

Tumorassoziierte Glykosphingolipide in Nieren- und Pankreaskarzinomen: Zielstrukturen für Adjuvanztherapien mit Lektinen

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

vorgelegte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biotech. Marcel Hülsewig

Januar 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Müthing

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Noll

Vorbemerkung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine externe Dissertation der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld. Sie wurde in der Zeit vom 01. Januar 2006 bis 25. Dezember 2010 in der Abteilung Biomedizinische Analytik, Leitung Frau Prof. Dr. rer. nat. J. Peter-Katalinić, am Institut für Medizinische Physik und Biophysik und am Institut für Hygiene, Leitung Herr Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. vet. h. c. H. Karch, der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Müthing angefertigt. Die Finanzierung erfolgte durch die Deutsche Krebshilfe (Projekte: DKH 106742 und 108502).

Danksagungen

Ich möchte an dieser Stelle herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Einzelnen gilt mein besonderer Dank folgenden Personen:

Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić und Prof. Dr. Dr. H. Karch danke ich sehr für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Physik und Biophysik und am Institut für Hygiene der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. J. Müthing gilt mein ganz besonderer Dank. Als Betreuer und Gutachter stand er mir während der gesamten Arbeit unterstützend zur Seite. Ohne seine fachliche Beratung und nicht zuletzt die Bereitstellung der immunchemischen Arbeitsmaterialien wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Herrn PD Dr. med. C. Wülfing, Herrn Dr. med. S. Bierer und Herrn Prof. Dr. med. L. Hertle aus der Klinik und Poliklinik für Urologie gilt mein Dank für die Bereitstellung des Nierenkarzinomgewebes sowie den jeweiligen Kontrollproben.

Herrn Prof. Dr. med. J. Haier, Leiter des molekularbiologischen Labors der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, danke ich für die Überlassung der Pankreaskarzinomzelllinien.

Bei Herrn PD Dr. med. A. W. Friedrich und bei Frau PD Dr. med. M. Bielazewska möchte ich mich für die Bereitstellung des Shiga Toxin 1 bedanken.

Den Herren Dr. M. Mormann, PD Dr. G. Pohlentz und PD Dr. K. Dreisewerd möchte ich vielmals für die Einweisung in das komplexe Gebiet der Massenspektrometrie danken. In diesem Sinne danke ich auch Dipl.-Phys. J. Soltwisch, der stets zur Stelle war, wenn das o-TOF mal wieder nicht so wollte, wie es sollte.

Frau Dipl.-Biotech. P. Hoffmann, Frau Dipl.-Biotech. W. Storck und Herrn Dipl.-Biotech. A. Bauwens möchte ich sehr für ihre Unterstützung bei der Zellkulturtechnik danken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Biomedizinische Analytik und der Abteilung Lasermassenspektrometrie des Instituts für Medizinische Physik und Biophysik sowie des gesamten Instituts für Hygiene danke ich für das fantastische Arbeitsklima, die stets freundliche Atmosphäre und jegliche Unterstützung, die ich erhalten habe.

Mein herzlichster Dank gilt Ute, Petra, Henning, Stephan und Matthias den besten Korrekturlesern der Welt.

Außerdem möchte ich noch Wiebke, Tabea, Josephine, Kristina, Alex, Jamal und Jens für die mentale Unterstützung und den Spaß während der gesamten Zeit danken.

Meinen beiden Mitstreitern Ute und Henning, die zeitgleich mit mir begonnen haben, weiß ich gar nicht, wie ich danken soll. Jetzt ist wohl leider doch der Zeitpunkt gekommen, an dem sich unsere Wege trennen...

Meiner Familie und meinen Freunden gilt mein ganz besonderer Dank, da sie mir auch in schwierigen Zeiten stets zur Seite standen und mir Rückhalt und Zuversicht für die Zukunft gegeben haben.

Zu guter Letzt danke ich meinem Freund und Lebenspartner Matthias, der mir jederzeit zur Seite stand und mir stets Kraft und neuen Mut zum Weitermachen gab.

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit sind wie folgt vorab publiziert worden:

Publikationen

Distler, U; Hülsewig, M; Souady, J; Dreisewerd, K; Haier, J; Senninger, N; Friedrich, A W; Karch, H; Hillenkamp, F; Berkenkamp, S; Peter-Katalinić, J; Müthing, J: *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* In: *Anal Chem* 80 (2008), Mär, Nr. 6, 1835-1846.

Distler, U; Souady, J; Hülsewig, M; Drmić-Hofman, I; Haier, J; Denz, A; Grützmann, R; Pilarsky, C; Senninger, N; Dreisewerd, K; Berkenkamp, S; Schmidt, M A; Peter-Katalinić, J; Müthing, J: *Tumor-associated CD75s- and iso-CD75s-gangliosides are potential targets for adjuvant therapy in pancreatic cancer* In: *Mol Cancer Ther* 8 (2008), Aug, Nr. 7, 2464-2475.

Distler, U; Souady, J; Hülsewig, M; Drmić-Hofman, I; Haier, J; Friedrich, A W; Karch, H; Senninger, N; Dreisewerd, K; Berkenkamp, S; Schmidt, M A; Peter-Katalinić, J; Müthing, J: *Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer*. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 8, e6813.

Hoffmann, P; Hülsewig, M; Duvar, S; Ziehr, H; Mormann, M; Peter-Katalinić, J; Friedrich, A.W.; Karch, H; Müthing, J: *On the structural diversity of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in lymphoid and myeloid cells determined by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry*. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (2010), Nr. 15, 2295-2304.

Hülsewig, M; Dreisewerd, K; Henning, S; Berkenkamp S; Wülfing C; Bierer S; Hertle S; Peter-Katalinić J; and Müthing: *Identification and structural characterization of tumor associated glycosphingolipids in human kidney cancers by combined thin-layer chromatography immunostaining and mass spectrometry* (Manuscript ready for publication)

Hülsewig, M; Dreisewerd, K; Peter-Katalinić, J; Müthing, J; *AMD-HPTLC-IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry of long chain CD15-glycosphingolipids*. (Manuscript ready for publication)

Veröffentliche Abstracts

Hülsewig, M; Schweppe, C H; Friedrich, A W; Karch, H; Dreisewerd, K; Peter-Katalinić, J; Müthing, J: *Variable lipoprotein association and content of Shiga toxin glycosphingolipid ligands in human blood*. In: *Int. J. Med. Microbiol.*, Nr. 298, 7, 2008

Hoffmann, P; Hülsewig, M; Duvar, S; Ziehr, H; Dreisewerd, K; Peter-Katalinić, J; Schmidt, M A; Karch, H; Müthing, J: *Human leukocyte-derived cell lines differ in their expression of Shiga toxin receptors*. In: *Int. J. Med. Microbiol.*, Nr. 298, S45, p.74, 2008

