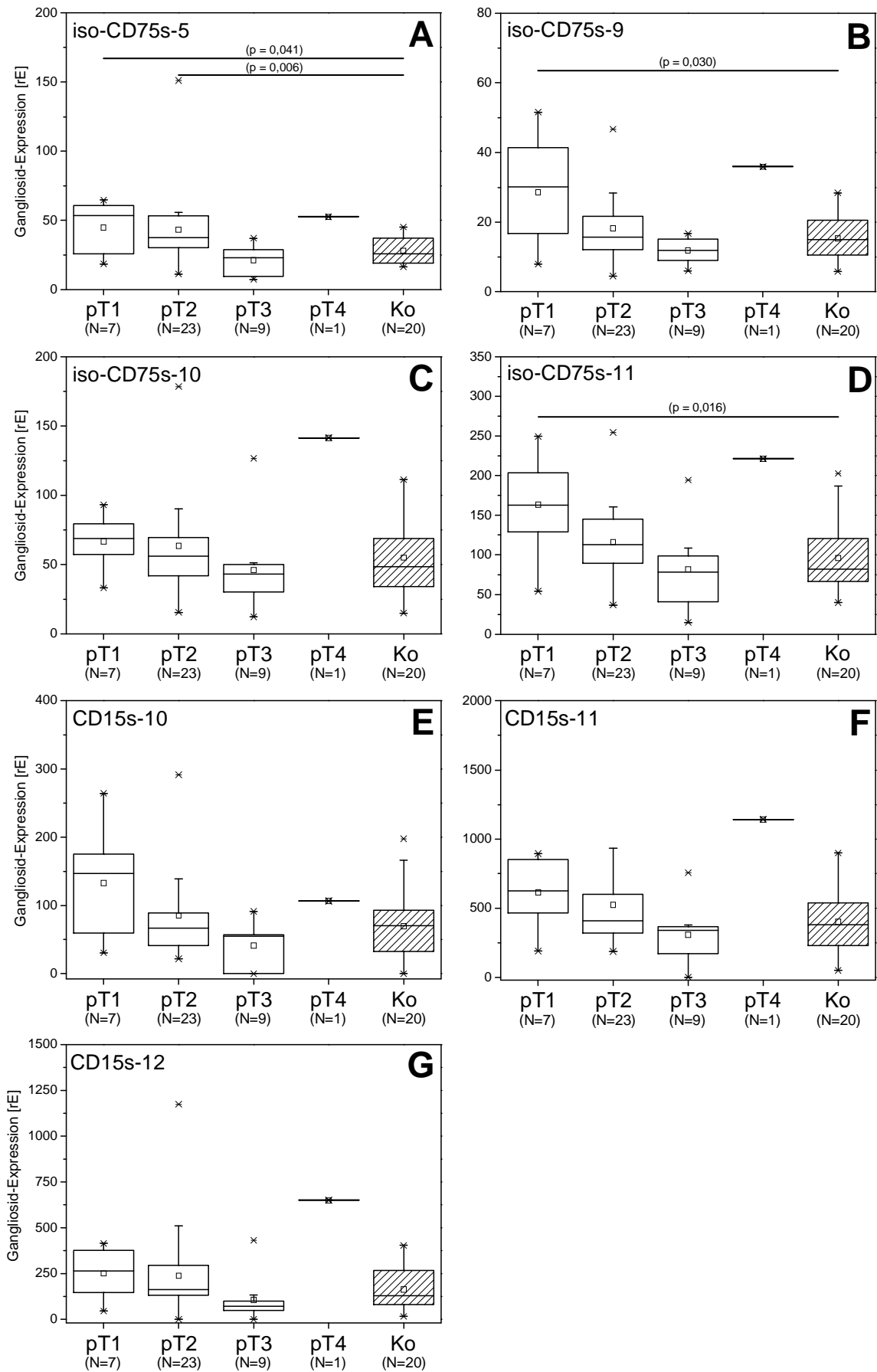


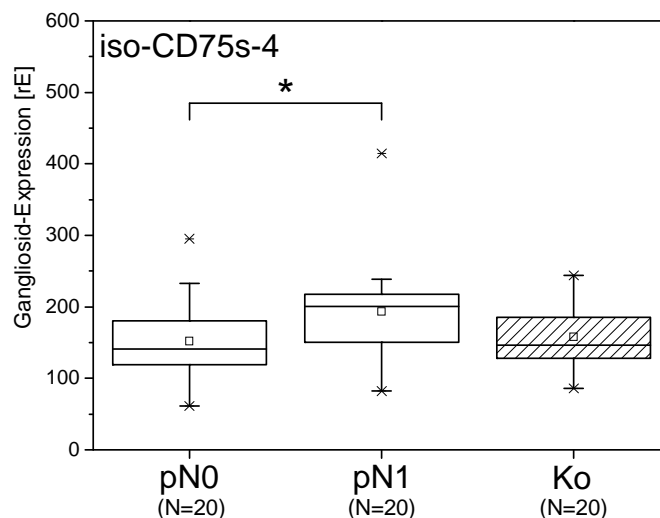
Abbildung 4.33: Beschriftung auf der nächsten Seite

**Abbildung 4.33: Box-Plot-Diagramme der Konzentration von iso-CD75s-5 (A), iso-CD75s-9 (B), iso-CD75s-10 (C), iso-CD75s-11 (D), CD15s-10 (E), CD15s-11 (F) und CD15s-12 (G) im Serum von Pankreasadenokarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Primärtumors pT (vgl. Tabelle 1.3). Der stetige Zusammenhang zwischen den Gangliosidkonzentrationen und pT ist signifikant (iso-CD75s-5,  $p = 0,006$  /  $\tau = -0,344$ ; iso-CD75s-9,  $p = 0,018$  /  $\tau = -0,297$ ; iso-CD75s-10,  $p = 0,046$  /  $\tau = -0,251$ ; iso-CD75s-11,  $p = 0,013$  /  $\tau = -0,314$ ; CD15s-10,  $p = 0,021$  /  $\tau = -0,291$ ; CD15s-11,  $p = 0,031$  /  $\tau = -0,271$ ; CD15s-12,  $p = 0,030$  /  $\tau = -0,273$ ). Stadien mit signifikant verschiedenen Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko) sind eingezeichnet.**

### Assoziation mit dem Metastasierungs-Status

Auch im Zusammenhang mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt. Das Gangliosid iso-CD75s-4 weist im Serum der Patienten mit Metastasen (pN1) eine höhere Konzentration auf als in dem von Patienten mit lokal begrenzten Tumoren (pN0) ( $p = 0,024$ ). Das Konzentrationsniveau der pN1-Patienten ist auch gegenüber dem der Kontrollgruppe erhöht, wobei der Unterschied jedoch mit  $p = 0,087$  nicht signifikant ist.

Untersuchungen auf Korrelation von Serumgangliosidkonzentrationen mit der Präsenz von Fernmetastasen, dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen und dem UICC-Tumorstadium ergaben keine signifikanten Zusammenhänge.



**Abbildung 4.34: Box-Plot-Diagramme der Konzentration von iso-CD75s-4 in Seren der Kontrollgruppe (Ko) und Pankreasadenokarzinom-Patienten mit (pN1) und ohne (pN0) regionale Lymphknotenmetastasen (vgl. Tabelle 1.3). In den Seren der Krebspatienten zeigt die Gangliosidkonzentration einen signifikanten Anstieg bei Anwesenheit von Metastasen ( $p = 0,024$ ).**



## 5 Diskussion

### 5.1 Entwicklung eines DC-Mehrfach-Overlay-Assays für GSL

Durch die Verwendung unterschiedlicher chromogener Substrate und die Kombination mehrerer Detektionsschritte wurde der DC-Overlay-Assay hinsichtlich seiner Informationsausbeute verbessert. Die Methode erlaubt es, mehrere verschiedene GSL-Epitope in einem einzigen Chromatogramm spezifisch nachzuweisen. Die Erzeugung von chromophoren Präzipitaten mit unterschiedlichen Farben bzw. Absorptionscharakteristika ermöglicht sowohl eine visuelle Unterscheidung der einzelnen Färbungen als auch eine spezifische Detektion und Quantifizierung durch die Variation der Messwellenlänge bei der Densitometrie.

#### 5.1.1.1 Vermeidung von Verschleppungseffekten

Bei der Mehrfachfärbung der neutralen GSL LacCer, Gb3Cer und Gb4Cer mit den Substraten Fast Red, BCIP und DAB musste das Problem des Verschleppungseffekts überwunden werden. Die wiederholte Verwendung von Primärantikörpern der gleichen Spezies, in diesem Fall polyklonale Huhn IgY Antikörper, führt in den folgenden Assays zu einer erneuten Anfärbung bereits detektierter GSL. Verschleppungseffekte wurden ebenso von dem wiederholten Gebrauch des gleichen Reporterenzym verursacht. Durch den Einsatz trockener Hitze als Inaktivierungsschritt zwischen den einzelnen Overlay-Assays konnten diese erfolgreich verhindert werden.

Die Hitzebehandlung hat sich gegenüber Alternativen, wie dem enzymatischen Verdau der gebundenen Antikörper und Enzyme sowie der AP-Inaktivierung mit EDTA durchgesetzt, da es als einzige Methode kein Ablösen der Kieselgelschicht vom Glasträger der DC-Platten verursachte und gleichzeitig Verschleppungseffekte, ungeachtet ihrer Ursache (Antikörper oder Reporterenzym), beseitigte. In der Tat wurde sogar ein stabilisierender Effekt der Hitzebehandlung auf das Kieselgel beobachtet.

Sehr wichtig ist, dass die Hitzebehandlung keinen beeinträchtigenden Effekt auf die Empfindlichkeit des GSL-Nachweises zu haben scheint. In einem Zeit-abhängigen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Hitzebehandlung von Gangliosiden in Plexigum-

fixierten DC-Platten lediglich einen geringen Einfluss auf die Signalintensität hat (Abbildung 4.3). Weder durch den Overlay-Assay noch durch MS konnte ein Einfluss der der Hitzebehandlung auf die GSL beobachtet werden. Interessanter Weise konnte nach 30-minütiger Behandlung sogar ein Anstieg der Signalintensität beobachtet werden. Dabei kann es sich um einen ähnlichen Effekt handeln, der in der Immunhistochemie zur Antigen-Rückgewinnung (engl. *antigen retrieval*) eingesetzt wird. Vor der immunchemischen Färbung von Gewebeschnitten wird teilweise eine Hitzebehandlung durchgeführt, um Antigene nach der Fixierung mit Formalin oder nach Einbettung in Paraffin zu demaskieren und den Antikörpern besser zugänglich zu machen (Yamashita 2007).

Taki und Mitarbeiter haben Mitte der 1990er Jahre den Hitzetransfer von Primulin-gefärbten GSL von einer DC-Platte auf eine PVDF-Membran (auch als *far-eastern-blotting* bezeichnet) eingeführt (Taki *et al.* 1995). Diese Technik konnte mit der Sekundärionen-massenspektrometrie kombiniert werden, über die GSL von ausgestochenen PVDF-Membranstücken nachgewiesen wurden (Taki & Ishikawa 1997). Bei diesem Verfahren konnten GSL aus biologischen Proben in Mengen von ca. 1 µg charakterisiert werden. Der Hitzetransfer erfolgt bei dieser Methode bei 180 °C mit einem heißen Bügeleisen oder einem spezialisierten Gerät (Ishikawa & Taki 2000). Diese Technik wurde erfolgreich von mehreren Gruppen angewendet, was darauf hinweist, dass der Hitzetransfer die strukturelle Integrität der GSL nicht zu beeinflussen scheint (Johansson & Miller-Podraza 1998; Johansson *et al.* 1999; Guittard *et al.* 1999). Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen und bestätigt die Temperaturbeständigkeit von GSL.

### **5.1.1.2 Kombination von Overlay-Assay und Massenspektrometrie**

Die Spezifität des Antikörpers und die nachfolgende MS-Analyse liefern komplementäre Informationen über die Struktur des Glykans und Ceramids eines GSLs. Keine der beiden Techniken alleine könnte in diesem Maß zur Strukturaufklärung beitragen (Meisen *et al.* 2003; Meisen *et al.* 2004), da die Bindungsspezifitäten der Monosaccharide, wie anomere Konfiguration und Position der glykosidischen Bindung, mit MS-Sequenzierung nur unzureichend nachgewiesen werden können.

Die Entwicklung eines Multiplexverfahrens für den DC-Overlay-Assay in Kombination mit IR-MALDI-o-TOF-MS stellt eine weitere, signifikante Neuerung in der GSL-Analyse-Strategie dar.

Weder der Protein-Komplex, bestehend aus Primärantikörper und dem Sekundärantikörper-Enzym-Konjugat, noch die *in situ*-entstandenen Chromophore verhinderten eine MALDI-massenspektrometrische Charakterisierung der GSL.

In den Massenspektren mehrfachgefärbter GSL wurden im Positivionenmodus wiederholt Verunreinigungen detektiert, die sich auf ein Polymer auf Basis von Polyethylenglycol (PEG) zurückführen lassen. PEGs werden in sehr vielen technischen Prozessen eingesetzt, aber auch in der Pharmazie und Zellbiologie. Aufgrund ihres Einsatzes z.B. in der Fertigungstechnik und Kosmetikprodukten sind sie häufiger Bestandteil von Alltagsprodukten (Schwartz 2002). In der Massenspektrometrie stellt das ubiquitäre Auftreten dieser leicht ionisierbaren Verbindungen ein schwer lösbares Problem dar (Mihailova *et al.* 2006; Hesse *et al.* 2008).

Es ist zu vermuten, dass PEG-Spuren aus den Inkubationspuffern stammen und sich über die zahlreichen Inkubationsschritte aufgrund von hydrophilen Wechselwirkungen auf dem Kieselgel anreichern (Derkaoui *et al.* 2007). Während der vollständigen Prozedur des DC-Overlay-Assays mit Mehrfachfärbung wurden Chemikalien höchster Reinheit verwendet, um Kontaminationen zu minimieren. Detergenzien, die wie das Polysorbat Tween PEG-Derivate darstellen und von denen eine starke Bindung an hydrophile Silikaoberflächen bekannt ist (Joshi & McGuire 2009), wurden deshalb nicht eingesetzt.

Mit der neu entwickelten Mehrfachfärbetechnik liegt die Nachweisgrenze der MS im Bereich von 20 bis 50 ng und zeigt dabei einen Trend zu höherer Sensitivität bei komplexeren Strukturen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Nakamura *et al.*, die UV-MALDI-MS von Overlay-Assay-gefärbten GSL durchführten (Nakamura *et al.* 2006).

Im Vergleich zu Techniken der LC-MS (*liquid chromatography*-MS engl. für Flüssigchromatographie gekoppelt mit MS) (Kirsch *et al.* 2009) lässt sich die DC-MS weniger einfach automatisieren. Dafür ermöglicht die DC-MS jedoch die parallele Untersuchung mehrerer Proben und ist zudem so robust, dass Lipid-Rohextrakte eingesetzt werden können, was eine aufwendige Probenvorbereitung unnötig macht. Der Hauptvorteil der DC-MS im Fall der GSL-Analytik ist jedoch die Möglichkeit, über die Verwendung GSL-spezifischer Sonden (Antikörper oder Lektine) Epitop-Strukturinformationen zu erhalten.

Die DC-Overlay-Assay-Mehrfachimmunfärbung wurde erfolgreich zur GSL-Expressionsanalyse in normalen und malignen Lebergeweben von HCC-Patienten eingesetzt. Dabei wurden LacCer, Gb3Cer und Gb4Cer in Lipidrohextrakten nachgewiesen (Kapitel 4.2). Die Mehrfachfärbetechnik wurde für die Analyse hoch komplexer Ganglioside aus Serum

angepasst. CD75s- und CD15s-Ganglioside wurden mit Hilfe von Antikörpern und iso-CD75s-Ganglioside mit einem GSL-bindenden Lektin nachgewiesen (Kapitel 4.4).

## **5.2 Neutrale GSL in HCC**

In HCC wurde die Expression von LacCer, Gb3Cer und Gb4Cer im Vergleich zu entsprechenden Normalgewebe analysiert. Dabei ist die Expression von LacCer und Gb3Cer von besonderem Interesse.

### **5.2.1.1 Assoziation mit maligner Transformation**

Für die LacCer-Synthase wurde gezeigt, dass sie an der Regulierung von phänotypischen Änderungen, wie Proliferation, Adhäsion, Migration und Angiogenese von Zellen, beteiligt ist (Kakugawa *et al.* 2002; Yeh *et al.* 2001; Iwamoto *et al.* 2001; Bhunia *et al.* 1998; Arai *et al.* 1998). Da die Deregulierung dieser Prozesse als Kennzeichen für Krankheiten wie z.B. Krebs gilt, wurden sowohl die LacCer-Synthase als auch LacCer als neue Zielstrukturen in der Krebsforschung vorgeschlagen (Chatterjee & Pandey 2008, Chatterjee *et al.* 2008).

Gb3Cer wurde bereits für verschiedene Malignome als Tumor-assoziierte Struktur, hauptsächlich für Karzinome, beschrieben (Farkas-Himsley *et al.* 1995; LaCasse *et al.* 1999; Johansson *et al.* 2009; Kovbasnjuk *et al.* 2005; Falguières *et al.* 2008; Distler *et al.* 2009). Die Expression von Gb3Cer scheint auch Einfluss auf wesentliche Eigenschaften des Tumors zu haben, da sie in Kolonkarzinomen mit einem invasiven Phänotyp (Kovbasnjuk *et al.* 2005) und Resistenz gegen Chemotherapeutika assoziiert wurde (Kiguchi *et al.* 2006). Aufgrund der häufigen Überexpression von Gb3Cer in Tumoren wird die Anwendung des zytotoxischen Stx diskutiert, das Gb3Cer als Rezeptor nutzt (Kapitel 1.2.7.2).

In normalem Lebergewebe wurde für LacCer, Gb3Cer und Gb4Cer eine ubiquitäre Expression festgestellt. Im Vergleich dazu konnte im HCC-Gewebe für alle drei Spezies eine Reduktion beobachtet werden.

Im Fall von LacCer wurde eine statistisch signifikante Abnahme gefunden (vgl. Abbildung 4.9), da 25 von 32 Patienten (78,1%) eine verringerte LacCer-Expression zeigten (Tabelle 8.2). Es kann vermutet werden, dass die geringe LacCer-Expression den Tumorzellen hilft der Apoptose zu entgehen. LacCer spielt in der TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose eine essenzielle Rolle, indem es im Zusammenwirken mit reaktiven Sauerstoffspezies die Apoptose einleitet

(Martin *et al.* 2006). Abnahme und Verlust der LacCer-Expression könnten also die Apoptoseresistenz der Tumorzellen widerspiegeln.