Tagungsbeiträge

Hülsewig, M; Dreisewerd, K; Henning, S; Berkenkamp S; Wülfing C; Bierer S; Hertle S; Peter-Katalinić J; Müthing J: *Identification and structural characterization of tumor associated glycosphingolipids in human kidney cancers by combined thin-layer chromatography immunostaining and mass spectrometry*. 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Mainz, 2006

Hülsewig, M; Dreisewerd, K; Berkenkamp, S; Peter-Katalinić, J; Müthing, J: *Automated Multiple Development (AMD) and analysis of CD15 glycosphingolipids from high-performance thin-layer chromatography plates by infrared matrix assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry*. International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, Berlin, 09. - 11.10.2006

Ausgezeichnet mit dem Posterpreis des wissenschaftlichen Komitees

Hülsewig, M; Dreisewerd, K; Berkenkamp, S; Peter-Katalinić, J; Müthing, J: *IR-MALDI-o-TOF-MS coupled with automated multiple development high-performance*

thin-layer chromatography affords structural characterization of long chain CD15 glycosphingolipids 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Bremen, 2007

Distler, U; Souady, J; Hülsewig, M; Dreisewerd, K; Berkenkamp, S; Peter-Katalinć, J; Müthing, J: *HPTLC immunostaining coupled with IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry for the high sensitivity structural detection and characterization of glycosphingolipids* 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Bremen, 2007

Distler, U; Souady, J; Hülsewig, M; Dreisewerd, K; Berkenkamp, S; Peter-Katalinć, J; Müthing, J: *HPTLC immunostaining coupled with IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry for the high sensitivity structural detection and characterization of glycosphingolipids* 2nd Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, Dubrovnik, Kroatien, 2007

Hülsewig, M; Schweppe, C H; Friedrich, A W; Karch, H; Dreisewerd, K; Peter-Katalinć, J; Müthing, J: *Variable lipoprotein association and content of Shiga toxin glycosphingolipid ligands in human blood* 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden, 21. - 24.09.2008

Hoffmann, P; Hülsewig, M; Duvar, S; Ziehr, H; Dreisewerd, K; Peter-Katalinć, J; Schmidt, M A; Karch, H; Müthing, J: *Characterization of Shiga toxin receptors in human leukocyte-derived cell lines by TLC-IR-MALDI mass spectrometry*. 1. Summer School of GRK1409, Münster, 04. - 06.06.2008

Schweppe, C H; Hülsewig, M; Betz, J; Friedrich, A W; Müthing, J; Karch, H: *Shiga toxin ligands in human endothelial cells and plasma*. Symposium Mikrobielle Pathogenität, Bad Urach, 2008

Hoffmann, P; Hülsewig, M; Duvar, S; Ziehr, H; Dreisewerd, K; Peter-Katalinć, J; Schmidt, M A; Karch, H; Müthing, J: *Human leukocyte-derived cell lines differ in their expression of Shiga toxin receptors*. 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Dresden, 21. - 24.09.2008

Hülsewig, M; Dreisewerd, K; Berkenkamp, S; Peter-Katalinć, J; Müthing, J: *Analyzing long-chain CD15-glycosphingolipids by combining automated multiple development*

chromatography with direct infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry 19th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“ (GBM), the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“ , the „Belgian Working Group for Glycosciences“ , and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“ Wageningen, Niederlande, 30.11. - 02.12.2008

Hoffmann, P; Hülsewig, M; Duvar, S; Ziehr, H; Dreisewerd, K; Peter-Katalinić, J; Schmidt, M A; Karch, H; Müthing, J: *TLC-IR-MALDI mass spectrometry analysis of Shiga toxin receptors in human lymphoid and myeloid cell lines.* 19th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“ (GBM), the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“ , the „Belgian Working Group for Glycosciences“ , and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“ Wageningen, Niederlande, 30.11. - 02.12.2008

Schwepe, C H; Hülsewig, M; Friedrich, A W; Karch, H; Dreisewerd, K; Nofer, J - R; Peter-Katalinić, J; Müthing, J: *Variable lipoprotein association and content of Shiga toxin glycosphingolipid ligands in human blood.* 19th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“ (GBM), the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“ , the „Belgian Working Group for Glycosciences“ , and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“ Wageningen, Niederlande, 30.11. - 02.12.2008

Dreisewerd, K; Distler, U; Rohlfing, A; Souady, J; Hülsewig, M; Pohlentz, G; Peter-Katalinić, J; Berkenkamp, S; Müthing, J: *Coupling of HPTLC, immunostaining, and IR-MALDI-o-TOF MS for identification of glyco- and phospholipids directly from the TLC plate* Sanibel Conference on Mass Spectrometry - Lipidomics and Lipids in Mass Spectrometry, St. Petersburg, FL, USA, 2009

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.* Sanibel Conference on Mass Spectrometry - Lipidomics and Lipids in Mass Spectrometry, St. Petersburg, FL, USA, 2009

Abkürzungsverzeichnis

<i>et al.</i>	lat. <i>et aliis</i> , und Andere
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
A	engl. <i>active</i> , Lektinuntereinheit A
AK	Antikörper
AMD	engl. <i>Automated Multiple Development</i> , Automatisierte Mehrfachchromatographie
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B	engl. <i>binding</i> , Lektinuntereinheit B
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i> , Differenzierungsmarker
Cer	Ceramid
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CMF-PBS	engl. <i>Calcium- and Magnesium-free Phosphate Buffered Saline</i> , calcium- und magnesiumfreie, phophatgepufferte Salinelösung
d.h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
Dipl. Biotech. ..	Diplom Biotechnologe
DNA	engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
Dr. rer. nat.	lat. <i>Doktor rerum naturalium</i> , Doktor der Naturwissenschaft
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	engl. <i>Electrospray Ionization</i> , Elektrospray Ionisation
etc.	lat. <i>et cetera</i> , und so weiter
Fc	engl. <i>Fragment cristalline</i>
Fuc	engl. <i>Fucose</i> , Fukose
Fuc-GM1	II ³ Neu5Ac(II ⁴ Fuc)-Gg3Cer

Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
Gb	Globo
Gb3	Globotriaosyl
Gb3Cer	Globotriaosylceramid
Gb4Cer	Globotetraosylceramid
GD2	II ³ (Neu5Ac) ₂ -Gg3Cer, Disialogangliotriosylceramid
GD3	II ³ (Neu5Ac) ₂ -Gg4Cer, Disialogangliotetraosylceramid
Gg	Ganglio
Glc	engl. <i>Glucose</i> , Glukose
GlcNAc	engl. <i>N</i> -Acetylglucosamin, <i>N</i> -Acetylglukosamin
GM-CSF	engl. <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GM1	II ³ Neu5Ac-Gg4Cer, Monosialogangliotetraosylceramid
GM2	II ³ Neu5Ac-Gg3Cer, Monosialogangliotriosylceramid
griech.	griechisch
GSL	Glykosphingolipid
GT1b	IV ³ Neu5Ac,II ³ (Neu5Ac) ₂ -Gg4Cer, Trisialogangliotetraosylceramid
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Dihydrogensulfat (Schwefelsäure)
HBMEC	engl. <i>Human Brain Microvascular Endothelial Cells</i> , Humane, mikrovaskuläre Hirnendothelzellen
HCl	Salzsäure
HGG	Humane Granulozyten Ganglioside
HPLC	engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPTLC	engl. <i>High-Performance Thin-Layer Chromatography</i> , Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IF	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	Infrarot
IUPAC-IUB	engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat

KOH	Kaliumhydroxid
lat.	lateinisch
Lc	engl. <i>Lacto</i> , Lakto
Lc2Cer	Gal β 1-4Glc β 1-1Cer; engl. <i>Lactosylceramide</i> , Laktosylceramid
LM	Laufmittel
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	engl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> , Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Monohexosylceramid
ML-I	Mistellektin I
MLA	Mistellektin A-Untereinheit
MLB	Mistellektin B-Untereinheit
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrometrie
mTOR	engl. <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NeAc/Neu5Ac	..	engl. <i>N-Acetyl Neuraminic Acid</i> , <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	engl. <i>N-Glycolyl Neuraminic Acid</i> , <i>N</i> -Glykolyneuraminsäure
nLc	engl. <i>neolacto</i> , Neolakto
NZK	Nierenzellkarzinom oder Natürliche Killerzelle
o-TOF	engl. <i>orthogonal-Time-of-Flight</i> , orthogonal-Flugrohr
P ₂ O ₅	Diphosphopentoxid
pAK	polyklonaler Antikörper
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PDGF	engl. <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PNA	engl. <i>Peanut Agglutinin</i> , Agglutinin der Erdnuss
Q-TOF	engl. <i>Quadrupol-Time-of-Flight</i> , Quadropol-Flugzeit
RAF	engl. <i>Rapidly Growing Fibrosarcoma</i>
RIP	Ribosom inaktivierendes Protein
RNA	engl. <i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA

RT	Reverse Transkription, Reverse Transkriptase
SDR	Schraubdeckelröhrchen
STEC	Shiga Toxin produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shiga Toxin
TLC	engl. <i>Thin-Layer Chromatography</i> , Dünnschichtchromatographie
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor, Nodices, Metastasen
u.	und
u.a.	und Andere
UDP-Gal	Uridindiphosphatgalaktose
UDP-GalNAc	Uridindiphosphatglukosamin
UICC	<i>Union Internationale contre le Cancer</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VAA-I	<i>Viscum Album</i> Agglutinin-I
VEGF	engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VisalbcBA	<i>Viscum album</i> chitinbindendes Agglutinin
VTEC	Verotoxin produzierende <i>Escherichia coli</i>
WHO	engl. <i>World Health Organization</i> , Welgesundheitsorganisation
WST-1	engl. <i>Water-soluble Tetrazolium</i> , Wasserlösliches Tetrazoium
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	15
2 Theorie	16
2.1 Lektine und Toxine	16
2.1.1 Mistellektin I	17
2.1.2 Shiga Toxin	19
2.2 Glykosphingolipide	21
2.2.1 Struktur und Biosynthese	21
2.2.2 Funktionen	24
2.3 Glykosphingolipidanalytik	25
2.3.1 Dünnschichtchromatographie	25
2.3.2 Automatisierte Mehrfachchromatographie	26
2.3.3 Immundetektion	27
2.4 Nierentumoren	27
2.4.1 Anatomie und Physiologie	27
2.4.2 Karzinome	29
2.4.3 Klassifikation und stadienabhängige Prognose	30
2.5 Pankreaskarzinomzelllinien	33
2.6 Massenspektrometrie	34
2.6.1 NanoESI Q-TOF-MS	34
2.6.2 MALDI-TOF-MS	36
3 Zielsetzung	38
4 Material und Methoden	39
4.1 Glykosphingolipidanalytik	39
4.1.1 Vorbereitung	39
4.1.2 Glykosphingolipidextraktion aus Gewebe	39
4.1.3 Alkalische Hydrolyse	40

4.1.4	Dialyse gegen deionisiertes Wasser	40
4.1.5	Dünnschichtchromatographie	40
4.1.6	Automatisierte Mehrfachchromatographie	42
4.1.7	Orcinolfärbung	42
4.1.8	Immundetektion	43
4.1.9	Antikörper:	45
4.2	Massenspektrometrie	46
4.2.1	Extraktion der Glykosphingolipide aus dem Kieselgel	46
4.2.2	NanoESI Q-TOF-MS	46
4.2.3	IR-MALDI-o-TOF-MS	47
4.3	Zellkulturtechnik	49
4.3.1	Zelllinien	49
4.3.2	Zellkultivierung	50
4.3.2.1	Kulturmedium	51
4.3.2.2	Kultursystem	51
4.3.2.3	Auftauen von kryokonservierten Zellen	52
4.3.2.4	Passagieren	52
4.3.2.5	Kryokonservierung	53
4.3.3	Proliferationsassay mit WST-1	54
4.3.4	Immunfluoreszenzmikroskopie	54
4.4	Tumordaten	56
5	Ergebnisse	58
5.1	GSL-Expressionsanalyse in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsge- weben	58
5.1.1	Expressionsanalyse von Gangliosiden	59
5.1.1.1	CD75s-Ganglioside	59
5.1.1.2	iso-CD75s-Ganglioside	62
5.1.2	Expressionanalyse von neutralen GSL der Neolaktoserie	64
5.1.3	Expressionsanalyse von neutralen GSL der Globoserie	67
5.1.3.1	Antikörper-vermittelter Nachweis von Gb3Cer	67
5.1.3.2	Antikörper-vermittelter Nachweis von Gb4Cer	70
5.1.3.3	Stx-vermittelter Nachweis von Gb3Cer	72
5.2	MS der immundetektieren GSL in Nierenkarzinomen	75
5.2.1	MS von CD75s-1- und iso-CD75s-1-Gangliosiden	75
5.2.1.1	DC-IR-MALDI-o-TOF MS von CD75s-1-Gangliosiden	76
5.2.1.2	DC-IR-MALDI-o-TOF MS von iso-CD75s-GSL	78