Die Gb3Cer-Expression zeigt ebenfalls eine hoch signifikante Abnahme (Abbildung 4.13), bei der eine Reduktion bei 68,8% der Patienten festgestellt wurde (Tabelle 8.3). Die vielfach in Karzinomen beobachtete Überexpression von Gb3Cer trifft somit für HCC nicht zu.

Gb4Cer weist zwar eine Tendenz zu einer verringerten Expression in HCC auf; im Gegensatz zu LacCer und Gb3Cer ist diese jedoch nicht signifikant (Abbildung 4.15A). Für Gb4Cer konnte in 37,5% der Patienten eine Überexpression und im Vergleich dazu in 50% eine Verminderung festgestellt werden (Tabelle 8.4).

Im Normalgewebe scheint die Expression der untersuchten GSL jeweils von der Verfügbarkeit der Vorläuferstruktur aus der Biosynthese abzuhängen. Es wurden jeweils Korrelationen zwischen LacCer und Gb3Cer sowie Gb3Cer und Gb4Cer festgestellt. Im Unterschied dazu konnte im Tumorgewebe nur zwischen Gb3Cer und Gb4Cer ein Zusammenhang nachgewiesen werden. Die fehlende Korrelation zwischen LacCer und Gb3Cer könnte darauf hindeuten, dass die Expression beider aufgrund unterschiedlicher Mechanismen herunterreguliert wird und im Tumor unabhängig voneinander ist. Die Korrelation von Gb3Cer und Gb4Cer steht in Diskrepanz zum starken Rückgang, der einerseits für Gb3Cer aber nicht für Gb4Cer gefunden wurde. Offenbar unterliegt die Gb3Cer-Expression in einem viel größeren Maß der Regulierung.

Bei der Expressionsanalyse der neutralen GSL wurde in allen drei Fällen eine Korrelation der Expressionsniveaus zwischen Normal- und Tumorgeweben nachgewiesen. Auch wenn bei LacCer und Gb3Cer ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geweben vorliegt, der auf eine Regulierung schließen lässt, scheinen die Patienten ein individuelles Grundniveau an GSL zu besitzen, das auch auf die Expression im Tumor Einfluss hat.

### **5.2.1.2 Assoziation mit pathologischen Parametern**

Es wurden Assoziationen zwischen der Expression der neutralen GSL und pathologischen Parametern festgestellt. Für LacCer und Gb4Cer wurde eine Korrelation mit pT, der Ausdehnung des Primärtumors, gezeigt. Beide weisen im frühen Stadien (pT1 und pT2) eine subnormale Expression auf, die mit zunehmender Größe und Ausdehnung des Tumors auf ein etwa normales Niveau steigt (vgl. Abbildung 4.10B und Abbildung 4.15B). Dieses gegensätzliche Verhalten der LacCer- und Gb4Cer-Expression in Abhängigkeit von pT beruht vermutlich auf mehreren Einflussfaktoren. Einerseits bewirkt die Entartung der Zellen eine Abnahme der GSL Expression, andererseits scheinen Faktoren, die mit fortschreitender

Krankheit und Tumorgröße einhergehen, die Expression wieder zu induzieren. Einer dieser Faktoren könnte z.B. die Hypoxie sein, die Einfluss auf Phänotyp der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Tumorgröße zeigt (Wu *et al.* 2007).

Diese These könnte durch Experimente überprüft werden, die die örtlichen Verteilung der LacCer- und Gb4Cer-Expression im Tumor abbilden. Das könnten immunhistochemische Verfahren sein, die jedoch in Lebergewebe aufgrund der hohen Autofluoreszenz nicht so einfach durchzuführen sind. Eine weitere Möglichkeit besteht darin mehrere Lipidextrakte von Gewebestücken aus inneren und äußeren Bereichen der Tumore miteinander zu vergleichen. Derartige Versuche waren in der vorliegenden Arbeit aufgrund der mangelnden Größe der zur Verfügung stehenden Gewebeproben nicht möglich und sollten deswegen Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Es muss zusätzlich erwähnt werden, dass für LacCer auch im Normalgewebe eine Korrelation mit pT gefunden wurde. Diese sollte eigentlich unabhängig von den Tumoreigenschaften sein. Das Vergleichsgewebe, das in diesen Experimenten verwendet wurde, ist den Patienten in einem Abstand von mindestens 5 cm zum Primärtumor entnommen worden. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Tumor über diese Distanz einen Effekt auf die LacCer Expression hatte, ist trotz der genannten Einschränkungen gering, zumal für keine anderen GSL (neutrale GSL und Ganglioside) eine ähnliche Abhängigkeit von pT gefunden wurde. Für die vorliegende Korrelation wurde eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $p = 0,017$  bei der Gültigkeit von  $H_0$  ( $H_0$  = es besteht keine Korrelation, siehe Kapitel 3.8) berechnet. Dieser Wert entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass bei den vorliegenden Ergebnissen keine Korrelation vorliegt.

Für die LacCer-Expression in HCC wurde zusätzlich eine signifikante Korrelation mit dem Differenzierungsgrad G gefunden (Abbildung 4.10A). Analog zur Assoziation mit pT sinkt der LacCer-Gehalt mit neoplastischer Transformation, steigt jedoch bei schlechterer Differenzierung G wieder an.

### **5.2.1.3 Fazit**

Aufgrund der allgemeinen Tendenz zur reduzierten Expression in Tumoren sind die untersuchten neutralen GSL nicht als Rezeptorstrukturen für Krebstherapeutika geeignet. Insbesondere die Anwendung von Stx wäre aufgrund der starken Abnahme von Gb3Cer nicht empfehlenswert.

Die beobachteten Expressionsunterschiede könnten dennoch einen diagnostischen Nutzen haben, zumal sie scheinbar Krebs-spezifisch sind. So konnte weder im HCC-Gewebe noch im

benachbarten Vergleichsgewebe ein Einfluss des Zirrhosezustands der Patienten auf die Expression der untersuchten GSL gezeigt werden. Eine niedrige LacCer-Expression könnte evtl. als Indiz für eine gute bis moderate Differenzierung sein. Zusammen mit der Tendenz von LacCer, besonders in kleinen Tumoren gering exprimiert zu werden, könnte die fehlende LacCer-Expression ein Marker für HCC im Frühstadium sein.

### 5.3 Gangliosidexpression in HCC

#### 5.3.1.1 Expression von CD75s-Gangliosiden

CD75s-Strukturen wurden bereits in den 1980er Jahren als Tumor-assoziierte Strukturen beschrieben, weil neu entwickelte monoklonale Anti-CD75s-Antikörper in der Immunhistochemie bevorzugt Tumorgewebe anfärbten (Hakomori *et al.* 1983). Da das Auftreten von CD75s-Gangliosiden bevorzugt in Tumoren und im Mekonium von Neugeborenen aber nur in wenigen Normalgeweben gefunden wurde, wurde es als onkofötaler Marker vorgeschlagen (Hakomori *et al.* 1983). Dabei scheint die hohe CD75s-Expression spezifisch für Karzinome zu sein. Nilsson *et al.* konnten hohe CD75s-Gangliosid-Konzentrationen ausschließlich in einer Reihe von Karzinomen, nicht jedoch in Tumoren nicht-epithelialen Ursprungs nachweisen (Nilsson *et al.* 1985).

In Anbetracht ihrer Funktion als Rezeptorstruktur für Viscumin, einem potenziellen Therapeutikum für die Krebstherapie (siehe Kapitel 1.2.7.1), ist die Expression von CD75s-Gangliosiden von besonderem Interesse. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit die CD75s-Gangliosid-Expression in HCC untersucht und mit der in benachbartem, normalem Lebergewebe verglichen. Das untersuchte Patientenkollektiv hatte eine statistisch repräsentative Stichprobengröße von  $N = 29$ .

Bei der Expressionsanalyse wurden in Übereinstimmung mit vorherigen Berichten  $\alpha 2,6$ -sialylierte Ganglioside vorwiegend mit nLc4Cer-Grundstrukturen nachgewiesen (Hakomori *et al.* 1983; Nilsson 1985; Taki *et al.* 1990) (Abbildung 4.17 und Abbildung 4.19). In 24 von 29 Patienten wurde CD75s-I im Normalgewebe detektiert und scheint deswegen in der Leber ubiquitär exprimiert zu werden (Abbildung 4.18). Dieser Befund stimmt mit Beobachtungen von Hakomori *et al.* und Nilsson *et al.* überein, die im Vergleich zu anderen gesunden Geweben in der Leber eine relativ hohe Expression feststellten (Hakomori *et al.* 1983; Nilsson *et al.* 1985).

Die Analyse der CD75s-Gangliosidexpression in HCC ergab für 35% der Patienten eine Überexpression, allerdings auch für 45% eine verringerte Expression (Tabelle 8.5). Es konnte insgesamt kein Unterschied im mittleren Expressionsniveau zwischen den beiden Gewebetypen festgestellt werden. Die auffällig größere Varianz der Verteilung der CD75s-I-Konzentrationen in HCC-Gewebe lässt jedoch möglicherweise auf eine ungerichtete Deregulierung schließen (vgl. Abbildung 4.18).



Das unveränderte Expressionsniveau steht im Widerspruch zu Arbeiten anderer Gruppen, die in HCC eine starke Überexpression von CD75s-Strukturen auf Gangliosiden und Glykoproteinen fanden. Dazu gehört unter anderem eine Arbeit von Hakomori, wobei aber die Daten anhand einer einzigen untersuchten HCC-Gewebeprobe nicht repräsentativ sind (Hakomori *et al.* 1983). In einer weiteren Studie wurde der Anteil von CD75s-I vom Gesamtgangliosidgehalt bei 9 HCC-Proben (N = 9) und 3 Lebergewebeproben Krebs-freier Patienten analysiert. In HCC betrug der Anteil zwischen 13 bis 31%, im Normalgewebe hingegen stets weniger als 1% (Taki *et al.* 1990). Müthing *et al.* beschrieben eine CD75s-Gangliosid-Überexpression in zwei von drei HCC Patienten (Müthing *et al.* 2005). Über immunhistochemische Verfahren wiesen Tanno *et al.* eine starke Expression von CD75s-Glykokonjugaten in allen (7/7) HCC und nur eine geringe in zirrhotischer bzw. keine in gesunder Leber nach. Die Expression im Gewebe konnte nach GSL-Analysen mit der von CD75s-Gangliosiden in Zusammenhang gebracht werden (Tanno *et al.* 1993).

Cao *et al.* wiesen CD75s ausschließlich in HCC-Gewebe nach und nicht in gesundem oder zirrhotischem Lebergewebe (Cao *et al.* 1999). Im Gegensatz zu den vorherigen Arbeiten lassen sich die Ergebnisse dieser Studie dennoch mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichen. Bei Cao *et al.* war die CD75s-Nachweisgrenze der HCC scheinbar über dem Niveau der Normalexpression, wodurch keine Reduktion der CD75s-Expression festgestellt werden konnte. Vor allem bedeutet es jedoch, dass nur Färbungen von Ausreißern über das Normalniveau erzielt wurden. Der Anteil der CD75s-positiven Patienten beträgt bei Cao *et al.* 26% (9/42) für moderat und 25% (1/4) für schlecht differenzierte HCC. Dies ist vergleichbar mit dem Anteil der Tumorproben, die in dieser Arbeit eine stärkere CD75s-Expression als die maximale des Normalgewebes aufweisen, und hier bei 21% (6/29) liegt.

Eine weitere Arbeit, in der die CD75s-Strukturen in HCC untersucht wurden, wurde von Dall'Olio *et al.* veröffentlicht. Hier wurde trotz einer insgesamt erhöhten CD75s-Expression in HCC bei einigen Patienten ein starker Rückgang der Expression festgestellt (Dall'Olio *et al.* 2004). Dies unterstützt die These, dass die CD75s-Expression in HCC divergierend reguliert sein kann.

Von Cao *et al.* wurden Ergebnisse erzielt, die auf einen diagnostischen Wert von CD75s hinweisen. Dabei wurde CD75s nur in moderat bis schlecht differenzierten, nicht jedoch in gut differenzierten HCC nachgewiesen (Cao *et al.* 1999), was eine mögliche Eignung von CD75s als Differenzierungsmarker andeutet. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit zumindest für Gangliosid-gebundene CD75s-Strukturen nicht bestätigt werden. Es konnte kein geringeres CD75s-I-Expressionsniveau in gut differenzierten als in schlecht

differenzierten Tumoren festgestellt werden; ebenso lag keine Korrelation zwischen CD75s-I und dem Differenzierungsgrad vor (Kapitel 4.2.4). Ein Zusammenhang zwischen CD75s-I und der Ausdehnung des Primärtumors konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

### **5.3.1.2 Expression von iso-CD75s-Gangliosiden**

Zusätzlich zu CD75s wurde auch die Expression der isomeren Struktur iso-CD75s untersucht (Kapitel 4.2.5). Dabei wurden viele Analogien zu der CD75s-Expression festgestellt. Iso-CD75s konnte ebenfalls hauptsächlich in Form von iso-CD75s-I mit einer nLc4Cer-Grundstruktur nachgewiesen werden (Abbildung 4.20 und Abbildung 4.22). Es zeigte sich, dass iso-CD75s-I ubiquitär in normalem und malignem Lebergewebe exprimiert wird (Abbildung 4.21A). Das Expressionsniveau zeigt keine signifikante Veränderung im Zuge einer neoplastischen Transformation. Ähnlich wie zuvor bei CD75s, jedoch weniger stark ausgeprägt, kann bei der Verteilung des iso-CD75s-Gehaltes in HCC eine Zunahme der Varianz festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass die iso-CD75s-I-Expression ebenfalls einer ungerichteten Regulierung unterliegt.

Ein weiterer Hinweis auf die veränderte Regulierung der beiden Ganglioside CD75s-I und iso-CD75s-I im Verlauf der malignen Transformation ist die Tatsache, dass weder für die CD75s-I- noch für die iso-CD75s-I-Expression eine signifikante Korrelation zwischen Tumor- und Vergleichsgewebe gefunden werden konnte. Dabei scheint die Expression der beiden Gangliosidstrukturen eng miteinander verbunden zu sein. Es wurden hoch signifikante Zusammenhänge zwischen der CD75s-I- und iso-CD75s-I-Expression jeweils in Normal- und Tumorgewebe festgestellt. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Expression beider Strukturen von einem gemeinsamen Faktor abhängt. Bei diesem könnte es sich um die gemeinsame Vorstufe nLc4Cer handeln. Die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen der nLc4Cer-Expression und der von CD75s-I und iso-CD75s-I wäre eine Aufgabe zukünftiger Studien.

Ein wesentlicher Unterschied wurde im Verhalten der CD75s- und iso-CD75s-Expression festgestellt. Im Gegensatz zu CD75s-I zeigt iso-CD75s-I eine Expressionszunahme im Zusammenhang mit ausbleibender Differenzierung (Abbildung 4.21B). Eine vergleichbare Assoziation wurde für iso-CD75s-I bereits in Magenkarzinomen beschrieben (Suzuki *et al.* 1991). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass an der Regulierung von iso-CD75s-I ein weiterer Faktor beteiligt ist, der zwar abhängig von der schlechten Differenzierung des Tumors aber unabhängig von der Krebsart ist.

### 5.3.1.3 Sialyltransferase-Expression

Im Zusammenhang mit der Gangliosid-Expression wurde auch die Genexpression der Sialyltransferasen analysiert, die die finalen Schritte bei der Biosynthese der beiden Isomere katalysieren (Kapitel 4.3).

Die CD75s-Biosynthese erfolgt durch die  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase ST6GAL1, die sowohl Glykoproteine als auch GSL als Substrate akzeptiert. Eine weitere Form einer  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase, die ST6GAL2, wurde inzwischen ebenfalls beschrieben. Diese scheint jedoch hauptsächlich freie Oligosaccharide als Substrate zu nutzen (Takashima *et al.* 2002; Krzewinski-Recchi *et al.* 2003).

Die Expression der ST6GAL1 ist offenbar eng mit der malignen Transformation von Zellen verknüpft, da sie eine der am häufigsten hochregulierten Glykosyltransferasen in humanen Tumoren darstellt (Dall'Olio 2000). Für die gesunde Leber wurde bereits eine im Vergleich zu anderen gesunden Geweben starke ST6GAL1-Genexpression beschrieben (Paulson *et al.* 1989; Kitagawa & Paulson 1994; Kaneko *et al.* 1995).

Beim Vergleich der ST6GAL1-Genexpression in HCC konnte jedoch keine signifikante Veränderung zwischen malignem und normalem Lebergewebe festgestellt werden (Abbildung 4.23). Ebenso konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Genexpression der Sialyltransferase ST6GAL1 und ihrem Produkt auf metabolischer Ebene, CD75s-I, gefunden werden.

Dies deckt sich mit Arbeiten von Dall'Olio *et al.*, die in HCC ebenfalls keine Änderung im Expressionsniveau, dafür aber eine ungerichtete Regulierung der ST6GAL1-Genexpression und zusätzlich auch der Enzymaktivität beobachteten (Dall'Olio *et al.* 2004). Dabei konnte weder zwischen der Genexpression und der Sialyltransferase-Aktivität noch zwischen der Gesamtmenge an CD75s-Strukturen und der Sialyltransferase-Aktivität eine Korrelation gefunden werden.

Das Fehlen direkter Zusammenhänge könnte ein Hinweis auf eine komplexe Regulierung der CD75s-Synthese auf mehreren Ebenen sein. Im Kontext der starken Korrelation der CD75s-I-Expression mit der von iso-CD75s-I und der fehlenden Korrelation mit der ST6GAL1-Genexpression ist es eher unwahrscheinlich, dass die CD75s-I-Expression allein durch den finalen Sialylierungsschritt bestimmt wird. Ein viel größerer Einflussfaktor ist vermutlich, wie bereits zuvor angedeutet, die Verfügbarkeit der Vorstufe nLc4Cer.

Die ST3GAL6 vermittelt den finalen Schritt in der Biosynthese von iso-CD75s-Gangliosiden (Okajima *et al.* 1999). Bei der Untersuchung der ST3GAL6-Expression konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Genexpression im Mittel um den Faktor 2

nachgewiesen werden (Abbildung 4.23). Eine Reduktion der ST3GAL6-Expression wurde ebenfalls in Magenkarzinomen beobachtet und wurde auf epigenetische Faktoren, d.h. die Hypermethylierung des entsprechenden Genabschnittes, zurückgeführt (Kawamura *et al.* 2008). In HCC scheint diese Reduktion jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die ST3GAL6-Expression in keinem Zusammenhang mit der Expression des entsprechenden Syntheseprodukts iso-CD75s steht. Analog zur CD75s-Expression sind hier mutmaßlich andere Faktoren von größerer Bedeutung.