5.2.2	DC-IR-MALDI-o-TOF MS von nLc4Cer	80
5.2.3	NanoESI Q-TOF MS von Gb3Cer	81
5.3	Immunfluoreszenzmikroskopie von CD75s-Gangliosiden in Niernkarzinomen	85
5.4	Statistische Auswertung	86
5.4.1	CD75s-1, iso-CD75s-1 und nLc4Cer	86
5.4.2	Gb3Cer und Gb4Cer	89
5.5	Tumorassoziierte Glykosphingolipide in Pankreaskarzinomzelllinien	91
5.5.1	Proliferationsassay mit WST-1	91
5.5.2	Immunfluoreszenzmikroskopie	97
5.6	Automatisierte Mehrfachchromatographie von langkettigen neutralen GSL	105
5.6.1	DC und Immundetektion	105
5.6.2	Massenspektrometrische Charakterisierung von langkettigen GSL .	107
6	Diskussion	114
6.1	Tumorassoziierte GSL: Zielstrukturen für Adjuvanttherapien	114
6.1.1	Expressionsanalyse von CD75s, iso-CD75s und nLc4Cer in humanen Nierenkarzinomen	115
6.1.2	Expressionsanalyse von Gb3Cer und Gb4Cer in humanen Nierenkar- zinomen	119
6.1.3	CD75s-Expressionsanalyse in Pankreaskarzinomzelllinien	121
6.2	Automatisierte Mehrfachchromatographie von langkettigen GSL-Spezies . .	124
7	Zusammenfassung	126
7.1	Zusammenfassung	126
8	Literaturverzeichnis	129
9	Abbildungsverzeichnis	148
10	Tabellenverzeichnis	150
11	Anhänge	151
11.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien:	151
11.2	Geräte:	153
11.3	Software:	154
12	Lebenslauf	155

1 Einleitung

Krebs ist die häufigste Todesursache der Welt. Im Jahr 2007 starben gemäß Schätzungen der WHO (engl. *World Health Organization*, Weltgesundheitsorganisation) weltweit ca. 7,9 Millionen Menschen an dieser Krankheit, was etwa 13% aller Todesfälle entspricht [WHO (2008)]. Bis 2030 wird sich diese Zahl nach weiteren Schätzungen auf 12 Millionen Todesopfer erhöhen. Allerdings zeigt die Studie von Danaei *et al.* aus dem Jahr 2005, dass 30% durch die Veränderung oder Vermeidung von Schlüsselfaktoren, wie z.B. Rauchen, Alkohol, Ernährung und Sport, leicht verhindert werden könnten [Danaei u. a. (2005)].

Tumoren sind Neubildungen von Körpergewebe, was als Neoplasie bezeichnet wird. Sie können entweder einen gutartigen (benignen) oder bösartigen (malignen) Verlauf nehmen. Benigne Tumoren bleiben in der Regel auf ein Gewebe oder Organ begrenzt, während maligne Tumoren hingegen benachbarte Strukturen infiltrieren und auch in weiter entfernte Regionen des Körpers streuen. Dies geschieht durch Infiltration des Blut- oder Lymphsystems und das folgende Ausbilden von Metastasen [Weinberg (2007)]. Krebs ist per Definition die Bezeichnung für den bösartigen Verlauf.

Die Zelloberflächen von Tumorzellen sind oft durch eine erhöhte Expression von bestimmten Membrankomponenten charakterisiert. Meist sind dies Membran-inserierte Glykoproteine und/oder Glykosphingolipide (GSL), die z. B. bei der Zell-Zell-Interaktion eine wichtige Rolle spielen. Lassen sich diese Strukturen vermehrt auf Tumorzellen finden, so werden sie als „Tumorassoziiert“ bezeichnet und stellen vielversprechende Kandidaten dar, um als potentielle Zielstrukturen für onkologische Applikationen zu fungieren. Zytotoxische Lektine, Antikörper oder andere Toxine könnten zur Eliminierung von Tumorzellen eingesetzt werden. Allerdings weisen die Tumoren nicht von allen Patienten ein und desgleichen Tumortyps das gleiche Expressionsmuster auf, wodurch die Individualtherapie immer mehr in den Vordergrund rückt. In dieser Arbeit wurde zum Einen die Expression von Glykosphingolipiden, die von therapeutischem Interesse sind, bei Nierentumoren analysiert und zum Anderen die Wirkung eines gegen bestimmte GSL gerichteten Therapeutikums auf Pankreaskarzinomzelllinien untersucht.

2 Theorie

2.1 Lektine und Toxine

Lektine sind zuckerbindende Proteine mit der Eigenschaft, Zellen zu agglutinieren und/oder Glykokonjugate zu präzipitieren. Ursprünglich wurden sie aus Pflanzenextrakten isoliert und zur Agglutination von Erythrozyten eingesetzt. Daher sprach man zunächst von Phytohämagglutininen. Später stellte sich allerdings heraus, dass sie auch aus tierischen Organen gewonnen werden können und keineswegs alle an Erythrozyten binden. Aufgrund dessen wurde der Begriff Lektin von lat. „*legere*“ was „auswählen“ bedeutet, eingeführt [Boyd u. Shapleigh (1954)].

Lektine besitzen mindestens zwei Bindestellen, denn sonst wäre eine Agglutinationswirkung nicht möglich. Ihre Spezifität wird durch jedes Mono- oder Oligosaccharid bestimmt, das ihr Agglutinationsvermögen kompetitiv hemmt. Beispielsweise bindet ein der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) entstammendes Lektin, das PNA (engl. *Peanut Agglutinin*), bevorzugt an β -D-Galaktose. Man findet jedoch deutliche Unterschiede in den Bindungsvermögen der Lektine zu bestimmten Zellen oder Glykoproteinen. Lektinbindende Moleküle werden aufgrund ihrer strukturellen Komplexität üblicherweise als Lektinrezeptoren bezeichnet. Lektine sind in den letzten Jahrzehnten vermehrt in der medizinischen Grundlagenforschung zu finden. Eine Eignung hat sich z.B. für die Charakterisierung von bestimmten Zelltypen oder Fragmenten oder für die Kenntlichmachung von Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder zur Markierung von normalen Zellen gegenüber Tumorzellen ergeben [Gatehouse u. a. (1995)].

In erster Hinsicht könnte eine Verwandtschaft mit Antikörpern vermutet werden. Allerdings gibt es einige Unterschiede zwischen Lektinen und Antikörpern. Während die Antikörpersynthese induziert werden kann, besteht diese Möglichkeit bei Lektinen nicht. Lektine haben zudem ein beschränktes Sortiment an Zuckermolekülen, Antikörper können gegen quasi jede beliebige Determinante gerichtet sein. Allen Antikörpern ist gemein, dass sie aufgrund des gleichen Bauplans eine identische Grundstruktur besitzen; Lektine hingegen gehören zu unterschiedlichen Proteinfamilien, was sie eher mit Enzymen vergleichbar macht. Viele Lektine sind toxisch und bieten vor allem der Pflanze einen Schutz vor Fressfeinden. Das *Ricinus communis* Agglutinin, das an β -D-Galaktose und *N*-Acetyl- α -

D-Galaktosamin bindet, ist für alle Tiere und Menschen hochgiftig [Hartley u. Lord (2004)].

2.1.1 Mistellektin I

Beim Mistellektin I (ML-I), das auch als Viscumin oder *Viscum album* Agglutinin (VAA-I) bezeichnet wird, handelt es sich um ein Lektin aus den Blättern und Stengel der Mistel (*Viscum album*, *Loranthaceae*) [Olsnes u. a. (1982)]. Zum ersten Mal wurde ein Mistellektin mit agglutinierenden und zytotoxischen Effekten mittels Affinitätschromatographie an fixierten Plasmaproteinen im Jahr 1977 von Franz *et al.* isoliert [Franz u. a. (1977)]. Mittlerweile sind mehrere Typen des Mistellektins bekannt. Alle gehören zur gleichen Proteinfamilie, unterscheiden sich aber in ihrer Bindespezifität und ihrem Glykosylierungsgrad. Mistellektin I, II und III gehören zu den Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (Typ II RIP), während sich das in den 90ern entdeckte VisAlbCBA, das ein Chitin-bindendes Protein ist, stark von ihnen unterscheidet [Franz (1986), Hajtó u. a. (1990), Beuth u. a. (1992), Peumans u. a. (1996), Pevzner u. a. (2004)]. Die klassischen Mistellektine ML-I, -II und -III bestehen aus zwei Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Dabei stellt die A-Kette (A, *active*) den enzymatisch aktiven Teil dar und die B-Kette (B, *binding*) den an die Zellrezeptoren bindenden Teil [Stirpe u. a. (1980), Franz (1986), Barbieri u. a. (1993), Niwa u. a. (2003)]. Das Haupteffektormolekül in Mistelextrakten ist das ML-I [Hajtó u. a. (1989), Beuth (1997)]. Die kompletten Aminosäuresequenzen der beiden Untereinheiten des ML-I sind von Soler *et al.* publiziert worden [Huguet Soler u. a. (1996), Soler u. a. (1998)]. Die A-Kette (MLA) ist ca. 29 kDa schwer [Huguet Soler u. a. (1996)] und die B-Kette (MLB) ca. 34 kDa [Soler u. a. (1998)]. Das ML-I liegt in hohen Konzentrationen als nicht-kovalentes Dimer vor, während ML-II und ML-III als Monomere auftreten [Franz u. a. (1981), Olsnes u. a. (1982), Niwa u. a. (2003)]. Die in zwei homologe *beta*-Faltblätter zusammengelagerte B-Kette bindet über seinen C- und N-Terminus an den Zellrezeptor [Soler u. a. (1998), Niwa u. a. (2003)]. Lange wurde davon ausgegangen, dass es sich beim Rezeptor um ein Oligosaccharid mit endständiger *D*-Galaktose handelt [Franz u. a. (1981), Stirpe u. a. (1982), Niwa u. a. (2003)]. Im Jahr 2002 konnten Müthing *et al.* allerdings zeigen, dass das Lektin bevorzugt an α 2-6-sialylierte Zuckerstrukturen, die sowohl auf Glykoproteinen als auch auf Glykolipiden zu finden sind, bindet [Müthing u. a. (2002), Müthing u. a. (2004)].

Nach Bindung an den Rezeptor wird das ML-I über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen und über Endosomen zum Golgi-Apparat transportiert, um mittels retrogradem Transport zum ER zu gelangen [Sandvig u. van Deurs (2002)]. Nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücke im ER wird die enzymatisch aktive A-Kette ins Zytosol

transloziert [Agapov u. a. (1999)]. Durch eine einzigartige rRNA *N*-Glykosidaseaktivität depuriniert das MLA den Adenosinrest₄₃₂₄ an der hochkonservierten GAGA Sequenz der 28S rRNA der 60S-Untereinheit eines Ribosoms [Endo u. Tsurugi (1987), Endo u. a. (1988), Barbieri u. a. (1993)]. Diese einfache Desadenylierung hat zur Folge, dass es zur Inhibierung der Proteinbiosynthese und letztendlich zur Apoptose kommt [Stirpe u. a. (1980), Endo u. a. (1988), Barbieri u. a. (1993), Huguet Soler u. a. (1996)].

Die folgende Abbildung 2.1 zeigt die Bänderdarstellung des ML-I.

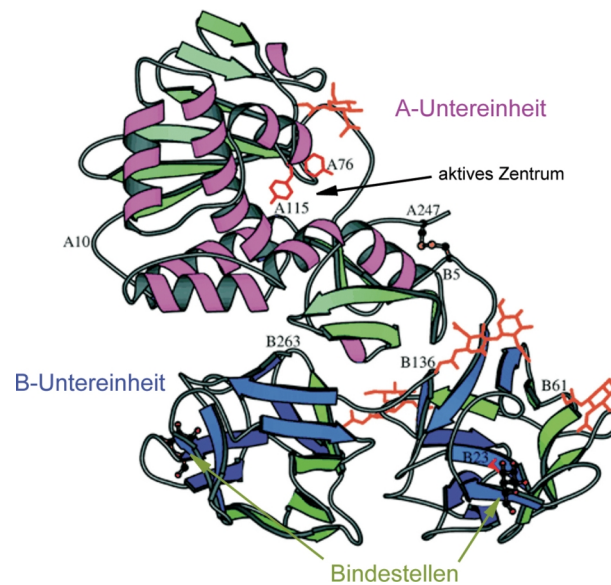


Abbildung 2.1: Ribbon-Darstellung des ML-I Die enzymatisch aktive A-Untereinheit ist kovalent mit der zellbindenden B-Untereinheit über eine Disulfidbrücke verknüpft. Die B-Untereinheit besitzt sowohl am N- als auch am C-Terminus eine Bindestelle, an die das Lektin an seinen zellulären Rezeptor bindet [modifiziert nach Niwa u.a.]

Verschiedene Prozesse auf zellulärer Ebene werden durch ML-I ausgelöst. Zellkultur- und Tiermodellexperimente haben gezeigt, dass diese möglicherweise die adjuvante Wirkung von Mistelextrakten in der Krebstherapie bedingen [Beuth (1997)]. So wurde eine erhöhte Expression von verschiedenen Zytokinen wie IL-1, IL-6, TNF- α und GM-CSF bei der Inkubation von mononukleären Blutzellen oder monozytären Zelllinien mit ML-I beobachtet [Hajtó u. a. (1990), Ribéreau-Gayon u. a. (1996), Stein u. Berg (1997)]. Ebenso wurde über Anstiege Zahl und Aktivität von T-Helferzellen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen sowie Granulozyten berichtet [Hajtó u. a. (1990), Bocci (1993), Stein u. a. (1998), Stauder u. Kreuser (2002)]. Weiterhin ist bei Zellkulturexperimenten ein zytotoxischer Effekt gerade auf proliferierende Zellen wie Embryonal- und Tumorzellen bei Konzentrationen von 1 - 100 ng · mL⁻¹ zu beobachten gewesen [Janssen u. a. (1993),

Beuth u. a. (1994), Valentiner u. a. (2002)]. Dabei konnte zudem beobachtet werden, dass die typischen apoptotischen Veränderungen wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und internukleosomale DNA-Fragmentierung auftraten [Janssen u. a. (1993), Büssing u. a. (1996), Möckel u. a. (1997)].