#### **5.3.1.4 Fazit**

In Anbetracht der fehlenden Überexpression von CD75s-I- und iso-CD75s-I-Ganglioside ist es fraglich, ob diese Strukturen im Fall von HCC als Tumor-assoziiert bezeichnet werden können. Andererseits konnte für iso-CD75s-I eine Korrelation mit dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen festgestellt werden, was auf eine Verbindung mit der Erkrankung hinweist. Ebenso wurde eine ungerichtete Deregulierung vor allem der CD75s-I-Expression beobachtet, die mit der malignen Transformation einhergeht. Beide Strukturen weisen demnach auf den in Tumorzellen veränderten Gangliosid-Metabolismus hin, ohne jedoch im klassischen Sinne Tumor-assoziiert zu sein.

Bei HCC erscheint deswegen eine gegen CD75s als Zielstruktur gerichtete Krebstherapie nur begrenzt anwendbar. Viscumin wäre möglicherweise für den Teil der Patienten heilsam, der eine starke CD75s-Überexpression zeigt. Eine Viscumin-Therapie müsste dabei im Rahmen einer individualisierten Behandlung erfolgen, bei der zuvor die Eignung eines jeden Patienten anhand einer CD75s-Expressionsanalyse festgestellt werden muss. Diese Expressionsanalyse müsste in die Routinediagnostik nach einer Biopsienahme eingebunden werden.

Um die Eignung einer Viscumin-Therapie genauer zu erforschen, wäre es sinnvoll, die Verteilung der CD75s-Ganglioside im gesunden und malignen Lebergewebe zu bestimmen. Die beobachtete Zunahme der CD75s-I-Varianz könnte auch ein Hinweis auf eine extrem heterogene Verteilung innerhalb der Tumore sein. Sollte sich dies bestätigen, könnten neue Einblicke in die Hintergründe der Gangliosid-Regulierung und eventuell auch neue Anwendungsfelder für die Viscumin-Behandlung erhalten werden.

Für derartige Untersuchungen wird meist die Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dieses Verfahren birgt jedoch einige Herausforderungen. Lebergewebe weist eine starke Autofluoreszenz auf (Neumann & Gabel 2002; Viegas *et al.* 2007), so dass eventuell alternative, colorimetrische Färbungen eingesetzt werden müssen. Zudem konnte gezeigt

werden, dass bei der Immunhistochemie von Gangliosiden spezielle technische Protokolle verwendet werden müssen, um eine Umverteilung der Ganglioside innerhalb eines Gewebes zu vermeiden (Heffer-Lauc *et al.* 2005; Lauc & Heffer-Lauc 2006; Heffer-Lauc *et al.* 2007). Als Alternativen wären in Zukunft eventuell auch bildgebende MS-Verfahren möglich, mit denen sehr spezifisch die Verteilung einzelner Gangliosidspezies bestimmt werden könnte (Sugiura *et al.* 2008; Chan *et al.* 2009). Eine Unterscheidung von isomeren Strukturen könnte dabei über spezifische Übergänge im MS/MS-Modus erreicht werden, die im Fall von CD75s-I-Gangliosiden von Meisen *et al.* beschrieben wurden (Meisen *et al.* 2003). Diese Methode hätte gegenüber der immunologischen Färbung zudem den Vorteil, dass zuverlässig zwischen Glykoproteinen und GSL unterschieden werden kann, die beide CD75s-Strukturen aufweisen können.

## 5.4 Serum-GSL

### 5.4.1 Extraktion und Charakterisierung von GSL aus humanem Serum

Humanes Serum ist eine komplexe Mischung verschiedener Substanzklassen, in der GSL nur einen sehr kleinen Anteil darstellen. Es besteht zu ca. 90% aus Wasser, zu etwa 8% aus Proteinen und enthält zudem Salze, Lipide und eine große Zahl weiterer Metabolite. Die Gesamtproteinkonzentration liegt im Bereich von 67 bis 87 g/l, wohingegen die der Lipide bei 6 bis 10 g/l beträgt (Buchta *et al.* 2006; Mutschler 1986). Serumlipide setzen sich zusammen aus neutralen Lipiden und Phospholipiden, die sich beide in millimolaren Konzentrationen wiederfinden und wie folgt aufteilen: Cholesterin und Cholesterin-Ester (gesamt 2,6–6,5 mmol/l), Triacylglyceride (0,05–2,3 mmol/l), PC (1,8 mmol/l), SM (0,5 mmol/l), LPC (0,2 mmol/l), PE (0,1 mmol/l) und PI (0,06 mmol/l) (Hinwood 1992; Subbaiah 2000). Dagegen wurde für Serum-GSL eine wesentlich geringere Gesamtkonzentration im mikromolaren Bereich von nur etwa 42  $\mu\text{mol/l}$  bestimmt (Simpson *et al.* 2004). Auch die Konzentration der Lipid-gebundenen Sialinsäure, die ein Maß für den Gangliosid-Gehalt darstellt, beträgt dabei nur etwa 10  $\mu\text{mol/l}$  (Negroni *et al.* 1996; Senn *et al.* 1989, 1990).

Es ist dementsprechend schwierig, GSL mit wenigen Schritten aus Serum zu isolieren und in einer Reinheit aufzuarbeiten, so dass sowohl MS- als auch DC-Analysen zuverlässig durchgeführt werden können. Vor allem die Phospholipide können durch ihr häufiges Auftreten und hohe Ionisationseffizienz zu einem massiven Sensitivitätsverlust bei der Massenspektrometrie führen (Shen *et al.* 2005; Johanson *et al.* 2007).

#### 5.4.1.1 Entwicklung einer Extraktionsmethode für Serum-GSL

Zu den Standardmethoden der GSL-Extraktion gehört die Zweiphasen-Extraktion. Die am weitesten verbreiteten Verfahren folgen den Protokollen von Folch und Bligh & Dyer (Folch *et al.* 1957; Bligh & Dyer 1959). Diese Verfahren haben mehrere Vorteile. Zum einen werden Proteine durch Einsatz organischer Lösungsmittel präzipitiert und finden sich in der Zwischenphase wieder. Zum anderen sind Lipide, die aus der organischen Phase gewonnen werden, weitgehend entsalzt. Ein wesentlicher Nachteil besteht jedoch darin, dass GSL spezifische Verteilungsgleichgewichte zwischen den beiden Phasen ausbilden. Diese

Gleichgewichte sind abhängig von den GSL-Strukturen, so dass einzelne Spezies während der Zweiphasen-Extraktion an- und abgereichert werden können.

Dieses wird bei dem in dieser Arbeit entwickelten Einphasen-Extraktionssystem umgangen. Mit einer Mischung aus Chloroform, Methanol und Wasser konnten die Gesamtlipide aus lyophilisiertem Serum extrahiert werden (Kapitel 3.3.3), was durch DC-Analysen bestätigt werden konnte. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass bei diesem Schritt zugleich Proteine und ein Teil der Salze präzipitiert und entfernt wurden.

Die Mehrheit der koextrahierten neutralen Lipide und Phospholipide stellen Esterlipide dar. Diese wurden häufig mittels milder alkalischer Hydrolyse in Alkohole und Fettsäuren zerlegt, die in den folgenden Schritten leichter von den alkaliresistenten GSL zu trennen sind. Allerdings können GSL ebenfalls alkalilabile Modifikationen aufweisen. Vor allem die Eliminierung von *O*-Acetylgruppe beinhaltet bei einer solchen Reinigungsstrategie einen entscheidenden Informationsverlust, da sich das Ausmaß an *O*-Acetylierungen im Zuge von Krebserkrankungen ändern kann (Manzi *et al.* 1990; Marquina *et al.* 1996).

Der PLC-Verdau zur GSL-Reinigung wurde bereits zuvor beschrieben (Sonnenburg *et al.* 2002; Nimrichter *et al.* 2008). In dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieser Methode gezielt Phospholipide in Phosphat-Salze und Diacylglyceride (im Fall von Lyso-Formen in Monoacylglyceride) zerlegt, ohne potenziell vorhandene alkalilabile GSL-Modifikationen zu zerstören. Die eingesetzte Phospholipase verdaut ein breites Spektrum an Phospholipiden, darunter auch Sphingomyelin, das Ceramid als Lipidteil besitzt, und daher relativ alkaliresistent ist. Demnach müssen für Sphingomyelin nicht, wie zuvor nach der Verseifung, weitere aufwändige Reinigungsschritte, die häufig eine Derivatisierung und Säulenchromatographie von GSL beinhalteten, durchgeführt werden (Saito & Hakomori 1971; Nilsson & Svennerholm 1982).

Gegenüber anderen Arbeiten (Sonnenburg *et al.* 2002; Nimrichter *et al.* 2008) wurde der PLC-Verdau in der vorliegenden Arbeit sehr effizient in den Arbeitsablauf integriert, indem durch die Umkehrphasen-SPE direkt nach dem Verdau ein großer Teil der Matrixsubstanzen von den GSL getrennt wird (vgl. Abbildung 4.24). Dazu zählen die durch den Phospholipid-Verdau freigesetzten Ceramide, Mono- und Diacylglyceride sowie die noch vorhandenen Triacylglyceride, Cholesterin-Ester, freies Cholesterin und die beim Verdau zugesetzten Salze. Auf diese Art konnten in wenigen Schritten die Hauptmatrixsubstanzen, nämlich Proteine, Salze, neutrale Lipide und Phospholipide, abgereichert werden.

Für die GSL-Analyse mittels nanoESI-QTOF-MS erwies es sich jedoch als vorteilhaft, die GSL-Fraktion nach der Umkehrphasen-SPE noch einer Fraktionierung über eine Silika-Säule

zu unterziehen. Dadurch wurde die Zahl der MS-detektierten GSL-Spezies stark erhöht. GSL liegen im Serum in sehr unterschiedlichen Mengenverhältnissen vor, so dass es evtl. auch innerhalb der GSL zu Unterdrückungseffekten bei der Ionisierung kommen kann. Durch die Fraktionierung wurde die Anzahl der GSL pro untersuchter Probe verringert und seltenere Spezies konnten ebenfalls nachgewiesen werden.

#### **5.4.1.2 neutrale Serum-GSL**

Im Positivionenmodus wurden Mono-, Di-, Tri- und Tetraosylceramide detektiert (Abbildung 8.1; Tabelle 8.7). Die aufgenommenen MS- und MS/MS-Daten decken sich mit den Beschreibungen anderer Gruppen, die GlcCer, LacCer, Gb3Cer, Gb4Cer und geringe Mengen nLc4Cer in humanem Serum charakterisiert haben (Vance & Sweeley 1967; Kundu *et al.* 1985; Simpson *et al.* 2004). Zusätzlich wurden bei diesen Messungen seltene Ionen neutraler fukosylierter GSL-Spezies detektiert (Tabelle 8.7), die wahrscheinlich Blutgruppenantigene (z.B. H und/oder Lewis) aufweisen (Kundu *et al.* 1985; Hanfland 1978). Eine genaue Strukturaufklärung dieser seltenen Spezies wurde bis jetzt nicht durchgeführt.

#### **5.4.1.3 Serumganglioside**

Das bisher in der Literatur beschriebene Spektrum der Serumganglioside umfasst im Wesentlichen Strukturen der Ganglio-Serie: GM3, GM2, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, wobei GM3 die dominierende Spezies darstellt (Lo *et al.* 1980; Kundu *et al.* 1985; Senn *et al.* 1989; Wing *et al.* 2001; Simpson *et al.* 2004). Mit Ausnahme der tetrasialylierten Spezies wurden in dieser Arbeit bei den MS-Analysen übereinstimmende Ergebnisse erzielt (Abbildung 4.25; Tabelle 8.8). Das Fehlen tetrasialylierter Ganglioside ist evtl. durch deren Fragmentierung aufgrund von „zu harten“ Bedingungen bei der Ionisierung (*in source decay*) oder wahrscheinlicher durch niedriges Vorkommen zu erklären.

Kundu *et al.* beschrieben zusätzlich das Auftreten von  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-sialylierten Gangliosiden mit nLc4Cer und nLc6Cer-Grundstrukturen sowie die eines seltenen, komplexen,  $\alpha$ 2,3-sialylierten Gangliosids, das tentativ einer verzweigten “iso-nLc8Cer”-Struktur des I-Typs zugewiesen wurde (Kundu *et al.* 1985). NanoESI-QTOF-Massenspektren der vorliegenden Arbeit bestätigen die Anwesenheit von Gangliosiden der Ganglio- und Neolakto-Serie. Darüber hinaus wurde jedoch eine Serie weitaus komplexerer Spezies detektiert, die auf monosialylierte Ganglioside der Neolakto-Serie mit bis zu Dodecaosylceramid-Grundstrukturen und bis zu drei Fukosen pro Gangliosid hinweisen



(Abbildung 4.25; Tabelle 8.8). Diese Spezies wurden bisher noch nicht für Serum beschrieben.

#### **5.4.1.4 Mehrfachfärbung hoch komplexer Serumganglioside**

In Anbetracht der Überexpression von Typ 2-Gangliosiden in vielen Karzinomen des Gastrointestinaltrakts stellen diese komplexen Ganglioside potenzielle Tumor-assoziierte Strukturen dar. Von besonderem Interesse sind dabei CD75s- und CD15s-Ganglioside.

Die Überexpression von  $\alpha$ 2,6-sialylierten CD75s-Gangliosiden ist sowohl für Magen- als auch Pankreaskarzinome bekannt. Nilsson *et al.* fanden in 6/6 Magenkarzinomen und in 4/7 Pankreasadenokarzinomen eine mindestens zweifache Zunahme gegenüber dem Normalgewebe (Nilsson *et al.* 1985). Distler *et al.* berichteten von einer CD75s-I-Überexpression in 16/38 Patienten, wobei nur in einem Fall eine Reduktion beobachtet wurde.

Serumkonzentrationen von CD15s sind in Krebspatienten häufig erhöht (Matsuura *et al.* 1997; Kannagi *et al.* 2004) und stehen außerdem im Zusammenhang mit der Prognose und dem Metastasierungszustand der Patienten (Matsuura *et al.* 1997; Nakagoe *et al.* 2002; Paganuzzi *et al.* 2003). Erhöhte CD15s-Konzentrationen wurden vor allem mit Tumoren des Gastrointestinaltrakts in Zusammenhang gebracht (Kannagi *et al.* 2004).

Die hoch polaren Gangliosidspezies wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der DC-Overlay-Assay-Mehrfachfärbung gegen CD75s und CD15s genauer charakterisiert. In einer dritten Färbung wurden iso-CD75s-Ganglioside detektiert, um eine möglichst vollständige Abdeckung der komplexen, monosialylierten Serumganglioside zu erhalten (Abbildung 4.26). Dabei wurde für Serumganglioside ein hohes Maß an Komplexität und Strukturvielfalt festgestellt, das über direktes MS-Screening allein nicht zu erfassen war. Mit der Entwicklung der Kombinationstechnik aus DC, Overlay-Assay-Mehrfachfärbung und direkter IR-MALDI-MS konnte ein Großteil dieser Komplexität aufgelöst werden.

#### **5.4.1.5 Strukturelle Charakterisierung Overlay-Assay-detektierter Serumganglioside**

Bei der strukturellen Zuordnung der Overlay-Assay-Signale wurde die DC-MS-Methode im Abtastmodus eingesetzt, da durch die DC alleine keine vollständige Trennung der Serumganglioside in Einzelsubstanzen erzielt werden konnte und somit in den Spektren gefärbter Banden teilweise mehrere Signale auftraten, die unterschiedliche Gangliosidstrukturen widerspiegeln (Abbildung 4.27). Durch die Bestimmung des örtlichen Verlaufs ihrer Ionensignale (Ionenchromatogramme) ist es bei der DC-MS im Abtast-Modus

möglich, einzelne MS-Signale den Overlay-Assay-gefärbten Banden zuzuweisen (Abbildung 4.28; Tabelle 4.3). Obwohl keine vollständige Trennung vorliegt, zeigen die einzelnen Ganglioside doch unterschiedliche Laufhöhen und können über die Korrelation ihrer Ionenchromatogramme mit dem Chromatogramm des Overlay-Assays zugeordnet werden.

Die Signale aus den (-)nanoESI-QTOF-Massenspektren, denen Typ 2-Strukturen zugeordnet wurden, zeigen eine vollständige Abdeckung durch die Overlay-Assay-Färbung (vgl. Abbildung 4.25 und Abbildung 4.28). Dies bestätigt die These, dass im Serum neben Gangliosiden der Ganglio-Serie hauptsächlich solche der Neolakto-Serie auftreten.

Hinsichtlich ihrer terminalen Sialylierung konnten isomere Ganglioside unterschieden und identifiziert werden. Terminal  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-sialylierte Ganglioside, wie iso-CD75s-1 und CD75s-1 bzw. IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer und IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (Abbildung 4.28), wurden sowohl chromatographisch getrennt als auch über die Overlay-Assay-Färbung eindeutig charakterisiert.

In Bezug auf die Fukosylierung konnte die vollständige Komplexität noch nicht aufgeklärt werden. Beim Overlay-Assay wurden ausschließlich Sonden gegen terminale Strukturen verwendet, so dass zwar die An- und Abwesenheit einer Fukose in der terminalen LacNAc-Einheit nachgewiesen wurde; über die genaue Position interner Fukosylierungen wurden jedoch keine Informationen erzielt. Dies bedeutet auch, dass z.B. das Gangliosid-Signal für iso-CD75s-8, dem die allgemeine Struktur X<sup>3</sup>Neu5Ac-Fuc-nLc10Cer (d18:1, C16:0) zugeordnet wurde, aus mehreren isomeren Gangliosiden zusammengesetzt sein kann, die sich in der Position der Fukose bezüglich der internen LacNAc-Einheiten unterscheiden. Dabei sind z.B. VIM-2-Strukturen (Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 3Gal $\beta$ 4[Fuc $\alpha$ 3]GlcNAc-) denkbar.

Potenziell können diese Isomere, ähnlich wie bei CD75s und iso-CD75s, chromatographisch getrennt werden, was hier auch bereits ansatzweise erfolgt ist. CD15s-Ganglioside zeigen z.B. geringere Mobilitäten als ihre intern fukosylierten Isomere; jedoch wurde mit dem eingesetzten System bisher keine vollständige Trennung erreicht. Dies kann eventuell durch die Technik der Mehrfachchromatographie von DC-Platten erreicht werden.

Im Fall der Fukose-Isomere zeigen sich die Stärken des Overlay-Assays, der es im Gegensatz zur alleinigen DC und MALDI-Massenspektrometrie erlaubt, diese Strukturen zu unterscheiden und charakterisieren. Eine weitere Auflösung der Komplexität fukosylierter Ganglioside kann auch durch einen weiterentwickelten Mehrfach-Overlay-Assays erzielt werden, bei dem Antikörper gegen z.B. VIM-2-, Difukosyl-Sialyl-Lewis-x- und intern fukosylierte Determinanten zum Einsatz kommen.