Von einer erhöhten Ausschüttung des β -Endorphins, einem Oligopeptid, das die Schmerzantwort im zentralen Nervensystem erniedrigt, konnte ebenfalls berichtet werden [Falconer u. a. (1988), Heiny u. Beuth (1994)]. Die Lebensqualität von Krebspatienten könnte somit durch den Einsatz von ML-I zumindest palliativ verbessert werden.

2.1.2 Shiga Toxin

Shiga Toxin (Stx) ist ein zytotoxisches Protein, das von *Shigella dysenteriae*, dem Erreger der Shigellosen oder Bakterienruhr produziert wird. Neben diesen existieren aber auch Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC), die auch als Verotoxin produzierende *Escherichia coli* (VTEC) bezeichnet werden. Das Toxin bewirkt beim Menschen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, die sich in Diarrhöe, hämorrhagischer Colitis und in etwa 6-8% der Fälle im hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) äußern [Karch (2001)]. Beim HUS es zu einem akuten Nierenversagen, Anämie und zu einer Abnahme der an der Blutgerinnung beteiligten Blutplättchen. Dies kann gerade bei immungeschwächten Patienten wie Säuglingen, Kleinkindern oder auch älteren Menschen bis zum Tod führen. Untersuchungen haben ergeben, dass die meisten HUS-Fälle auf Infektionen mit dem Erreger des Serotyps *E. coli* O157:H7 zurückzuführen sind [Karch u. a. (2005)]

Man unterscheidet zwei Gruppen von Shiga Toxinen, Shiga Toxin 1 (Stx1) und Shiga Toxin 2 (Stx2) mit jeweils weiteren Subspezies, die sich allesamt nicht nur in ihrer Gensequenz, sondern teilweise auch in ihrem Bindungsverhalten und der Ausprägung des Krankheitsbildes unterscheiden [Friedrich u. a. (2002), Gerber u. a. (2002), Orth u. a. (2007)]. Shiga Toxin gehört zu den AB₅-Toxinen, zu denen unter anderem auch das Cholera-toxin zählt [Merritt u. Hol (1995), Lencer u. Tsai (2003)]. Es besteht aus zwei Untereinheiten, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die enzymatisch aktive A-Untereinheit (ca. 32 kDa) ist dabei mit fünf identischen B-Untereinheiten (ca. 7,5 kDa), die in einem Pentamer zusammenge-lagert sind, assoziiert. Das Pentamer bindet das Holotoxin lektinartig an die Rezeptoren der Zelloberfläche. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um das GSL Globotriaosylceramid (Gb3Cer/CD77), welches als „*high-affinity*“-Ligand bezeichnet wird. Es bestehen aber auch Bindeaffinitäten zum Elongationsprodukt, dem Globotetraosylceramid (Gb4Cer), allerdings sehr viel schwächere als zu Gb3Cer, weshalb Gb4Cer als „*low-affinity*“-Ligand bezeichnet wird. Das B-Pentamer kann bis zu 15 Gb3Cer/CD77-Moleküle binden [Ling

u. a. (1998)]. Nachfolgende Abbildung 2.2 zeigt Modelle des Stx und der B-Untereinheit.

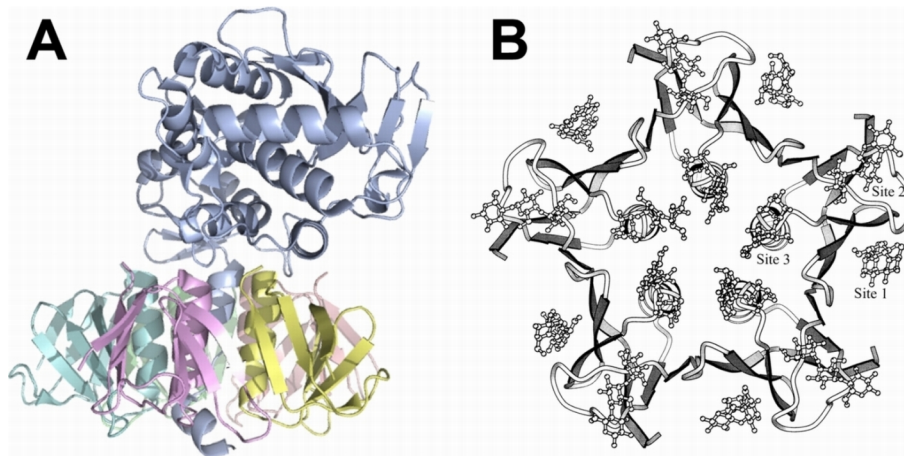


Abbildung 2.2: Bänderdarstellungen des Shiga Toxins (A) Bänderdarstellung des Bakteriophagen-kodierten Stx2. Das blaue Band auf der linken Seite entspricht der A-Untereinheit und die zur Unterscheidung andersfarbigen Bänder der rechten Seite den B-Untereinheiten. (Quelle: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) **(B)** Vereinfachte Bänderdarstellung der B-Untereinheiten des Stx im Komplex mit Gb3-Trisacchariden. Jede Untereinheit besitzt drei Bindestellen (*Site 1 - 3*), wodurch das Holotoxin auf insgesamt 15 Bindungen kommen kann (Quellen: **A**, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, **B**, Ling u. a. (1998)]

Nach erfolgter Bindung an die Zielzelle wird das Stx durch Endozytose internalisiert und gelangt mittels retrogradem Transport über frühe Endosomen und das Golgi-Netzwerk zum ER [Johannes u. Decaudin (2005), Sandhoff u. a. (2005)]. Während des Transports spaltet die Protease Furin die A-Untereinheit in ein ca. 27,5 kDa (A1) und ein 4,5 kDa (A2) schweres Fragment. Beim A1-Fragment handelt es sich um eine rRNA-*N*-Glykosidase, die durch Abspaltung eines Adenins der 28 *S* RNA der 60 *S* ribosomalen Untereinheit zur Inhibierung der Proteinbiosynthese und schließlich zur Apoptose der Zelle führt [Lingwood (1996), Müthing u. a. (2009)]. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Funktionsweise identisch zu dem des Mistellektins ist.

Diverse Studien haben bereits gezeigt, dass es sich bei Gb3Cer-/CD77 um ein tumorassoziiertes GSL handelt. Ovarial-, Brust- und Kolonkarzinome zeigen eine erhöhte Expression des Stx-Rezeptors, weshalb sie mittels zielgerichteter Therapie mit Stx in Frage kommen würden [Johansson u. a. (2009), Falguières u. a. (2008)].