### 5.4.2 Serumganglioside von Krebs-Patienten

Es wurden sowohl direkte MS-Analysen der GSL-Fractionen als auch Gangliosid-Expressionsanalysen mit Hilfe des Mehrfach-Overlay-Assays von Serumproben aus Krebspatienten durchgeführt. Allerdings konnten mit keiner der beiden Techniken zusätzliche GSL- nachgewiesen werden, die auf eine Tumor-Assoziation schließen lassen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden allein in den Serumkonzentrationen einzelner Ganglioside entdeckt.

#### 5.4.2.1 Assoziation mit maligner Transformation

Im Vergleich zur Krebs-freien Kontrollgruppe zeigt die Gruppe der Pankreasadenokarzinom-Patienten eine signifikant erhöhte Konzentration von iso-CD75s-5 (VIII<sup>3</sup>Neu5Ac-Fuc-nLc8Cer) (Abbildung 4.29). Die Differenz zwischen den beiden Gruppen ist zwar statistisch signifikant, jedoch aufgrund der hohen Varianz innerhalb der Gruppen nicht groß genug, um sie in der Diagnose zur Diskriminierung von gesunden Probanden und Krebspatienten einsetzen zu können. Die Gründe des Anstiegs gerade dieses Gangliosids bleiben unklar.

Magenkarzinom-Patienten zeigen im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringerte Serumkonzentrationen von iso-CD75s-1 (IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer) und CD15s-9 (X<sup>3</sup>Neu5Ac-IX<sup>3</sup>Fuc-Fuc-nLc10Cer) (Abbildung 4.32). Die Populationen der Krebs- und Kontrollgruppe sind in diesen Fällen ebenfalls nicht hinreichend getrennt, um eine zuverlässige Diagnose zu erzielen. Die iso-CD75s-1-Abnahme steht dabei auch im Widerspruch zu Beobachtungen von Suzuki *et al.*, die eine Zunahme der iso-CD75s-1-Expression in Magenkarzinomen feststellten und zusätzlich auch eine Verbindung mit schlechter Differenzierung zeigen konnten (Suzuki *et al.* 1991).

#### 5.4.2.2 Assoziation mit pathologischen Parametern

Im Zusammenhang mit der Ausdehnung des Primärtumors pT zeigen Magen- und Pankreaskarzinome einen gleichgerichteten Effekt. Beide Gruppen zeigten eine Abnahme hochpolarer Serumganglioside mit nLc8Cer bis nLc12Cer-Grundstrukturen im Zuge der fortschreitenden Krebserkrankung. In der Pankreasadenokarzinom-Gruppe wiesen iso-CD75s-5, -9, -10 und -11 sowie CD15s-10, -11 und -12 signifikante Korrelationen auf (Abbildung 4.30 und Abbildung 4.33). Bei der Magenkarzinom-Gruppe wurde dies ebenfalls für CD15s-

12 festgestellt, wobei weitere hochpolare Ganglioside einen analogen aber nicht statistisch signifikanten Trend aufwiesen.

Im Zusammenhang mit der lymphogenen Streuung wurde für beide Malignome ein umgekehrter Trend festgestellt. Sowohl in der Gruppe der Magenkrebs- als auch der der Pankreaskrebs-Patienten wurde eine Zunahme von Gangliosidkonzentrationen mit dem pN-Status, der Anwesenheit bzw. auch der zunehmenden Anzahl der regionalen Lymphknotenmetastasen gefunden. Mit Ausnahme von CD15s-10 konnte dieser Zusammenhang bei iso-CD75s-Gangliosiden auf Basis von nLc4Cer und nLc8Cer, iso-CD75s-1, -3 und -5 bei Magenkarzinomen und bei iso-CD75s-4 bei Pankreasadenokarzinomen bestätigt werden (Abbildung 4.31 und Abbildung 4.34).

Alle statistisch signifikanten Unterschiede in den Seren der Krebspatienten wurden auf  $\alpha$ 2,3-sialylierte Ganglioside zurückgeführt. Für Magenkarzinome als auch Pankreasadenokarzinome ist jedoch die Überexpression von  $\alpha$ 2,6-sialylierten CD75s-Gangliosiden in Tumorgewebe bekannt (Nilsson *et al.* 1985; Distler *et al.* 2008b). Dennoch konnte keine Zunahme der CD75s-Ganglioside im Serum der Krebspatienten festgestellt werden. Dies ist vielleicht auf die bereits hohe Grundkonzentration von CD75s-Gangliosiden im Serum gesunder Individuen zurückzuführen. Die eventuell zusätzlich durch den Tumor freigesetzten Gangliosidmengen wären demnach zu gering, um bei den individuellen Schwankungen zwischen den Patienten einen signifikanten Anstieg der Serum-Konzentration hervorzurufen.

Das Auftreten von gemeinsamen, gleichgerichteten Zusammenhängen zwischen Serumgangliosidkonzentrationen und pathologischen Parametern beider Krebsarten spricht für die unspezifische Natur der beobachteten Effekte. Hochpolare Ganglioside ab nLc8Cer-Grundstrukturen nehmen unabhängig von der Krebsart mit der Tumorprogression ab. Dagegen nehmen einfach  $\alpha$ 2,3-sialylierte Ganglioside mit Grundstrukturen bis nLc8Cer scheinbar allgemein im Zusammenhang mit lymphogener Ausbreitung zu.

Dieser Sachverhalt weist auf einen nicht direkt vom Tumor stammenden sondern eher systemischen Effekt hin und widerspricht der Hypothese, dass eine Tumorerkrankung primär durch die vermehrte Freisetzung von Tumorgangliosiden im Serum reflektiert wird - zumindest im Fall der untersuchten Ganglioside. Dass generell eher eine Abnahme der Gangliosidkonzentrationen im Serum von Krebspatienten beobachtet wurde, und nicht, wie bei der Freisetzung von Tumorgangliosiden zu erwarten, eine Erhöhung gefunden wurde ist ein weiteres Indiz. Ayabe *et al.* beobachteten einen ähnlichen Sachverhalt, als sie im Zusammenhang mit akuter lymphatischer Leukämie einen Rückgang von GM3, GD3 und

GM1 im Plasma feststellten. Sie vermuteten dahinter einen sekundären Effekt, der den aufgrund der Krankheitsbedingungen veränderten Gangliosid-Metabolismus widerspiegelt (Ayabe *et al.* 1989).

#### **5.4.2.3 Quellen von Serumgangliosiden**

Um die Hintergründe der beobachteten Effekte genauer zu klären und möglicherweise vorhandene, indirekte Zusammenhänge aufzuklären, stellt sich die Frage nach den Quellen der durch die Krebserkrankung beeinflussten Serumganglioside. Serum bzw. Plasma steht in regem Kontakt mit Zelloberflächen des vaskulären Endothels. Aber auch Blutzellen stehen mit ihren Zelloberflächen in ständigem Kontakt mit Serum bzw. Plasma, so dass beide Zelltypen potenzielle Quellen der detektierten Ganglioside sind.

Endothelzellen weisen eine Expression sowohl von CD75s- als auch iso-CD75s-Gangliosiden auf (nachgewiesen in HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*), wobei die Expression von CD15s- und VIM-2-Gangliosiden in HUVEC und Aortaepithel jedoch nicht festgestellt werden konnte (Müthing *et al.* 1999; Cooling 1995).

Erythrozyten stellen mit 4,5 bis 5,5 Millionen Zellen/ $\mu$ l den größten Anteil der Blutzellen dar. Sie weisen als Hauptgangliosid GD3 auf (50-60%); darüber hinaus wurde die Expression von Gangliosiden der Neolakto-Serie mit Sialyl-i-, Sialyl-I- und ABH-Blutgruppen-Determinanten berichtet (Hakomori 1981b, Suzuki *et al.* 1981; Stults *et al.* 1982; Cooling *et al.* 2001). VIM-2-Strukturen konnten allerdings nicht nachgewiesen werden (Macher & Beckstaed 1990).

Thrombozyten sind mit 150.000-450.000 Zellen/ $\mu$ l die zweitgrößte Fraktion an Blutzellen (Cohen 2007). Thrombozyten-Ganglioside bestehen zu 90% aus GM3, 3-5% aus GD3; weiterhin sind in Spuren CD15s und VIM-aktive Ganglioside vorhanden (Ferroni *et al.* 1997; Cooling *et al.* 2001). Interessanterweise scheinen die Ganglioside aus Serum und Thrombozyten ein ähnliches Profil zu besitzen. Cooling *et al.* haben 1995 DC-Overlay-Assays von Thrombozyten-Gangliosiden durchgeführt und CD15s-Strukturen nachgewiesen. Die Profile der entsprechenden DC-Overlay-Assays sind vergleichbar mit denen in dieser Arbeit erzielten CD15s-Färbungen von Serumgangliosiden. Es wurden teilweise verzweigte disialylierte Glykane vorgeschlagen, da Ganglioside vermeintlich gleicher Laufhöhe CD15s- und iso-CD75s-positive Termini aufwiesen. Durch die DC-Overlay-Assay-Mehrfachfärbung konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass CD15s-positive und fukosylierte iso-CD75s-positive Ganglioside eine sehr ähnliche, aber nicht identische Mobilität aufweisen, und somit verschiedene Spezies darstellen (vergleiche auch CD15s-6 und iso-CD75s-5 in

Tabelle 4.3 bzw. VIII<sup>3</sup>Neu5Ac-Fuc-nLc8Cer und VIII<sup>3</sup>Neu5Ac-VII<sup>3</sup>Fuc-nLc8Cer in Abbildung 4.28). Die in der Mehrfach-Färbung nachgewiesenen Serum-Ganglioside könnten somit von Thrombozyten stammen.

Leukozyten treten in Mengen von 5.000 bis 10.000 Zellen/ $\mu$ l in humanem Blut auf. Diese lassen sich in Untergruppen einteilen; dabei stellen Granulozyten und Lymphozyten den Hauptanteil mit 54-62% bzw. 25-38% der Leukozyten dar (Cohen 2007).

Granulozyten sind Leukozyten der myeloiden Reihe und zeigen ein sehr ähnliches Gangliosid-Muster im Vergleich zum Serum. Darauf deuten bereits die verwendeten Referenzganglioside hin, die eine polare Fraktion von Granulozyten-Gangliosiden darstellen. Hier wurden Unterschiede im Wesentlichen in der Fettsäurezusammensetzung gefunden. Das überwiegende Auftreten von C16:0-haltigen Gangliosiden im Serum ist durch die bevorzugte Freisetzung von Gangliosiden mit kurzkettigen Fettsäuren zu erklären (Chang *et al.* 1997; Young *et al.* 1986).

Lymphozyten besitzen dagegen ein anderes Gangliosidmuster im Vergleich zu den Granulozyten. Während fast 100% der Granulozyten positiv hinsichtlich CD15s und VIM-2 sind, konnte nur auf 17% der Lymphozyten CD15s nachgewiesen werden (Kniep *et al.* 1996). VIM-2 wurde gar nicht auf Lymphozyten gefunden (Macher & Beckstaed 1990; Kniep *et al.* 1996).

Ganglioside von humanen Granulozyten wurden von verschiedenen Gruppen detailliert untersucht (Metelmann *et al.* 2001; Lümen 2001; Nimrichter *et al.* 2008). Es wurde ein großes Spektrum monosialylierter und fukosylierter poly-LacNAc-GSL detektiert, die der Neolakto-Serie zugeordnet wurden und in Granulozyten stark vertreten sind. Die MS-Profile weisen eine sehr große Ähnlichkeit zu denen der Serumganglioside auf (Metelmann *et al.* 2001; Nimrichter *et al.* 2008). Granulozyten zeigen daneben einen hohen Anteil an GM3. Fukosylierte Spezies treten im Wesentlichen ab nLc8Cer auf und besitzen bevorzugt CD15s- und VIM-2-Determinanten, wobei die CD15s-Strukturen bevorzugt auf hochgradig fukosylierten Gangliosiden nachgewiesen wurden.

Aufgrund der starken Expression komplexer Ganglioside und der hohen Glykanprofil-Übereinstimmung sind Granulozyten wahrscheinliche Quellen der hoch polaren Serumganglioside. Deren Abnahme mit der Tumorprogression könnte somit den Rückgang der Granulozytenzahl widerspiegeln. Dieser Zustand wird auch als Leukozytopenie, im speziellen Fall der Granulozyten auch als Agranulozytose bezeichnet.

Im Kontext von Krebserkrankungen geht eine Leukozytopenie im Allgemeinen nur mit einer Chemo- oder Strahlentherapie einher. Mit Ausnahme von Patient 45 aus der

Pankreaskrebs-Gruppe, der eine Strahlentherapie erhielt, wurde jedoch kein Patient vor der Serumentnahme solchen Therapien unterzogen.

Die Abnahme der Serumganglioside könnte Folge der allgemeinen Beeinträchtigung des Immunsystems durch die Krebserkrankung sein. Tumorzellen manipulieren das Immunsystem durch eine Vielzahl von Mechanismen, um dessen Überwachung (*immunosurveillance*) zu entkommen. Dabei wird häufig darauf „abgezielt“ der Tumor-spezifischen T-Zell-Antwort zu entgehen und unter anderem die T-Zell-Proliferation zu unterdrücken (Young *et al.* 1996). In diesem Zusammenhang wird auch von der Tumor-induzierten Immunsuppression gesprochen. T-Zellen gehören der lymphoiden Reihe der Leukozyten an und weisen, wie oben bereits erwähnt, ein geringes Maß fukosylierter CD15s- und keine VIM-2-Ganglioside auf. Es ist somit unwahrscheinlich, dass T-Zellen mit dem im Zuge der Tumorausdehnung beobachteten Rückgang derartiger Serumganglioside in Zusammenhang stehen. Außerdem sind Krebspatienten trotz der supprimierten Immunantwort gegen den Tumor häufig auch bei fortgeschrittenen Erkrankungen nicht immunkomprimiert. Das bedeutet, dass das Immunsystem weiterhin auf Reize anspricht (Gabrilowich & Hurwitz 2009).

#### **5.4.2.4 Fazit**

Die untersuchten Serumganglioside zeigen teilweise signifikante Zusammenhänge mit der malignen Transformation und dem Stadium der Krebserkrankung. Sie stellen somit Strukturen mit möglichem diagnostischen Nutzen dar. Da sie wahrscheinlich nicht dem Tumorgewebe sondern Zellen des Immunsystems entstammen, könnte es der Ansatz zukünftiger Studien sein, das Bild der Immunzellen im Blut der Patienten mit dem der Serumganglioside zu korrelieren. So können Zusammenhänge mit möglichen Immunreaktionen hinsichtlich der Tumorerkrankung aufgedeckt werden.

## 6 Zusammenfassung

Die Expression von Tumor-assoziierten Glykosphingolipiden (GSL) wurde im Zusammenhang mit Krebserkrankungen des Gastrointestinaltrakts untersucht. GSL sind Zelloberflächenstrukturen, die in Assoziation mit der Entartung von Zellen ein anormales Glykosylierungsmuster zeigen und aufgrund ihrer Exposition auf der Zelloberfläche potenzielle GSL-Zielstrukturen für Krebstherapien darstellen. Sie werden aber auch von Tumorzellen freigesetzt, so dass Tumor-assoziierte GSL im Serum von Patienten auftreten und dort potenzielle diagnostische Marker darstellen.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung Tumor-assoziiierter GSL in hepatozellulären Karzinomen (HCC) und in Serum von Magen- und Pankreaskarzinompatienten. Für die GSL-Analysen wurde eine Kombination aus (i) Dünnschichtchromatographie (DC), (ii) Overlay-Assay und (iii) direkter Infrarot Matrix-unterstützter Laser Desorption/Ionisation orthogonaler Flugzeit Massenspektrometrie (IR-MALDI-o-TOF-MS) verwendet. Diese Technik wurde weiterentwickelt, indem beim Overlay-Assay eine Mehrfachfärbung eingeführt wurde, die den Nachweis und die Charakterisierung von bis zu drei GSL-Determinanten auf einer DC-Platte ermöglicht. Dieses Verfahren liefert, neben zahlreichen anderen Vorteilen, eine erhöhte Ausbeute des Informationsgehalts der zu untersuchenden Proben.

### **GSL-Expression in HCC**

Die Expression von Gangliosiden mit terminalen CD75s- und iso-CD75s-Strukturen sowie der neutralen GSL Laktosylceramid (LacCer), Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer) wurde in HCC und benachbarten, normalen Vergleichsgeweben der Leber bestimmt.

CD75s-I (IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer) und iso-CD75s-I (IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer) zeigen eine starke Expression in normalem Leber- und HCC-Gewebe. Im Tumor ist das Expressionsniveau der beiden Ganglioside unverändert, zeigt jedoch eine erhöhte Varianz, die auf gegensätzliche Regulierung der Expression schließen lassen. Die fehlende Korrelation mit der Expression der Sialyltransferasen, ST6GAL1 und ST3GAL6, die den jeweils finalen Schritt in der Biosynthese katalysieren und die Tatsache, dass CD75s-I und iso-CD75s-I-Expressionen innerhalb eines Gewebes einen starken Zusammenhang aufweisen, deutet auf die Regulierung über einen gemeinsamen Faktor hin. Dies könnte die gemeinsame Biosynthesestufe nLc4Cer sein. Die Anwendung vom zytotoxischen Pflanzenlektin



Viscumin, das in klinischen Studien als Krebstherapeutikum getestet wird und an CD75s als Rezeptorstruktur bindet, wäre eventuell im Rahmen einer individualisierten Therapie für die Gruppe der CD75s-überexprimierenden Patienten denkbar.

Die untersuchten neutralen GSL zeigen eine reduzierte Expression in HCC, die im Fall von Gb3Cer und LacCer signifikant ist. Shiga Toxin 1 ist ein potenzielles Krebstherapeutikum, dem Gb3Cer als Zielstruktur dient. Es eignet sich aufgrund dieser Ergebnisse nicht für eine Behandlung von HCC. Die LacCer-Expression ist in Tumoren mit geringer Ausdehnung und gut differenzierten Zellen besonders gering und steigt mit fortschreitender Krankheit wieder an. LacCer könnte somit als Marker für Tumore im Frühstadium dienen. Gb4Cer zeigt ein ähnlich reziprokes Verhalten mit der TumorgroÙe, d.h. eine Reduktion in kleinen Tumoren, gefolgt von einer Zunahme mit der TumorgroÙe. Dies lässt auf zwei entgegengewirkende Einflussfaktoren schließen, von denen einer mit der Transformation der Zellen verbunden ist und der andere mit der Tumorausdehnung.