2.2 Glykosphingolipide

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass verschiedene Glykosphingolipide auf Tumorzellen erhöht exprimiert werden. Das Gangliosid GD3 beispielsweise gilt bei Melanomen als Tumor-assoziiert, aber auch GM2, GD2 und Fuc-GM1 werden für Lymphome und Lungenkarziome als Tumor-assoziiert angesehen [Dickler u. a. (1999), Hakomori (1998), Merritt u. a. (1994)].

GSL sind Bestandteile vieler biologischer Membranen in Säugerzellen. Zusammen mit Phospholipiden und Cholesterol bilden sie unter physiologischen Bedingungen Lipiddoppelmembranen aus, in die membranständige Proteine integriert sind. Zahlreiche auf biologischen Lipiddoppelmembranen vorkommende Glykostrukturen sind Bestandteil von GSL oder Membranproteinen. Die Kohlenhydratketten sind nur auf der äußeren Seite der Plasmamembranen zu finden, was zu einem asymmetrischen Membranaufbau führt [Hakomori (1986)].

2.2.1 Struktur und Biosynthese

GSL sind amphipathische Moleküle, die eine hydrophile Oligosaccharidkette und einen hydrophoben Lipidpart, das Ceramid, besitzen. Über letzteren sind die GSL in der Lipiddoppelmembran verankert, während der nach außen ragende, hydrophobe Teil mit seiner Umwelt reagieren kann.

Struktur

Das Ceramid besteht typischerweise aus einem langkettigen einfach ungesättigten Aminoalkohol, dem Sphingosin bzw. 4-Sphingenin, an dessen Aminogruppe eine langkettige Fettsäure über eine Amidbindung geknüpft ist. Während in tierischen Zellen das Sphingosin innerhalb einer Spezies relativ konstant ist, treten bei der Fettsäure Variationen aufgrund unterschiedlicher Kettenlänge oder Konfigurationen wie z. B. *cis*-Doppelbindungen auf. Die meisten natürlich vorkommenden GSL lassen sich in drei Hauptklassen einteilen: neutrale GSL, saure Ganglioside und Sulfatide. Die Grundstruktur sowohl der Ganglioside als auch der Sulfatide lässt sich von der neutralen GSL ableiten. Ganglioside sind GSL, bei denen eine oder mehrere Sialinsäuren an den Oligosaccharidpart gebunden sind [Klenk (1942)]. Diese Sialinsäuren sind im physiologischen pH-Bereich negativ geladen. Bei den Sulfatiden ist statt einer Sialinsäure eine Sulfatgruppe an die GSL gebunden.

Der Oligosaccharidteil ist extrem variabel, weshalb es zu einer großen Vielfalt an GSL kommt. Glukose (Glc), Galaktose (Gal), N-Acetylglukosamin (GlcNAc) und N-Acetylgalactosamin (GalNAc) sind die vier am häufigsten vorkommenden Zuckerbausteine. Fukose

(Fuc) ist eher selten vertreten, aber von großer Bedeutung. Neben diesen unterschiedlichen Zuckerbausteinen tragen auch die Art der Verknüpfung (z.B. 1,3 oder 1,4) und der anomere Bindungstyp (α - oder β -Konfiguration) zur Strukturvielfalt der GSL bei. Zur umfassenden strukturellen Beschreibung der GSL müssen die Parameter Molekulargewicht, Zahl und Typ der Monosaccharide, ihre Sequenz und Verzweigung, Bindungsposition, anomere Konfiguration, zusätzliche funktionelle Gruppen, Sphingosin-Base, Fettsäure-Anteil und die Konformation des GSL-Moleküls angegeben werden [Peter-Katalinić u. Egge (1990)]. Die meisten GSL lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Oligosaccharidgrundstruktur einer der folgenden vier Serien zuordnen: Ganglio (Gg), Globo (Gb), Lakto (Lc) oder Neolakto (nLc). Alle besitzen ein Dihexaosylceramid, das Lactosylceramid (Lc2Cer, Gal β 1-4Glc β 1-1Cer), als Vorläuferstruktur. Durch Kettenverlängerung um jeweils eine oder zwei Monosaccharideinheit(en) werden auf diese Weise die unterschiedlichen Serien gebildet.

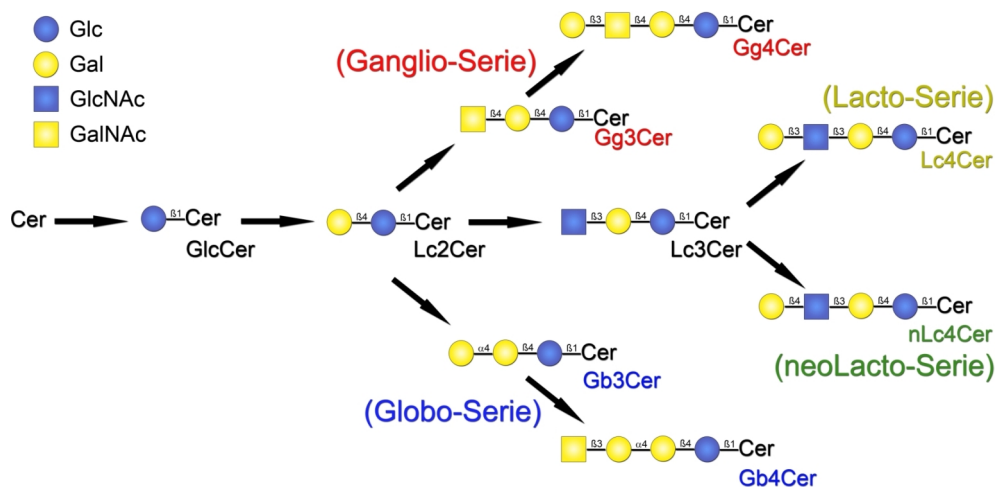


Abbildung 2.3: Die vier häufigsten GSL-Serien in Säugerzellen. Das jeweils folgende GSL entsteht durch Verlängerung der Oligosaccharidkette um jeweils eine Monosaccharideinheit in bestimmter Bindungsposition und anomerer Konfiguration.

Die verwendeten Strukturnamen der GSL sind für einen einfachen Umgang mit diesen Strukturen recht ungeeignet. Die Nomenklatur wurde daher durch die IUPAC-IUB (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry*) Joint Commission on Biochemical Nomenclature bestimmten Regeln unterworfen [Chester (1998)]. Die Tabelle 2.1 gibt die Tetrahexosylceramide der vier Serien an.