### **Serumganglioside von Magenkarzinom- und Pankreasadenokarzinom-Patienten**

Hoch komplexe Serumganglioside der Neolakto-Serie wurden mit Hilfe der neu entwickelten DC-Overlay-Assay-Mehrfachfärbung gegen CD75s, CD15s (Sialyl-Lewis-x) und iso-CD75s untersucht und mittels direkter IR-MALDI-o-TOF-MS charakterisiert. Es konnten sehr komplexe monosialylierte mehrfachfukosylierte Ganglioside mit bis zu Hexadecasaccharid-Glykanen nachgewiesen werden, die bisher noch nicht für Serum beschrieben wurden. Das Profil dieser Ganglioside in Serum von Magenkarzinom- und Pankreasadenokarzinom-Patienten wurde mit dem Krebs-freier Individuen verglichen.

Patienten mit Magenkarzinomen weisen signifikant verringerte Serumkonzentrationen von  $X^3\text{Neu5Ac-IX}^3\text{Fuc-Fuc-nLc10Cer}$  und  $\text{IV}^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  auf, Patienten mit Pankreasadenokarzinomen hingegen eine signifikant erhöhte Konzentration von  $\text{VIII}^3\text{Neu5Ac-Fuc-nLc8Cer}$ . Unabhängig von der Krebsart konnten zwei Entwicklungen im Zusammenhang mit dem Stadium der Erkrankung festgestellt werden. Mit zunehmender TumorgroÙe zeigten hoch komplexe CD15s- und iso-CD75s-Ganglioside mit nLc8Cer bis nLc12Cer-Grundstrukturen rückläufige Serumkonzentrationen. Dagegen weisen iso-CD75s-Ganglioside mit nLc4Cer- bis nLc8Cer-Grundstrukturen einen Zusammenhang mit der Präsenz und Anzahl der Lymphknotenmetastasen auf. Es ist anzunehmen, dass diese Veränderungen sekundäre Effekte darstellen, die möglicherweise den Einfluss der Erkrankung auf das Immunsystem widerspiegeln.

Die untersuchten Serumganglioside haben teilweise einen diagnostischen Nutzen, indem sie den Verlauf der Krebserkrankung reflektieren. Um jedoch ihr Potenzial voll auszuschöpfen und weitere Einsichten in funktionale Zusammenhänge zu erlangen, muss in zukünftigen Studien die Quelle dieser Ganglioside aufgedeckt werden.

## 7 Literatur

- Arai, T. *et al.*, 1998. Lactosylceramide stimulates human neutrophils to upregulate Mac-1, adhere to endothelium, and generate reactive oxygen metabolites in vitro. *Circulation Research*, 82(5), 540-547.
- Asaka, M., 2002. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, 41(1), 1-6.
- Atkinson, B.F. *et al.*, 1982. Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Research*, 42(11), 4820-4823.
- Ayabe, M., Shichijo, S. & Yokoyama, M.M., 1989. Diagnostic value of ganglioside patterns in plasma of human diseases. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 3(5), 301-306.
- Barbieri, L., Battelli, M.G. & Stirpe, F., 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1154(3-4), 237-282.
- Bennaceur, K. *et al.*, 2009. Different mechanisms are involved in apoptosis induced by melanoma gangliosides on human monocyte-derived dendritic cells. *Glycobiology*, 19(6), 576-582.
- Bergmann, L. *et al.*, 2008. Phase I trial of r viscumine (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001). *European Journal of Cancer*, 44(12), 1657-1662.
- Beuth, J. *et al.*, 1995. Immunomodulating ability of galactoside-specific lectin standardized and depleted mistletoe extract. *Arzneimittel-Forschung*, 45(11), 1240-1242.
- Bhunja, A.K. *et al.*, 1998. Lactosylceramide mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and the adhesion of neutrophil in human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 34349-34357.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 37(8), 911-917.
- Bocci, V., 1993. Mistletoe (*viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 7(1), 1-6.
- Borsig, L. *et al.*, 2002. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2193-2198.
- Bortz, J. & Lienert, G.A., 2003. *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung*, Springer.
- Bortz, J., Lienert, G.A. & Boehnke, K., 2000. *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik*, Springer.
- Botti, C. *et al.*, 1998. Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression. *The International Journal of Biological Markers*, 13(2), 51-69.

- Boyd, B. *et al.*, 1994. Lipid modulation of glycolipid receptor function. Availability of Gal( $\alpha$  1-4)Gal disaccharide for verotoxin binding in natural and synthetic glycolipids. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 223(3), 873-878.
- Boyd, W., 1954. The proteins of immune reactions. In H. Neurath & K. C. Bailey, eds. *The proteins*. Academic Press.
- Brown, K.E., Anderson, S.M. & Young, N.S., 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5130), 114-117.
- Brown, D.A. & London, E., 1997. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240(1), 1-7.
- Buchta, M., Höper, D.W. & Sönnichsen, A., 2006. *Das Hammerexamen mit StudentConsult-Zugang. Repetitorium für den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*, Urban & Fischer Bei Elsevier.
- Burnet, F.M., 1970. The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research. Fortschritte Der Experimentellen Tumorforschung. Progrès De La Recherche Expérimentale Des Tumeurs*, 13, 1-27.
- Büssing, A., Schaller, G. & Pfüller, U., 1998. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. *Anticancer Research*, 18(6A), 4291-4296.
- Büssing, A. & Schietzel, M., 1999. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Research*, 19(1A), 23-28.
- Cahan, L.D. *et al.*, 1982. Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(24), 7629-7633.
- Callies, R. *et al.*, 1977. Characterization of the cellular binding of exogenous gangliosides. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 80(2), 425-432.
- Cao, Y. *et al.*, 1999. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and  $\alpha$ 2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 434(6), 503-509.
- Carr, A. *et al.*, 2003. Immunotherapy of advanced breast cancer with a heterophilic ganglioside (NeuGcGM3) cancer vaccine. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(6), 1015-1021.
- Chan, K. *et al.*, 2009. MALDI mass spectrometry imaging of gangliosides in mouse brain using ionic liquid matrix. *Analytica Chimica Acta*, 639(1-2), 57-61.
- Chang, F., Li, R. & Ladisch, S., 1997. Shedding of gangliosides by human medulloblastoma cells. *Experimental Cell Research*, 234(2), 341-346.
- Chatterjee, S. & Kwiterovich, P.O., 1976. Glycosphingolipids of human plasma lipoproteins. *Lipids*, 11(6), 462-466.
- Chatterjee, S., Kolmakova, A. & Rajesh, M., 2008. Regulation of lactosylceramide synthase (glucosylceramide  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 galactosyltransferase); implication as a drug target. *Current Drug Targets*, 9(4), 272-281.

- Chatterjee, S. & Pandey, A., 2008. The Yin and Yang of lactosylceramide metabolism: implications in cell function. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1780(3), 370-382.
- Cheresh, D.A. *et al.*, 1987. An Arg-Gly-Asp-directed receptor on the surface of human melanoma cells exists in a divalent cation-dependent functional complex with the disialoganglioside GD2. *The Journal of Cell Biology*, 105(3), 1163-1173.
- Cherla, R.P., Lee, S. & Tesh, V.L., 2003. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiology Letters*, 228(2), 159-166.
- Chester, M.A., 1998. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 257(2), 293-298.
- Chu, K.U. *et al.*, 2000. Gangliosides as targets for immunotherapy for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 88(8), 1828-1836.
- Cohen, B.J., 2007. *Medical Terminology*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Cooling, L.L., Zhang, D. & Koerner, T.A., 2001. Human platelets express gangliosides with LKE activity and ABH blood group activity. *Transfusion*, 41(4), 504-516.
- Cooling, L.L. *et al.*, 1995. Detection in human blood platelets of sialyl Lewis X gangliosides, potential ligands for CD62 and other selectins. *Glycobiology*, 5(6), 571-581.
- Cotman, M. & Kukovic, Z., 2008. *Mitteilung an die Presse: 2876. Tagung des Rates Beschäftigung, Sozialpolitik, Gesundheit und Verbraucherschutz, Rat der Europäischen Union*, 10414/08 (Presse 166), Luxemburg.
- Dall'Olio, F., 2000. The sialyl- $\alpha$ 2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconjugate Journal*, 17(10), 669-676.
- Dall'Olio, F. *et al.*, 2004. Expression of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase and of  $\alpha$ 2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis. *Glycobiology*, 14(1), 39-49.
- Dawson, G., Kruski, A.W. & Scanu, A.M., 1976. Distribution of glycosphingolipids in the serum lipoproteins of normal human subjects and patients with hypo- and hyperlipidemias. *Journal of Lipid Research*, 17(2), 125-131.
- Deininger, M.H. & Meyermann, R., 1998. Multiple epitope labeling by the exclusive use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*, 110(4), 425-430.
- Derkaoui, N. *et al.*, 2007. Polyethylene glycol adsorption on silica: from bulk phase behavior to surface phase diagram. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 23(12), 6631-6637.
- Distler, U. *et al.*, 2008a. Matching IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry with the TLC overlay binding assay and its clinical application for tracing tumor-associated glycosphingolipids in hepatocellular and pancreatic cancer. *Analytical Chemistry*, 80(6), 1835-1846.
- Distler, U. *et al.*, 2008b. Tumor-associated CD75s- and iso-CD75s-gangliosides are potential targets for adjuvant therapy in pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2464-2475.

- Distler, U. *et al.*, 2009. Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. *PloS One*, 4(8), e6813.
- Dole, M. *et al.*, 1968. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 49, 2240.
- Dreisewerd, K. *et al.*, 2005. Analysis of gangliosides directly from thin-layer chromatography plates by infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix. *Analytical Chemistry*, 77(13), 4098-4107.
- Dreisewerd, K. *et al.*, 2006. Analysis of native milk oligosaccharides directly from thin-layer chromatography plates by matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal-time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(2), 139-150.
- Dunn, G.P. *et al.*, 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991-998.
- Duvar, S. *et al.*, 1997. Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of *in vitro* propagated bovine aortic endothelial cells. *Glycobiology*, 7(8), 1099-1109.
- Eck, J. *et al.*, 1999a. Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 264(3), 775-784.
- Eck, J. *et al.*, 1999b. Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 264(3), 775-784.
- EGGE, H. & Peter-Katalinic, J., 1985. Potentials of fast atom bombardment mass spectrometry in the analysis of glycoconjugates. In Burlingame, A. L. & Castagnoli, N. (Hrsg.) *Mass spectrometry in the health and life sciences*. Elsevier.
- Endo, Y. *et al.*, 1987. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5908-5912.
- Endo, Y. & Tsurugi, K., 1987. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(17), 8128-8130.
- Endo, Y., Tsurugi, K. & Franz, H., 1988. The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Letters*, 231(2), 378-380.
- Falguières, T. *et al.*, 2008. Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2498-2508.
- Farkas-Himsley, H. *et al.*, 1995. The bacterial colicin active against tumor cells *in vitro* and *in vivo* is verotoxin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), 6996-7000.
- Feizi, T., 1985. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*, 314(6006), 53-57.
- Ferlay, J. *et al.*, 2004. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC Cancer Base No. 5. version 2.0. Lyon: IARC Press.

- Ferroni, P. et al., 1997. Ganglioside content of human platelets--differences in resting and activated platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, 77(3), 548-554.
- Fleming, I.D. et al., 1997. *American Joint Committee on cancer: AJCC cancer staging manual 5. ed.*, Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Franz, H., Ziska, P. & Kindt, A., 1981. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album L.*). *The Biochemical Journal*, 195(2), 481-484.
- Franz, H., 1986. Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology*, 43 Suppl 1, 23-34.
- Fujiwara, Y. et al., 2002. The Sialyl Lewis X expression in hepatocarcinogenesis: potential predictor for the emergence of hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology*, 49(43), 213-217.
- Fukushima, K. et al., 1984. Characterization of sialosylated Lewisx as a new tumor-associated antigen. *Cancer Research*, 44(11), 5279-5285.
- Fuster, M.M. & Esko, J.D., 2005. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 5(7), 526-542.
- Gabius, H., 2009. *The Sugar Code*, John Wiley & Sons.
- Gabrilovich, D.I. & Hurwitz, A.A., 2008. *Tumor-induced immune suppression*, Springer.
- Garcia, M. et al., 2007. *Global Cancer Facts & Figures 2007*, Atlanta, GA, USA: American Cancer Society.
- Gariépy, J., 2001. The use of Shiga-like toxin 1 in cancer therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 39(1-2), 99-106.
- Garred, O., van Deurs, B. & Sandvig, K., 1995. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(18), 10817-10821.
- Gey, M., 1998. *Instrumentelle Bioanalytik*, Springer.
- Gomez, A. & Tang, K., 1994. Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Physics of Fluids*, 6, 404.
- Graham, R.C., Lundholm, U. & Karnovsky, M.J., 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 13, 150-152.
- Graham, R.C. & Karnovsky, M.J., 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 14(4), 291-302.
- Greene, F.L., Page, D.L. & Fleming, I.D., 2002. AJCC cancer staging handbook. In *AJCC cancer staging manual*. Springer Verlag.
- Guittard, J., Hronowski, X.L. & Costello, C.E., 1999. Direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of glycosphingolipids on thin layer

chromatographic plates and transfer membranes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 13(18), 1838-1849.

- Guthmann, M.D. *et al.*, 2004. Active specific immunotherapy of melanoma with a GM3 ganglioside-based vaccine: a report on safety and immunogenicity. *Journal of Immunotherapy*, 27(6), 442-451.
- Hakomori, S., 1981a. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 733-764.
- Hakomori, S., 1981b. Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Seminars in Hematology*, 18(1), 39-62.
- Hakomori, S. *et al.*, 1983. A monoclonal antibody directed to N-acetylneuraminosyl- $\alpha$  2 leads to 6-galactosyl residue in gangliosides and glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(19), 11819-11822.
- Hakomori, S., 1985. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Research*, 45(6), 2405-2414.
- Hakomori, S., 1996. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Research*, 56(23), 5309-5318.
- Hakomori, S., 2002. Inaugural Article: The glycosynapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 225-232.
- Hakomori, S., 2003. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Current Opinion in Hematology*, 10(1), 16-24.
- Hakomori, S., 2009. Glycosynaptic microdomains controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. *FEBS Letters*. [doi:10.1016/j.febslet.2009.10.065].
- Hamanaka, Y., Hamanaka, S. & Suzuki, M., 1996. Sialyl Lewis(a) ganglioside in pancreatic cancer tissue correlates with the serum CA 19-9 level. *Pancreas*, 13(2), 160-165.
- Hamilton, S.R. & Aaltonen, L.A., 2000. *World Health Organization Classification of Tumours - Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*, IARC Press.
- Hanfland, P., 1978. Isolation and purification of Lewis blood-group active glycosphingolipids from the plasma of human O Leb individuals. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 87(1), 161-170.
- Hanfland, P. *et al.*, 1984. Purification and structures of branched blood-group-B-active glycosphingolipids from human erythrocyte membranes. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 145(3), 531-542.
- Hartgrink, H.H. *et al.*, 2009. Gastric cancer. *Lancet*, 374(9688), 477-490.
- Hedlund, M. *et al.*, 2008.  $\alpha$  2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Research*, 68(2), 388-394.
- Heffer-Lauc, M. *et al.*, 2005. Membrane redistribution of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in brain tissue sections under conditions of lipid raft isolation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1686 3, 200-208.



- Heffer-Lauc, M. et al., 2007. Effects of detergents on the redistribution of gangliosides and GPI-anchored proteins in brain tissue sections. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 55(8), 805-812.
- Heitger, A. & Ladisch, S., 1996. Gangliosides block antigen presentation by human monocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1303(2), 161-168.
- Hellemans, J. et al., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), R19.
- Hesse, A. et al., 2008. Simple and universal tool to remove on-line impurities in mono- or two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1189(1-2), 175-182.
- Hillenkamp, F. & Peter-Katalinić, J., 2007. *MALDI MS*, Wiley-VCH.
- Hinwood, B.G., 1992. *A textbook of science for the health professions*, Nelson Thornes.
- Hoessli, D.C. & Ahmad, I., 2008. Mistletoe Lectins: Carbohydrate-Specific Apoptosis Inducers and Immunomodulators. *Current Organic Chemistry*, 12(11), 918–925.
- Hoffmann, E.D. & Stroobant, V., 2007. *Mass spectrometry*, Wiley-Interscience.
- Holt, S.J. & Sadler, P.W., 1958. Studies in enzyme cytochemistry. III. Relationships between solubility, molecular association and structure in indigoid dyes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)*, 148(933), 495-505.
- Horneber, M.A. et al., 2008. Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, (2), CD003297.
- Horner, M. et al., 2009. *SEER Cancer Statistics Review 1975-2006*, Bethesda, MD. USA: National Cancer Institute.
- Iribarne, J.V. & Thomson, B.A., 1976. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 64, 2287.
- Ishikawa, D. & Taki, T., 2000. Thin-layer chromatography blotting using polyvinylidene difluoride membrane (far-eastern blotting) and its applications. *Methods in Enzymology*, 312, 145-157.
- Ito, A. et al., 2001. Binding specificity of siglec7 to disialogangliosides of renal cell carcinoma: possible role of disialogangliosides in tumor progression. *FEBS Letters*, 498(1), 116-120.
- Iwamoto, T. et al., 2001. Lactosylceramide is essential for the osteoclastogenesis mediated by macrophage-colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46031-46038.
- Jäggy, C. et al., 1995. Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 45(8), 905-909.
- Janssen, J. & Laatz, W., 2007. *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*, Springer.
- Jensen, C. et al., 1987. Complexity of the influence of gangliosides on histamine release from human basophils and rat mast cells. *Agents and Actions*, 21(1-2), 79-82.

- Johannes, L. & Decaudin, D., 2005. Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Therapy*, 12(18), 1360-1368.
- Johanson, R.A. *et al.*, 2007. Phosphatidylcholine removal from brain lipid extracts expands lipid detection and enhances phosphoinositide quantification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 362(2), 155-167.
- Johansson, L. & Miller-Podraza, H., 1998. Analysis of 3- and 6-linked sialic acids in mixtures of gangliosides using blotting to polyvinylidene difluoride membranes, binding assays, and various mass spectrometry techniques with application to recognition by *Helicobacter pylori*. *Analytical Biochemistry*, 265(2), 260-268.
- Johansson, L., Johansson, P. & Miller-Podraza, H., 1999. Detection by the lectins from *Maackia amurensis* and *Sambucus nigra* of 3- and 6-linked sialic acid in gangliosides with neolacto chains separated on thin-layer chromatograms and blotted to PVDF membranes. *Analytical Biochemistry*, 267(1), 239-241.
- Johansson, D. *et al.*, 2009. Expression of verotoxin-1 receptor Gb3 in breast cancer tissue and verotoxin-1 signal transduction to apoptosis. *BMC Cancer*, 9, 67.
- Joshi, O. & McGuire, J., 2009. Adsorption behavior of lysozyme and Tween 80 at hydrophilic and hydrophobic silica-water interfaces. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2), 235-248.
- Kaegi, E., 1998. Unconventional therapies for cancer: 3. Iscador. Task Force on Alternative Therapies of the Canadian Breast Cancer Research Initiative. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal De l'Association Medicale Canadienne*, 158(9), 1157-1159.
- Kakugawa, Y. *et al.*, 2002. Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10718-10723.
- Kaneko, Y. *et al.*, 1995. Expression of Gal  $\beta$  1,4GlcNAc  $\alpha$  2,6-sialyltransferase and  $\alpha$  2,6-linked sialoglycoconjugates in normal human and rat tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 43(9), 945-954.
- Kannagi, R., 1997. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconjugate Journal*, 14(5), 577-584.
- Kannagi, R., 2000. Monoclonal anti-glycosphingolipid antibodies. *Methods in Enzymology*, 312, 160-179.
- Kannagi, R. *et al.*, 2004. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Science*, 95(5), 377-384.
- Kannagi, R. *et al.*, 1983. Factors affecting expression of glycolipid tumor antigens: influence of ceramide composition and coexisting glycolipid on the antigenicity of ganglioside in murine lymphoma cells. *Cancer Research*, 43(10), 4997-5005.
- Kannagi, R. *et al.*, 2008. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1780(3), 525-531.
- Karas, M. & Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299-2301.

- Karas, M. *et al.*, 1989a. Ultraviolet-laser desorption/ionization mass spectrometry of femtomolar amounts of large proteins. *Biomed. Environ. Mass Spectrom*, 18(9), 841–843.
- Karas, M. *et al.*, 1989b. Laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 dalton. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 28(6), 760–761.
- Kawamura, Y.I. *et al.*, 2008. DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology*, 135(1), 142-151.
- Kiarash, A., Boyd, B. & Lingwood, C.A., 1994. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 11138-11146.
- Kiguchi, K. *et al.*, 2006. Characteristic expression of globotriaosyl ceramide in human ovarian carcinoma-derived cells with anticancer drug resistance. *Cancer Science*, 97(12), 1321-1326.
- Kim, S. & Kim, T., 2003. Selection of optimal internal controls for gene expression profiling of liver disease. *BioTechniques*, 35(3), 456-458, 460.
- Kirsch, S. *et al.*, 2009. On-line nano-HPLC/ESI QTOF MS monitoring of  $\alpha$ 2-3 and  $\alpha$ 2-6 sialylation in granulocyte glycosphingolipidome. *Biological Chemistry*, 390(7), 657-672.
- Kitagawa, H. & Paulson, J.C., 1994. Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(27), 17872-17878.
- Kloppel, T.M. *et al.*, 1977. Glycolipid-bound sialic acid in serum: increased levels in mice and humans bearing mammary carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(7), 3011-3013.
- Kniep, B. *et al.*, 1996. The CDw65 monoclonal antibodies VIM-8 and VIM-11 bind to the neutral glycolipid V3FucnLc8Cer. *Journal of Biochemistry*, 119(3), 456-462.
- Kojima, N. & Hakomori, S., 1991. Synergistic effect of two cell recognition systems: glycosphingolipid-glycosphingolipid interaction and integrin receptor interaction with pericellular matrix protein. *Glycobiology*, 1(6), 623-630.
- Kolter, T., Proia, R.L. & Sandhoff, K., 2002. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25859-25862.
- Kong, Y., Li, R. & Ladisch, S., 1998. Natural forms of shed tumor gangliosides. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1394(1), 43-56.
- Kovbasnjuk, O. *et al.*, 2005. The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19087-19092.
- Krauspenhaar, R. *et al.*, 1999. Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(2), 418-424.
- Krzewinski-Recchi, M. *et al.*, 2003. Identification and functional expression of a second human  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase, ST6Gal II. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 270(5), 950-961.

- Kufe, D.W., Holland, J.F. & Frei, E. eds., 2003. *Cancer medicine* 6. ed., Hamilton (Canada): BC Decker.
- Kundu, S.K. *et al.*, 1985. Glycosphingolipids of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238(2), 388-400.
- LaCasse, E.C. *et al.*, 1999. Shiga-like toxin-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34(+) hematopoietic stem cells: implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. *Blood*, 94(8), 2901-2910.
- Ladisch, S., Becker, H. & Ulsh, L., 1992. Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1125(2), 180-188.
- Ladisch, S. *et al.*, 1984. Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, 74(6), 2074-2081.
- Ladisch, S. & Wu, Z.L., 1985. Detection of a tumour-associated ganglioside in plasma of patients with neuroblastoma. *Lancet*, 1(8421), 136-138.
- Ladisch, S. *et al.*, 1987. Shedding of GD2 ganglioside by human neuroblastoma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 39(1), 73-76.
- Lai, I. *et al.*, 2002. Comparison of serum CA72-4, CEA, TPA, CA19-9 and CA125 levels in gastric cancer patients and correlation with recurrence. *Hepato-Gastroenterology*, 49(46), 1157-1160.
- Lauc, G. & Heffer-Lauc, M., 2006. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1760(4), 584-602.
- Leverly, S.B., 2005. Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics. *Methods in Enzymology*, 405, 300-369.
- Li, R.X. & Ladisch, S., 1991. Shedding of human neuroblastoma gangliosides. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1083(1), 57-64.
- Lindberg, A.A. *et al.*, 1987. Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(4), 1779-1785.
- Lo, H.S. *et al.*, 1980. Serum gangliosides in cerebral astrocytoma. *Annals of Neurology*, 8(5), 534-538.
- Loboda, A.V., Ackloo, S. & Chernushevich, I.V., 2003. A high-performance matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometer with collisional cooling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 17(22), 2508-2516.
- Lottspeich, F. & Engels, J.W., 2006. *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lümen, R., 2001. *Isolierung und strukturelle Charakterisierung von E-Selektin-bindenden Gangliosiden aus humanen Granulozyten*. Dissertation, Technische Fakultät der Universität Bielefeld.
- Luther, P. & Becker, H., 1987. *Die Mistel*, Springer-Verlag.
- Mabed, M., El-Helw, L. & Shamaa, S., 2004. Phase II study of viscum fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 90(1), 65-69.

- Macher, B.A. & Beckstead, J.H., 1990. Distribution of VIM-2 and SSEA-1 glycoconjugate epitopes among human leukocytes and leukemia cells. *Leukemia Research*, 14(2), 119-130.
- Magnani, J.L., Smith, D.F. & Ginsburg, V., 1980. Detection of gangliosides that bind cholera toxin: direct binding of 125I-labeled toxin to thin-layer chromatograms. *Analytical Biochemistry*, 109(2), 399-402.
- Manzi, A.E. *et al.*, 1990. Biosynthesis and turnover of O-acetyl and N-acetyl groups in the gangliosides of human melanoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(22), 13091-13103.
- Marquina, G. *et al.*, 1996. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Research*, 56(22), 5165-5171.
- Martin, S.F., Williams, N. & Chatterjee, S., 2006. Lactosylceramide is required in apoptosis induced by N-Smase. *Glycoconjugate Journal*, 23(3-4), 147-157.
- Matsuura, N. *et al.*, 1997. Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patients with distant metastases. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 27(3), 135-139.
- McKallip, R., Li, R. & Ladisch, S., 1999. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(7), 3718-3726.
- Meisen, I., Peter-Katalinić, J. & Müthing, J., 2003. Discrimination of neolacto-series gangliosides with  $\alpha$ 2-3- and  $\alpha$ 2-6-linked N-acetylneuraminic acid by nanoelectrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem quadrupole TOF MS. *Analytical Chemistry*, 75(21), 5719-5725.
- Meisen, I., Peter-Katalinić, J. & Müthing, J., 2004. Direct analysis of silica gel extracts from immunostained glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(8), 2248-2255.
- Meisen, I. *et al.*, 2005. Application of combined high-performance thin-layer chromatography immunostaining and nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry to the structural characterization of high- and low-affinity binding ligands of Shiga toxin 1. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(24), 3659-3665.
- Meisen, I., Peter-Katalinić, J. & Müthing, J., 2003. Discrimination of neolacto-series gangliosides with  $\alpha$ 2-3- and  $\alpha$ 2-6-linked N-acetylneuraminic acid by nanoelectrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem quadrupole TOF MS. *Analytical Chemistry*, 75(21), 5719-5725.
- Merritt, W.D., Der-Minassian, V. & Reaman, G.H., 1994. Increased GD3 ganglioside in plasma of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 8(5), 816-822.
- Metelmann, W., Peter-Katalinić, J. & Müthing, J., 2001. Gangliosides from human granulocytes: a nano-ESI QTOF mass spectrometry fucosylation study of low abundance species in complex mixtures. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(8), 964-973.
- Mihailova, A., Lundanes, E. & Greibrokk, T., 2006. Determination and removal of impurities in 2-D LC-MS of peptides. *Journal of Separation Science*, 29(4), 576-581.
- Miller, H.C. & Esselman, W.J., 1975. Modulation of the immune response by antigen-reactive lymphocytes after cultivation with gangliosides. *Journal of Immunology*, 115(3), 839-843.

- Modak, S. & Cheung, N.V., 2007. Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Investigation*, 25(1), 67-77.
- Mody, R., Joshi, S. & Chaney, W., 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33(1), 1-10.
- Moisenovic, M. *et al.*, 2002. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells. *European Journal of Cell Biology*, 81(10), 529-538.
- Murray, L.J. *et al.*, 1985. Expression of Burkitt lymphoma-associated antigen (defined by the monoclonal antibody 38.13) on both normal and malignant germinal-centre B cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 36(5), 561-565.
- Müthing, J., 1996. High-resolution thin-layer chromatography of gangliosides. *Journal of Chromatography. A*, 720(1-2), 3-25.
- Müthing, J. *et al.*, 1999. Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated human umbilical vein endothelial cells. *Glycobiology*, 9(5), 459-468.
- Müthing, J., 2001. Chemical Biology and Biomedicine: Glycolipids and Glycosphingolipids. In B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, & J. Thiem, eds. *Glycoscience: chemistry and chemical biology I-III*. Springer, Heidelberg.
- Müthing, J. *et al.*, 2002. Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally  $\alpha$ 2-6-sialylated neolacto-series gangliosides. *Glycobiology*, 12(8), 485-497.
- Müthing, J. *et al.*, 2004. Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac  $\alpha$  2-6Gal  $\beta$  1-4GlcNAc residues. *Biochemistry*, 43(11), 2996-3007.
- Müthing, J. *et al.*, 2005. Tumor-associated CD75s gangliosides and CD75s-bearing glycoproteins with Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-residues are receptors for the anticancer drug rViscumin. *The FASEB Journal*, 19(1), 103-105.
- Müthing, J. *et al.*, 2009. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(2), 252-264.
- Müthing, J. & Distler, U., 2009. Advances on the compositional analysis of glycosphingolipids combining thin-layer chromatography with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. [doi 10.1002/mas.20253].
- Mutschler, E., 1986. *Arzneimittelwirkungen*, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Myoga, A. *et al.*, 1988. Detection of patients with cancer by monoclonal antibody directed to lactoneotetraosylceramide (paragloboside). *Cancer Research*, 48(6), 1512-1516.
- Nakagoe, T. *et al.*, 2002. Predictive factors for preoperative serum levels of sialy Lewis(x), sialyl Lewis(a) and sialyl Tn antigens in gastric cancer patients. *Anticancer Research*, 22(1A), 451-458.
- Nakamura, K. *et al.*, 2006. Structural characterization of neutral glycosphingolipids by thin-layer chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight MS/MS. *Analytical Chemistry*, 78(16), 5736-5743.

- Nature Reviews, 2009. Immunotherapy shows promise in Phase III neuroblastoma trial. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(8), 604.
- Negrone, E. et al., 1996. Evaluation of the efficiency of an assay procedure for gangliosides in human serum. *Glycoconjugate Journal*, 13(3), 347-352.
- Neumann, M. & Gabel, D., 2002. Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 50(3), 437-439.
- Nilsson, O. & Svennerholm, L., 1982. Characterization and quantitative determination of gangliosides and neutral glycosphingolipids in human liver. *Journal of Lipid Research*, 23(2), 327-334.
- Nilsson, O. et al., 1985. Monoclonal antibodies raised against NeuAc  $\alpha$  2-6neolactotetraosylceramide detect carcinoma-associated gangliosides. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 835(3), 577-583.
- Nimrichter, L. et al., 2008. E-selectin receptors on human leukocytes. *Blood*, 112(9), 3744-3752.
- Nomura, A. et al., 1991. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *The New England Journal of Medicine*, 325(16), 1132-1136.
- Nudelman, E. et al., 1982. Characterization of a human melanoma-associated ganglioside antigen defined by a monoclonal antibody, 4.2. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(21), 12752-12756.
- Okajima, T. et al., 1999. Molecular cloning of a novel  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase (ST3Gal VI) that sialylates type II lactosamine structures on glycoproteins and glycolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11479-11486.
- Olshefski, R. & Ladisch, S., 1996. Intercellular transfer of shed tumor cell gangliosides. *FEBS Letters*, 386(1), 11-14.
- Olsnes, S. et al., 1982. Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *The Journal of Biological Chemistry*, 257(22), 13263-13270.
- Oosterwijk, E. et al., 1991. Monoclonal antibodies against Gal  $\alpha$  1-4Gal  $\beta$  1-4Glc (Pk, CD77) produced with a synthetic glycoconjugate as immunogen: reactivity with carbohydrates, with fresh frozen human tissues and hematopoietic tumors. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 48(6), 848-854.
- Osorio, M. et al., 2008. Heterophilic NeuGcGM3 ganglioside cancer vaccine in advanced melanoma patients: results of a Phase Ib/IIa study. *Cancer Biology & Therapy*, 7(4), 488-495.
- Paganuzzi, M. et al., 2003. Prognostic role of serum sialyl Lewisx (CD15s) in colorectal cancer. *Oncology*, 65(1), 52-59.
- Parkin, D.M., Pisani, P. & Ferlay, J., 1999. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 49(1), 33-64, 1.
- Parsonnet, J. et al., 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. *Gut*, 40(3), 297-301.
- Pascher, I., 1976. Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 455(2), 433-451.

- Paulson, J.C., Weinstein, J. & Schauer, A., 1989. Tissue-specific expression of sialyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(19), 10931-10934.
- Perez, C.A. *et al.*, 2002. Serum total gangliosides and TA90-IC levels: novel immunologic markers in colorectal cancer. *Cancer Journal*, 8(1), 55-61.
- Peter-Katalinić, J. & Egge, H., 1990. Desorption mass spectrometry of glycosphingolipids. *Methods in Enzymology*, 193, 713-733.
- Peumans, W.J. *et al.*, 1996. Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). *FEBS Letters*, 396(2-3), 261-265.
- Portoukalian, J. *et al.*, 1978. Alteration of gangliosides in plasma and red cells of humans bearing melanoma tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 85(3), 916-920.
- Portoukalian, J. *et al.*, 1989. Tumor size-dependent elevations of serum gangliosides in patients with head and neck carcinomas. *Biochemistry International*, 18(4), 759-765.
- Portoukalian, J. *et al.*, 1993. Shedding of GD2 ganglioside in patients with retinoblastoma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 53(6), 948-951.
- Pukel, C.S. *et al.*, 1982. GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. *The Journal of Experimental Medicine*, 155(4), 1133-1147.
- Pusztai, A., Bardocz, S. & Ewen, S.W.B., 2008. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13, 1130-1140.
- Radić, B., Vukelić, Z. & Bognar, S.K., 2008. Serum gangliosides in patients with brain tumors. *Collegium Antropologicum*, 32 Suppl 1, 171-175.
- Radsak, K., Schwarzmann, G. & Wiegandt, H., 1982. Studies on the cell association of exogenously added sialo-glycolipids. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, 363(3), 263-272.
- Ragupathi, G. *et al.*, 2003. Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(14), 5214-5220.
- Ravindranath, M.H. *et al.*, 2003. Serum total ganglioside level correlates with clinical course in melanoma patients after immunotherapy with therapeutic cancer vaccine. *Journal of Immunotherapy*, 26(3), 277-285.
- Reich, E. & Schibli, A., 2007. *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*, Thieme.
- Ribéreau-Gayon, G. *et al.*, 1986. Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoe preparations on cultured tumor cells. *Oncology*, 43 Suppl 1, 35-41.
- Rohlfing, A. *et al.*, 2007. IR-MALDI-MS analysis of HPTLC-separated phospholipid mixtures directly from the TLC plate. *Analytical Chemistry*, 79(15), 5793-5808.
- Rozen, S. & Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132, 365-386.



- Saito, T. & Hakomori, S.I., 1971. Quantitative isolation of total glycosphingolipids from animal cells. *Journal of Lipid Research*, 12(2), 257-259.
- Sakai, N., Okada, Y. & Tsuji, T., 1997. Increased serum levels of the carrier molecules of the carbohydrate antigen sialyl Lewis X in liver diseases. *Acta Medica Okayama*, 51(2), 79-85.
- Salhia, B. *et al.*, 2002. The treatment of malignant meningioma with verotoxin. *Neoplasia*, 4(4), 304-311.
- Samtleben, R. *et al.*, 1999. Mistletoe lectins as immunostimulantes (chemistry, pharmacology and clinic). In H. Wagner, ed. *Immunomodulatory agents from plants*. Birkhäuser, p. 390.
- Sandhoff, K. & Kolter, T., 2003. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1433), 847-861.
- Sandvig, K. & van Deurs, B., 2002. Membrane traffic exploited by protein toxins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18, 1-24.
- Sata, T. *et al.*, 1991. Expression of  $\alpha$  2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with *Sambucus nigra* and *Maackia amurensis* lectins. *The American Journal of Pathology*, 139(6), 1435-1448.
- Schöffski, P. *et al.*, 2004. Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 15(12), 1816-1824.
- Schöffski, P. *et al.*, 2005. Weekly 24 h infusion of aviscumine (rViscumin): a phase I study in patients with solid tumours. *European Journal of Cancer*, 41(10), 1431-1438.
- Schwartz, M.M., 2002. *Encyclopedia of materials, parts, and finishes*, CRC Press.
- Schwarzmann, G. *et al.*, 1983. Incorporation of ganglioside analogues into fibroblast cell membranes. A spin-label study. *Biochemistry*, 22(21), 5041-5048.
- Schweppe, C.H. *et al.*, 2008. Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: relationship of heterogeneity in Gb3Cer/CD77 receptor expression with differential Shiga toxin 1 cytotoxicity. *Glycoconjugate Journal*, 25(4), 291-304.
- Seligman, A.M. *et al.*, 1968. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *The Journal of Cell Biology*, 38(1), 1-14.
- Senn, H.J. *et al.*, 1989. Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 181(3), 657-662.
- Senn, H.J. *et al.*, 1990. Altered concentrations, patterns and distribution in lipoproteins of serum gangliosides in liver diseases of different etiologies. *Journal of Hepatology*, 11(3), 290-296.
- Shaposhnikova, G.I. *et al.*, 1984. Shedding of gangliosides from tumor cells depends on cell density. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 140(3), 567-570.
- Shen, J.X. *et al.*, 2005. Minimization of ion suppression in LC-MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 359-367.

- Shen, W. *et al.*, 2005. Modulation of CD4 Th cell differentiation by ganglioside GD1a in vitro. *Journal of Immunology*, 175(8), 4927-4934.
- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-572.
- Simpson, M.A. *et al.*, 2004. Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nature Genetics*, 36(11), 1225-1229.
- Sonnenburg, J.L., van Halbeek, H. & Varki, A., 2002. Characterization of the acid stability of glycosidically linked neuraminic acid: use in detecting de-N-acetyl-gangliosides in human melanoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17502-17510.
- Souady, J. *et al.*, 2009. Structural profiling of individual glycosphingolipids in a single thin-layer chromatogram by multiple sequential immunodetection matched with Direct IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(22), 9481-9492.
- Souady, J. *et al.*, 2010. Software utilities for the interpretation of mass spectrometric data of glycoconjugates: application to glycosphingolipids of human serum. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (akzeptiert).
- Stauder, H. & Kreuser, E.D., 2002. Mistletoe extracts standardised in terms of mistletoe lectins (ML I) in oncology: current state of clinical research. *Onkologie*, 25(4), 374-380.
- Stein, G.M. *et al.*, 1999. Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. *Anticancer Research*, 19(2A), 1037-1042.
- Steiner, R., 1990. *Geisteswissenschaft und Medizin*, Rudolf-Steiner-Verl.
- Stirpe, F. *et al.*, 1982. Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(22), 13271-13277.
- Subbaiah, P.V., 2000. Determination and Clinical Significance of Phospholipids. In N. Rifai, G. R. Warnick, & M. H. Dominiczak, eds. *Handbook of lipoprotein testing*. Amer. Assoc. for Clinical Chemistry.
- Sugiura, Y. *et al.*, 2008. Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PloS One*, 3(9), e3232.
- Sunayama, T., Okada, Y. & Tsuji, T., 1993. Elevated plasma levels of a carbohydrate antigen, sialyl Lewis X, in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 19(3), 451-458.
- Suzuki, A. *et al.*, 1981. Glycosphingolipids of K562 cells: a chemical and immunological analysis. *International Journal of Cancer*, 28(3), 271-276.
- Suzuki, Y. *et al.*, 1991. A new monoclonal antibody directed to sialyl  $\alpha$  2-3lactoneotetraosylceramide and its application for detection of human gastrointestinal neoplasms. *Journal of Biochemistry*, 109(2), 354-360.
- Svennerholm, L., 1963. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *Journal of Neurochemistry*, 10, 613-623.
- Tai, T. *et al.*, 1983. Ganglioside GM2 as a human tumor antigen (OFA-I-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(17), 5392-5396.

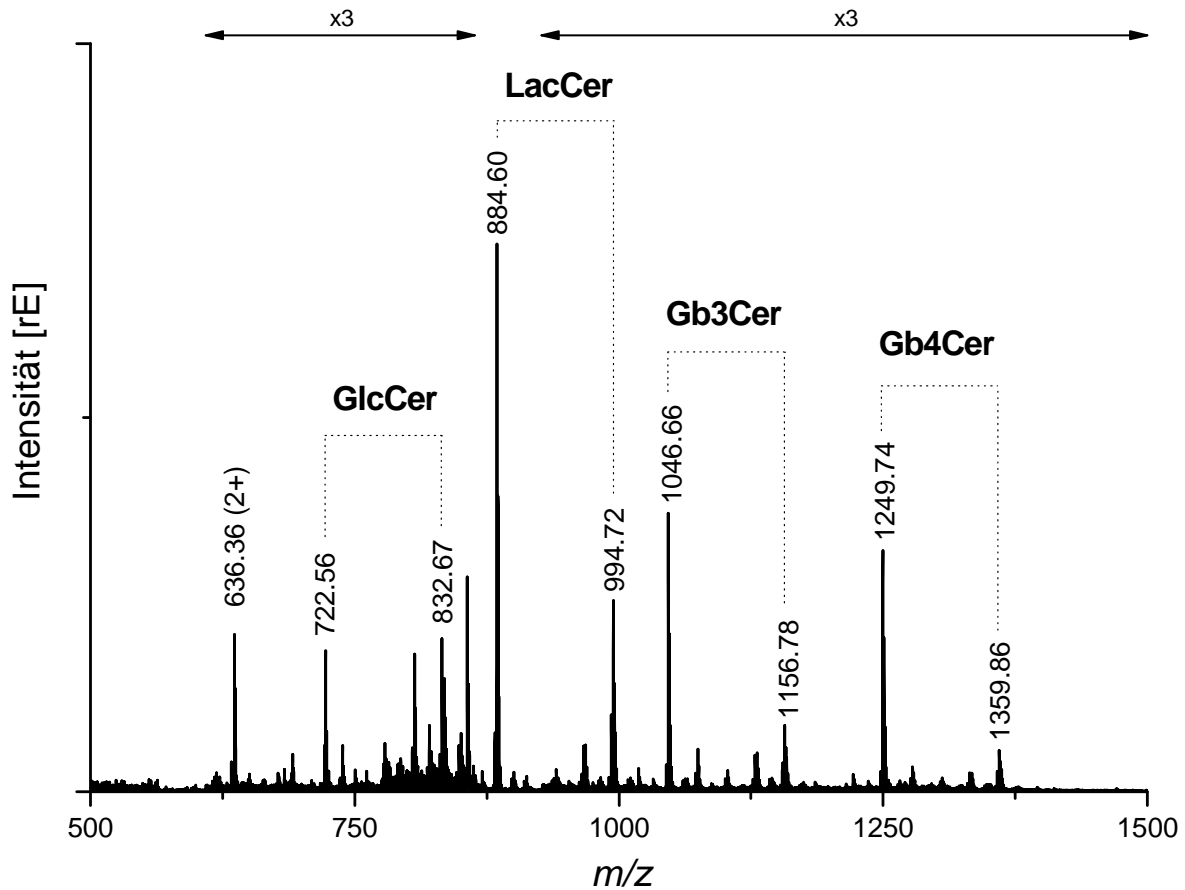
- Takada, A. *et al.*, 1993. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Research*, 53(2), 354-361.
- Takashima, S., Tsuji, S. & Tsujimoto, M., 2002. Characterization of the second type of human  $\beta$ -galactoside  $\alpha$  2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Gal $\beta$  1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially. Genomic analysis of human sialyltransferase genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 45719-45728.
- Taki, T. & Ishikawa, D., 1997. TLC blotting: application to microscale analysis of lipids and as a new approach to lipid-protein interaction. *Analytical Biochemistry*, 251(2), 135-143.
- Taki, T. *et al.*, 1984. Glycolipid composition of ascitic fluids from patients with cancer. *Journal of Biochemistry*, 96(4), 1257-1265.
- Taki, T. *et al.*, 1985. Immunological analysis of glycolipids on cell surfaces of cultured human tumor cell lines: expression of lactoneotetraacylceramide on tumor cell surfaces. *Journal of Biochemistry*, 98(4), 887-895.
- Taki, T. *et al.*, 1990. Accumulation of gangliosides with N-acetylneuraminosyl( $\alpha$  2-6)lactosamine structure in primary human hepatoma. *Cancer Research*, 50(4), 1284-1290.
- Taki, T. *et al.*, 1992. Human hepatoma gangliosides: occurrence of a novel I-type glycolipid with NeuAc  $\alpha$  2-6Gal structure. *Cancer Research*, 52(17), 4805-4811.
- Taki, T. *et al.*, 1995. Direct mass spectrometric analysis of glycosphingolipid transferred to a polyvinylidene difluoride membrane by thin-layer chromatography blotting. *Analytical Biochemistry*, 225(1), 24-27.
- Tanaka, K. *et al.*, 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8).
- Tanno, M. *et al.*, 1988. Ganglioside variations in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma as shown by two-dimensional thin-layer chromatography. *Clinical Biochemistry*, 21(6), 333-339.
- Tanno, M. *et al.*, 1993. Immunohistochemical localization of ganglioside components in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis using monoclonal antibody. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 68(4), 456-464.
- Thies, A. *et al.*, 2005. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology*, 207(1), 105-116.
- Tubeuf, K.V. & Neckel, G., 1923. *Monographie der Mistel*, Oldenbourg.
- Valentino, L. *et al.*, 1990. Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. *Blood*, 75(7), 1564-1567.
- Valentino, L.A. & Ladisch, S., 1992. Localization of shed human tumor gangliosides: association with serum lipoproteins. *Cancer Research*, 52(4), 810-814.
- Van Duijn, P., Pascoe, E. & Van der Ploeg, M., 1967. Theoretical and experimental aspects of enzyme determination in a cytochemical model system of polyacrylamide films containing alkaline phosphatase. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 15(11), 631-645.

- Vance, D.E. & Sweeley, C.C., 1967. Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides in human blood. *Journal of Lipid Research*, 8(6), 621-630.
- Vandesompele, J. *et al.*, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034.
- Varki, A., Cummings, R. & Eski, J., 2008. *Essentials of Glycobiology* 0002. ed., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Viegas, M.S. *et al.*, 2007. An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 51(1), 59-66.
- Wagner, H., Jordan, E. & Feil, B., 1986. Studies on the standardization of mistletoe preparations. *Oncology*, 43 Suppl 1, 16-22.
- Watanabe, T. *et al.*, 1982. Human melanoma antigen AH is an autoantigenic ganglioside related to GD2. *The Journal of Experimental Medicine*, 156(6), 1884-1889.
- Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U. & Paulson, J.C., 1982. Purification of a Gal  $\beta$  1 to 4GlcNAc  $\alpha$  2 to 6 sialyltransferase and a Gal  $\beta$  1 to 3(4)GlcNAc  $\alpha$  2 to 3 sialyltransferase to homogeneity from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(22), 13835-13844.
- Whisler, R.L. & Yates, A.J., 1980. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I. Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 125(5), 2106-2111.
- Wing, D.R. *et al.*, 2001. High-performance liquid chromatography analysis of ganglioside carbohydrates at the picomole level after ceramide glycanase digestion and fluorescent labeling with 2-aminobenzamide. *Analytical Biochemistry*, 298(2), 207-217.
- Wu, X., Xie, G. & Chen, D., 2007. Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(8), 1178-1182.
- Yamashita, M. & Fenn, J.B., 1984a. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(20), 4451-4459.
- Yamashita, M. & Fenn, J.B., 1984b. Negative Ion Production with the Electrospray Ion Source. *J. Phys. Chem*, 88, 4611-4615.
- Yamashita, S., 2007. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 41(3), 141-200.
- Yeh, L.H. *et al.*, 2001. Lactosylceramide mediates shear-induced endothelial superoxide production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *Journal of Vascular Research*, 38(6), 551-559.
- Yoshino, T., Watanabe, K. & Hakomori, S., 1982. Chemical synthesis of  $\alpha$ -L-fucopyranosylceramide and its analogues and preparation of antibodies directed to this glycolipid. *Biochemistry*, 21(5), 928-934.
- Young, W.W., Borgman, C.A. & Wolock, D.M., 1986. Modes of shedding of glycosphingolipids from mouse lymphoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(5), 2279-2283.

- Young, M.R. et al., 1996. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor- $\beta$  and nitric oxide. *Journal of Immunology*, 156(5), 1916-1922.
- Yu, R.K. & Ledeen, R.W., 1972. Gangliosides of human, bovine, and rabbit plasma. *Journal of Lipid Research*, 13(5), 680-686.
- Yu, A., 2009. *J. Clin. Oncol.*, 27(S15), 10067.
- Zheng, M., Fang, H. & Hakomori, S., 1994. Functional role of N-glycosylation in  $\alpha 5 \beta 1$  integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 12325-12331.
- Ziska, P. & Franz, H., 1981. Studies on the interaction of the mistletoe lectin I with carbohydrates. *Experientia*, 37(3), 219.

## 8 Anhang

### 8.1 Zusätzliche Abbildungen



**Abbildung 8.1:** (+)nanoESI-QTOF Massenspektrum der Serum-GSL-Fraktion 2. Neutrale GSL wurden als Natrium-Addukte des Typs  $[M+Na]^+$  detektiert. Gb4Cer wurde auch als doppelt geladene  $[M+2Na]^{2+}$ -Ionen nachgewiesen. Eine vollständige Auflistung aller GSL-Signale ist in Tabelle 8.7 dargestellt (Souady *et al.* 2010).

## 8.2 Zusätzliche Tabellen

**Tabelle 8.1: Einbindung der Messdaten einzelner Patienten für die Expressionsanalyse von Gangliosiden mit CD75s- und iso-CD75s-Strukturen, den Sialyltransferasen (ST) ST6GAL1 und ST3GAL6 sowie den neutralen GSLs LacCer, Gb3Cer und Gb4Cer.**

Patient Nr.	Ganglioside	ST	Neutrale GSL
1	ja	nein	ja
2	ja	nein	ja
3	ja	nein	ja
4	ja	ja	ja
5	ja	ja	ja
6	ja	ja	ja
7	ja	ja	ja
8	ja	ja	ja
9	ja	ja	ja
10	ja	ja	ja
11	ja	ja	ja
12	ja	ja	ja
13	nein	ja	nein
14	ja	ja	ja
15	ja	ja	ja
16	nein	ja	nein
17	ja	ja	ja
18	nein	ja	nein
19	nein	nein	ja
20	nein	ja	ja
21	nein	ja	nein
22	nein	ja	nein
23	ja	ja	ja
24	nein	nein	ja
25	ja	ja	ja
26	ja	ja	ja
27	ja	ja	ja
28	ja	ja	ja
29	ja	nein	ja
30	ja	ja	ja
31	ja	ja	ja
32	ja	ja	ja
33	ja	ja	ja
34	ja	ja	ja
35	ja	nein	ja
36	ja	ja	ja
37	ja	ja	ja

Tabelle 8.2: LacCer-Expression in HCC-Patienten.

Kategorie	rel. Anteil [%]	Rang	Patient	pT <sup>a</sup>	G <sup>a</sup>
<b>I</b>	<b>9,4</b>	1	34	1	2
		2	7	3	2
		3	19	x	x
<b>II</b>	<b>12,5</b>	4	28	1	1
		5	20	2	2
		6	27	1	2
		7	8	3	3
		8	36	3	3
		9	17	x	x
		10	6	3	3-4
		11	31	1	3
		12	30	2	2
		13	32	2	2
<b>III</b>	<b>78,1</b>	14	4	3	2
		15	33	1	1
		16	1	3	2-3
		17	3	1	2-3
		18	24	1	2
		19	26	3	2
		20	2	2	2
		21	12	3	2
		22	35	2	3
		23	25	1	2
		24	14	2	1
		25	9	3	2
		26	29	1	1
		27	37	1	2
		28	23	2	1
		29	15	x	x
		30	10	3	x
		31	5	4	3
		32	11	1	1

<sup>a</sup> pathologische Daten entsprechend aus Tabelle 3.1.



Tabelle 8.3: Gb3Cer-Expression in HCC-Patienten.

Kategorie	rel. Anteil [%]	Rang	Patient	pT <sup>a</sup>	G <sup>a</sup>
<b>I</b>	<b>15,6</b>	1	4	3	2
		2	28	1	1
		3	24	1	2
		4	35	2	3
		5	1	3	2-3
<b>II</b>	<b>15,6</b>	6	17	x	x
		7	20	2	2
		8	12	3	2
		9	6	3	3-4
		10	8	3	3
<b>III</b>	<b>68,8</b>	11	19	x	x
		12	11	1	1
		13	26	3	2
		14	10	3	x
		15	33	1	1
		16	29	1	1
		17	3	1	2-3
		18	23	2	1
		19	14	2	1
		20	34	1	2
		21	27	1	2
		22	7	3	2
		23	37	1	2
		24	2	2	2
		25	9	3	2
		26	32	2	2
		27	15	x	x
28	36	3	3		
29	30	2	2		
30	31	1	3		
31	5	4	3		
32	25	1	2		

<sup>a</sup> pathologische Daten entsprechend aus Tabelle 3.1.

Tabelle 8.4: Gb4Cer-Expression in HCC-Patienten.

Kategorie	rel. Anteil [%]	Rang	Patient	pT <sup>a</sup>	G <sup>a</sup>
<b>I</b>	<b>37,5</b>	1	17	x	x
		2	20	2	2
		3	19	x	x
		4	8	3	3
		5	10	3	x
		6	12	3	2
		7	35	2	3
		8	14	2	1
		9	28	1	1
		10	33	1	1
		11	4	3	2
		12	1	3	2-3
<b>II</b>	<b>12,5</b>	13	11	1	1
		14	3	1	2-3
		15	6	3	3-4
		16	27	1	2
<b>III</b>	<b>50</b>	17	34	1	2
		18	9	3	2
		19	7	3	2
		20	23	2	1
		21	24	1	2
		22	37	1	2
		23	26	3	2
		24	25	1	2
		25	32	2	2
		26	30	2	2
		27	29	1	1
		28	2	2	2
		29	31	1	3
		30	15	x	x
		31	36	3	3
		32	5	4	3

<sup>a</sup> pathologische Daten entsprechend aus Tabelle 3.1.

Tabelle 8.5: CD75s-I-Gangliosidexpression in HCC-Patienten.

Kategorie	rel. Anteil [%]	Rang	Patient	pT <sup>a</sup>	G <sup>a</sup>
<b>I</b>	<b>20,7</b>	1	6	3	3-4
		2	27	1	2
		3	7	3	2
		4	34	1	2
		5	28	1	1
		6	5	4	3
<b>II</b>	<b>13,8</b>	7	36	3	3
		8	3	1	2-3
		9	23	2	1
		10	4	3	2
<b>III</b>	<b>20,7</b>	11	31	1	3
		12	33	1	1
		14,5	14	2	1
		14,5	15	x	x
		14,5	17	x	x
<b>VI</b>	<b>44,8</b>	14,5	35	2	3
		17	10	3	x
		18	25	1	2
		19	8	3	3
		20	9	3	2
		21	2	2	2
		22	37	1	2
		23	30	2	2
		24	12	3	2
		25	11	1	1
		26	26	3	2
		27	32	2	2
		28	29	1	1
29	1	3	2-3		

<sup>a</sup> pathologische Daten entsprechend aus Tabelle 3.1.

Tabelle 8.6: Iso-CD75s-I-Gangliosidexpression in HCC-Patienten.

Kategorie	rel. Anteil [%]	Rang	Patient	pT <sup>a</sup>	G <sup>a</sup>
<b>I</b>	<b>10,3</b>	1	7	3	2
		2	34	1	2
		3	27	1	2
<b>II</b>	<b>31,0</b>	4	4	3	2
		5	3	1	2-3
		6	5	4	3
		7	36	3	3
		8	31	1	3
		9	8	3	3
		10	28	1	1
		11	17	x	x
		12	26	3	2
		<b>III</b>	<b>20,7</b>	13	35
14	14			2	1
15	10			3	x
16	33			1	1
17	23			2	1
18	6			3	3-4
<b>IV</b>	<b>37,9</b>	19	9	3	2
		20	12	3	2
		21	37	1	2
		22	25	1	2
		23	1	3	2-3
		24	15	x	x
		25	11	1	1
		26	2	2	2
		27	29	1	1
		28	30	2	2
		29	32	2	2

<sup>a</sup> pathologische Daten entsprechend aus Tabelle 3.1.

Tabelle 8.7: Neutrale Serum-GSL der Fraktion 2 detektiert mittels (+)nanoESI-QTOF-MS

<i>m/z</i> (exp.)	<i>m/z</i> (theoret.)	Strukturvorschlag <sup>a</sup>
636,37	636,37	Gb4Cer (d18:1, C16:0)*
691,43	691,42	Gb4Cer (d18:1, C24:1)*
722,57	722,55	GlcCer (d18:1, C16:0)
738,55	738,55	GlcCer (d18:1, h16:0)
778,61	778,62	GlcCer (d18:1, C20:0)
806,65	806,65	GlcCer (d18:1, C22:0)
820,65	820,66	GlcCer (d18:1, C23:0)
832,67	832,66	GlcCer (d18:1, C24:1)
834,67	834,68	GlcCer (d18:1, C24:0)
850,67	850,67	GlcCer (d18:1, h24:0)
856,59	856,58	LacCer (d18:1, C14:0)
870,59	870,59	LacCer (d18:1, C15:0)
882,59	882,59	LacCer (d18:1, C16:1)
884,59	884,61	LacCer (d18:1, C16:0)
900,59	900,60	LacCer (d18:1, h16:0)
912,63	912,64	LacCer (d18:1, C18:0)
966,69	966,69	LacCer (d18:1, C22:1)
968,69	968,70	LacCer (d18:1, C22:0)
992,71	992,70	LacCer (d18:1, C24:2)
994,73	994,72	LacCer (d18:1, C24:1)
1018,65	1018,63	Gb3Cer (d18:1, C14:0)
1044,65	1044,64	Gb3Cer (d18:1, C16:1)
1046,67	1046,66	Gb3Cer (d18:1, C16:0)
1072,69	1072,68	Gb3Cer (d18:1, C18:1)
1074,69	1074,69	Gb3Cer (d18:1, C18:0)
1102,73	1102,72	Gb3Cer (d18:1, C20:0)
1128,75	1128,74	Gb3Cer (d18:1, C22:1)
1130,75	1130,75	Gb3Cer (d18:1, C22:0)
1154,75	1154,75	Gb3Cer (d18:1, C24:2)
1156,77	1156,77	Gb3Cer (d18:1, C24:1)
1221,73	1221,71	Gb4Cer (d18:1, C14:0)
1247,75	1247,72	Gb4Cer (d18:1, C16:1)
1249,75	1249,74	Gb4Cer (d18:1, C16:0)
1277,79	1277,77	Gb4Cer (d18:1, C18:0)
1331,83	1331,82	Gb4Cer (d18:1, C22:1)
1333,83	1333,83	Gb4Cer (d18:1, C22:0)
1357,85	1357,83	Gb4Cer (d18:1, C24:2)
1359,85	1359,85	Gb4Cer (d18:1, C24:1)
1541,89	1541,85	Fuc <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> HexNAc (d18:1, C16:0) <sup>†</sup>
1557,91	1557,85	FucHex <sub>4</sub> HexNAc (d18:1, C16:0) <sup>†</sup>

<sup>a</sup> alle Ionen wurden als Natrium-Addukte des Typs  $[M+Na]^+$  detektiert, Gb4Cer auch als  $[M+2Na]^{2+}$  (mit „\*“ markiert); <sup>†</sup> GSL mit potenziellen H- oder Lewis-Blutgruppenantigenen (Kundu et al. 1985).

**Tabelle 8.8: Massenspektrometrisch nachgewiesene Serunganglioside und zugehörige Strukturvorschläge. Messungen wurden mit (-)nanoESI-QTOF-MS von der Serungangliosid-Fraktion 3 und nach DC-Overlay-Assay-Mehrfachfärbung mit (-)IR-MALDI-o-TOF MS (DC-MS) aufgenommen.**

Strukturvorschlag	Fettsäure	Berechnete monoisotopische Masse	ESI-QTOF*	DC-MS*
GM3	C14:1	1122,67	a	a
GM3	C14:0	1124,68	a	a
GM3	C16:1	1150,70	a	a
GM3	C16:0	1152,71	a	a,b
GM3	h16:0	1168,71	a	
GM3	C18:1	1178,73	a	a
GM3	C18:0	1180,74	a	a,b
GM3	C20:1	1206,76	a	
GM3	C20:0	1208,78	a	a
GM3	h20:0	1224,77		a
GM3	C22:1	1234,79	a	a
GM3	C22:0	1236,81	a	a
GM3	h22:0	1252,80		a
GM3	C23:1	1248,81	a	
GM3	C23:0	1250,82	a	
GM3	C24:2	1260,81	a	
GM3	C24:1	1262,82	a	a
GM3	h24:1	1278,82		a
GM3	C24:0	1264,84	a	
GM3	C25:1	1276,84	a	
GM3	C25:0	1278,85	a	
GM2	C14:0	1327,76		a
GM2	C16:1	1353,78		a
GM2	C16:0	1355,79		a
GM2	C17:0	1369,81		a
GM2	C18:1	1381,81	a	a
GM2	C18:0	1383,82	a	a
GM2	C19:0	1397,84		a
GM2	C20:0	1411,86		a
GM2	C21:0	1425,87		a
GM2	C22:1	1437,87		a
GM2	C22:0	1439,89		a
GM2	C24:1	1465,90		a
GD3	C16:0	1443,81	a	a,b
GD3	C18:1	1469,82		a
GD3	C18:0	1471,84	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C14:0	1489,81	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C15:0	1503,83		a
Neu5Ac-nLc4Cer	C16:1	1515,83	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C16:0	1517,85	a	a,b
Neu5Ac-nLc4Cer	C18:1	1543,86	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C18:0	1545,88	a	a,b
Neu5Ac-nLc4Cer	C20:1	1571,89	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C20:0	1573,91	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C21:0	1587,92		a
Neu5Ac-nLc4Cer	C22:1	1599,92	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C22:0	1601,94	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C23:1	1613,94		a

Fortsetzung von Tabelle 8.8

Strukturvorschlag	Fettsäure	Berechnete monoisotopische Masse	ESI-QTOF*	DC-MS*
Neu5Ac-nLc4Cer	C23:0	1615,95		a
Neu5Ac-nLc4Cer	C24:2	1625,94	a	a
Neu5Ac-nLc4Cer	C24:1	1627,95	a	a,b
Neu5Ac-nLc4Cer	C25:1	1641,97	a	a
GD1	C16:0	1808,94	a	a,b
GD1	C18:0	1836,97	a	a,b
GD1	C20:0	1865,00	a	a
Neu5Ac-nLc6Cer	C14:0	1880,96	a	a
Neu5Ac-nLc6Cer	C16:1	1882,98	a	a,b
Neu5Ac-nLc6Cer	C16:0	1911,01	a	a
Neu5Ac-nLc6Cer	C24:2	1967,07	a	a
Neu5Ac-nLc6Cer	C24:1	1993,09	a	a,b
Neu5Ac-Fuc-nLc6Cer	C16:0	2029,04	a	a
GT1	C16:0	2100,04	a	b,c
GT1	C18:0	2128,07	a	b,c
GT1	C20:0	2156,10	a	b,c
GT1	C22:0	2184,13		b
GT1	C23:0	2198,15		b
GT1	C24:2	2208,13		b
GT1	C24:1	2210,15		b
GT1	C25:1	2224,16		b
Neu5Ac-nLc8Cer	C16:0	2248,11	a	a,b
Neu5Ac-nLc8Cer	C24:1	2358,22		a
Neu5Ac-Fuc-nLc8Cer	C16:0	2394,17	a	a,b
Neu5Ac-Fuc <sub>2</sub> -nLc8Cer	C16:0	2540,23	a	a
Neu5Ac-nLc10Cer	C16:0	2613,24	a	a
Neu5Ac-Fuc-nLc10Cer	C16:0	2759,30	a	a,b
Neu5Ac-Fuc <sub>2</sub> -nLc10Cer	C16:0	2905,36	a	a
Neu5Ac-nLc12Cer	C16:0	2978,37	a	
Neu5Ac-Fuc-nLc12Cer	C16:0	3124,43	a	a
Neu5Ac-Fuc <sub>2</sub> -nLc12Cer	C16:0	3270,49	a	a
Neu5Ac-Fuc <sub>3</sub> -nLc12Cer	C16:0	3416,55	a	a

\* Typ der detektierten Gangliosidionen: a,  $[M-H]^-$ ; b,  $[M+Na-2H]^-$ ; c,  $[M+2Na-3H]^-$ .

**Tabelle 8.9: Zuordnung von Molekülstrukturen zu Signalen der Overlay-Assay-Mehrfachfärbung von humanen Granulozyten Gangliosiden (vgl. Abbildung 4.26).**

Signal Overlay-Assay	Strukturvorschlag	$m/z$ (DC-MS) <sup>a,b</sup>	$m/z$ (theoret.) <sup>a</sup>
CD15s-1	?	-	-
CD15s-2	?	-	-
CD15s-3	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-V <sup>3</sup> Fuc-nLc6 (d18:1, C22:0)	2112,17	2112,12
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-V <sup>3</sup> Fuc-nLc6 (d18:1, C24:1)	2138,14	2138,14
CD15s-4	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-V <sup>3</sup> Fuc-nLc6 (d18:1, C16:0)	2028,06	2028,03
CD15s-5	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-VII <sup>3</sup> Fuc-nLc8 (d18:1, C22:0)	2477,28	2477,25
	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-VII <sup>3</sup> Fuc-nLc8 (d18:1, C24:1)	2503,30	2503,27
CD15s-6	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-VII <sup>3</sup> Fuc-nLc8 (d18:1, C16:0)	2393,17	2393,16
	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-VII <sup>3</sup> Fuc-Fuc-nLc8 (d18:1, C24:1)	2649,34	2649,33
CD15s-7	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-VII <sup>3</sup> Fuc-Fuc -nLc8 (d18:1, C16:0)	2539,25	2539,22
CD15s-8	X <sup>3</sup> Neu5Ac-IX <sup>3</sup> Fuc-nLc10 (d18:1, C16:0)	2758,32	2758,29
	X <sup>3</sup> Neu5Ac-IX <sup>3</sup> Fuc-Fuc -nLc10 (d18:1, C24:1)	3014,50	3014,46
CD15s-9	X <sup>3</sup> Neu5Ac-IX <sup>3</sup> Fuc-Fuc -nLc10 (d18:1, C16:0)	2904,35	2904,35
CD15s-10	X <sup>3</sup> Neu5Ac-IX <sup>3</sup> Fuc-Fuc <sub>2</sub> -nLc10 (d18:1, C16:0)	3050,46	3050,41
CD15s-11	XII <sup>3</sup> Neu5Ac-XI <sup>3</sup> Fuc-Fuc -nLc12 (d18:1, C16:0)	3269,59	3269,48
	XII <sup>3</sup> Neu5Ac-XI <sup>3</sup> Fuc-Fuc <sub>2</sub> -nLc12 (d18:1, C24:1)	3525,84	3525,65
	XII <sup>3</sup> Neu5Ac-XI <sup>3</sup> Fuc-Fuc <sub>2</sub> -nLc12 (d18:1, C16:0)	3415,74	3415,54
CD75s-1	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C22:0)	1600,97	1600,93
	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C24:1)	1626,97	1626,95
CD75s-2	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C16:0)	1516,86	1516,84
	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C18:0)	1544,90	1544,87
CD75s-3	VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6 (d18:1, C22:0)	1966,09	1966,06
	VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6 (d18:1, C24:1)	1992,10	1992,08
CD75s-4	VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6 (d18:1, C16:0)	1882,00	1881,97
iso-CD75s-1	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C22:0)	1600,96	1600,93
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C24:1)	1624,98	1624,93
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C24:0)	1626,97	1626,95
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C16:0)	1516,87	1516,84
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4 (d18:1, C18:0)	1544,90	1544,87
iso-CD75s-2	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6 (d18:1, C22:0)	1966,08	1966,06
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6 (d18:1, C24:1)	1992,10	1992,08
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6 (d18:1, C16:0)	1882,00	1881,97
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6 (d18:1, C17:0)	1896,01	1895,99
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6 (d18:1, C18:0)	1910,03	1910,00
iso-CD75s-3	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc8 (d18:1, C22:0)	2331,22	2331,20
	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc8 (d18:1, C24:1)	2357,24	2357,21
iso-CD75s-4	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc8 (d18:1, C16:0)	2247,12	2247,10
	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc8 (d18:1, C24:1)	2503,29	2503,27
iso-CD75s-5	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc8 (d18:1, C16:0)	2393,20	2393,16
	VIII <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc8 (d18:1, C18:0)	2421,24	2421,19
iso-CD75s-6	?	-	-
iso-CD75s-7	X <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc10 (d18:1, C16:0)	2612,26	2612,23
	X <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc10 (d18:1, C24:1)	2868,43	2868,40



Fortsetzung von Tabelle 8.9

<b>Signal Overlay-Assay</b>	<b>Strukturvorschlag</b>	<b><i>m/z</i> (DC-MS)<sup>a,b</sup></b>	<b><i>m/z</i> (theoret.)<sup>a</sup></b>
iso-CD75s-8	X <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc10 (d18:1, C16:0)	2758,36	2758,29
	X <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc <sub>2</sub> -nLc10 (d18:1, C24:1)	3014,48	3014,46
iso-CD75s-9	X <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc <sub>2</sub> -nLc10 (d18:1, C16:0)	2904,38	2904,35
	X <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc <sub>3</sub> -nLc10 (d18:1, C24:1)	3160,52	3160,52
iso-CD75s-10	XII <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc-nLc12 (d18:1, C16:0)	3123,40	3123,42
	XII <sup>3</sup> Neu5Ac-Fuc <sub>2</sub> -nLc12 (d18:1, C24:1)	3379,78	3379,59

<sup>a</sup> monoisotopische *m/z* von  $[M-H]^-$  Ionen; <sup>b</sup> Signale aus (-)DC-IR-MADLI Massenspektren.

### 8.3 Abkürungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AP	alkalischer Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CA	<i>cancer antigen</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
Cer	Ceramid
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
CMF-PBS	<i>Calcium Magnesium Free Phosphat- Buffered Saline</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DRM	<i>detergent resistant membranes</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Er:YAG-Laser	Erbium-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
ERCP	Endoskopische, retrograde Cholangio-Pankretikographie
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
Fuc	Gukose
G	Differenzierungsgrad
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N-Acetylgalaktosamin</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gb	Globo-Serie
GEM	<i>glycolipid enriched membranes</i>
Gg	Ganglio-Serie
Glc	Glukose

GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
GLYFDIS	<i>Glycans in Body Fluids - Potential for Disease Diagnostics</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSL	Glykosphingolipid
H0	Nullhypothese
H1	Alternativhypothese
HCC	Hepatozelluläre Karzinome ( <i>hepatocellular carcinoma</i> )
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUS	hämolytisch-uremischen Syndrom
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IgY	Immunglobulin Y
IL	Interleukin
IMPB	Institut für Medizinische Physik und Biophysik
IR	Infrarot
IR-MALDI-o-TOF-MS	<i>infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry</i>
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
KWH	Kruskall-Wallis-H-Test
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllaktosamin
Lc	Lakto-Serie
LC	<i>liquid chromatography</i>
LM	Laufmittel (bei der Dünnschichtchromatographie)
LPC	lyso-Phosphatidylcholin
MAA	<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin I
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
ML	Mistellektin
MS	Massenspektrometrie
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
nanoESI-QTOF-MS	<i>nanoelectrospray ionization quadrupol time-of-flight mass spectrometry</i>
NASMP	Naphthol-AS-MX-Phosphat
NASTRP	Naphthol-AS-TR-Phosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumsaz
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
nGSL	neutrale Glykosphingolipide
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen

nLc	Neolakto-Serie
NRQ	Normalisierte, relative Quantitäten
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
PI	Phosphatidylinositol
PLC	Phospholipase C
pM	Fernmetastasen-Status
pN	Regionaler Lymphknoten-Status
pT	Primärtumor-Status
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RIP-2	Ribosomen-inaktivierende Proteine vom Typs 2
RNA	Ribonukleinsäure
RPL13A	ribosomales Protein L13a
rRNA	ribosomale RNA
sLea	Sialyl-Lewis-a
sLex	Sialyl-Lewis-x
SM	Sphingomyelin
SPE	<i>solid phase extraction</i>
ST3GAL6	$\beta$ -Galaktosid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase 6
ST6GAL1	$\beta$ -Galaktosid $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase 1
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPA	<i>tissue polypeptide antigen</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
VAA	<i>Viscum album</i> Agglutinin
Visalb-CBA	<i>Viscum album chitin-binding agglutinin</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
$\tau$	Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall

## 8.4 Curriculum Vitae

### **Persönliche Daten**

---

Name	Jamal Souady
Geburtsdatum	30.06.1981 in Siegburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

### **Schulische Ausbildung**

---

08/1987 – 07/1991	Paul-Gerhard Schule Bonn
08/1991 – 05/2000	Friedrich-Ebert-Gymnasium Bonn <ul style="list-style-type: none"> <li>• Abschluss: Abitur (31.05.2000)</li> </ul>

### **Wehrdienst**

---

11/2000-09/2001	Grundausbildung und Sanitätslehrgang 1 im SanAusbildungszentrum Süd Feldkirchen Einsatz im Bundeswehrsanzitätszentrum Bundesverteidigungsministerium Bonn
-----------------	--

### **Studium**

---

10/2001- 05/2006	Studium der Molekularen Biotechnologie an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld <ul style="list-style-type: none"> <li>• Abschluss: Diplom mit Auszeichnung (30.5.2006)</li> </ul>
seit 06/2006	Promotionsstudium am Institut für Medizinische Physik und Biophysik des Universitätsklinikums Münster zum Thema: „Glykokonjugate in Tumoren des Gastrointestinaltrakts“ Betreuer: Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinić, Prof. Dr. Johannes Müthing

### **Beruflicher Werdegang**

---

03/2004 – 06/2004	Studentische Hilfskraft im Arbeitskreis für Fermentationstechnik, Technische Fakultät der Universität Bielefeld
seit 06/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizinische Physik und Biophysik des Universitätsklinikums Münster

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet habe und von mir keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

---

Dipl.-Biotech. Jamal Souady

Gedruckt auf altersbeständigem Papier °° ISO 9706