Die Sialinsäuren der Ganglioside können in drei verschiedenen Konfigurationen gebunden sein. Eine Bindung an die Neutralzuckerseite kann zum einen in α 2,3- und zum anderen in

Tabelle 2.1: Tetrahexosylceramide der vier häufigsten GSL-Serien

Serie	Kurzform	Struktur ^a
Ganglio	Gg	Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc β 1Cer
Globo	Gb	GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer
Lacto	Lc	Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer
Neolacto	nLc	Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer

^aNomenklatur nach Vorgaben der IUPAC-IUB [Chester (1998)]

α 2,6-Konfiguration vorliegen. Um eine Disialogruppe zu bilden, werden zwei Sialinsäuren in α 2,8-Konfiguration miteinander verbunden. Die bei den meisten Säugetieren vorkommenden Sialinsäuren N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc) unterscheiden sich in lediglich einer zusätzlichen Hydroxylgruppe (siehe 2.4). Dies kann beim Menschen unter Umständen jedoch zu heftigen Reaktionen des Immunsystems führen, da diese Sialinsäure beim Menschen nicht vorkommt.

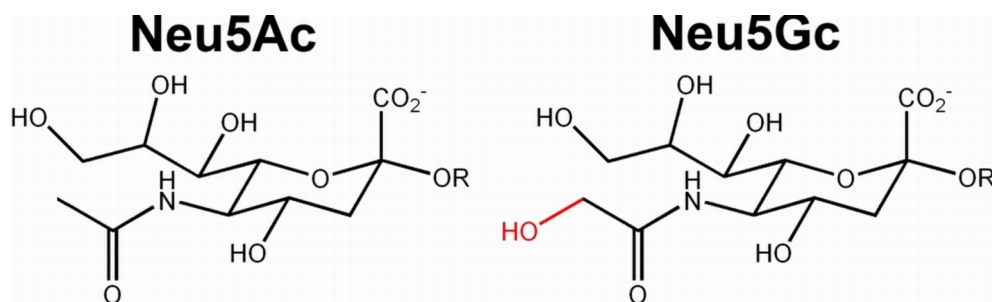


Abbildung 2.4: Die Sialinsäuren N-Acetylneuraminsäure und N-Glykolylnneuraminsäure. Die N-Glykolylnneuraminsäure unterscheidet sich von der N-Acetylneuraminsäure lediglich durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe.

Biosynthese

Die Struktur der GSL ist nicht direkt in der DNA kodiert, weshalb es sich bei den GSL um sekundäre Genprodukte handelt [Hakomori (1986)]. Durch schrittweise Verlängerung der Zuckerkette durch spezifische Glykolyltransferasen entstehen die GSL schrittweise erst im Endoplasmatischen Retikulum, um dann im Golgi-Komplex vollendet zu werden. Die Lokalisation und Abfolge der Glykosyltransferasen ist dabei maßgebend dafür, welches GSL entsteht. Das Zwischenprodukt und das Zucker-Spender-Molekül, der Nucleotidphosphatzucker (= aktivierter Zucker) wie UDP-Gal oder UDP-GlcNAc, werden

vom jeweiligen Enzym als Substrat erkannt und katalytisch verbunden [van Echten u. Sandhoff (1993)]. Der spezifische Satz an vorhandenen Glykosyltransferasen bestimmt somit das GSL-Expressionsmuster. Sialinsäuren wie Neu5Ac werden durch spezifische Sialyltransferasen von CMP-Neu5Ac auf die Neutralzuckerketten übertragen, wodurch die Ganglioside gebildet werden.

L-Serin und Palmitoyl-CoA werden zu Sphingosin umgesetzt und mit einer langkettigen Fettsäure zum Ceramid verknüpft. Diese Reaktionen erfolgen an der zytosolischen Seite der Lipiddoppelmembran des ERs [Varki u. a. (1999)]. Die Initialglykosylierung erfolgt durch eine spezielle Glykosyltransferase und einen aktivierten Zucker, UDP-Glukose oder UDP-Galaktose, und führt zum Monohexaosylceramid (MHC) oder Cerebrosid. Durch einen nach wie vor unbekanntes „*flip*“-Mechanismus gelangt dieses MHC in das Lumen des ER, wo es dann durch spezifische Glykosyltransferasen verlängert wird.

2.2.2 Funktionen

In allen Säugerzellen können GSL gefunden werden. Die Erstbeschreibung geht auf J. L. W. Thudichum im Jahre 1884 zurück [Yamakawa (1996)]. Er isolierte damals die GSL aus Hirngewebe, in dem sie in großen Mengen vorkommen.

GSL sind vor allem Bestandteil der extrazellulären Seite der Plasmamembran [Ledeer u. Yu (1982)], lassen sich aber auch im Zytosol und in Zellorganellen finden [Hakomori (1990)]. Aufgrund des amphiphilen Charakters der Glyko- und Phospholipide kommt es unter physiologischen Bedingungen zur Ausbildung einer Lipiddoppelschicht mit fluiden Eigenschaften, in die z. B. membranständige Proteine inseriert sein können [Singer u. Nicolson (1972)]. Als Bestandteil der Membran sind die GSL aber nicht statistisch gleichmäßig verteilt, sondern sind in Form von „Flößen“ sogenannten *lipid rafts*, organisiert [Harder u. Simons (1997), Jacobson u. Dietrich (1999)]. Diese *lipid rafts* sind Mikrodomänen in der Zellmembran und neben den Sphingolipiden reich an Cholesterol [Simons u. Ikonen (1997)]. Ein weiterer Begriff für GSL-Ansammlungen ist die „*GSL-enriched domain*“ die eine funktionale Rolle bei der Zellinteraktion und -adhäsion spielt. GEM und nicht einzelne GSL sind massgeblich für die Ligand-Rezeptor-Interaktion verantwortlich [Hakomori (1998), Sorice u. a. (2004)]. Ein weiterer von Hakomori geprägter Begriff ist die „Glykosynapse“, die es in drei verschiedenen Varianten gibt und die an Prozessen der Signaltransduktion und Zelladhäsion beteiligt sind [Hakomori (2002), Hakomori (2004)].

Als Zelloberflächenmoleküle kommt den GSL eine wichtige Bedeutung in Bezug auf Erkennungsprozesse zu. Wie bereits erwähnt, fungieren sie als Signalmoleküle bei Zell-Zell-Interaktionen, werden aber auch als Differenzierungsmarker verschiedener Zelltypen wie Erythrozyten, Lymphozyten etc. beschrieben [Rebel u. a. (1980), Schwarting u. Summers

(1980)]. Das AB0-Blutgruppensystem ist ein Beispiel für die Erythrozytendifferenzierung, da ihre Antigene durch verschiedene GSL ausgebildet werden [Feizi u. a. (1979), Hakomori (1986)]. GSL besitzen darüber hinaus immunmodulatorische Fähigkeiten, indem sie eine inhibitorische Wirkung auf T-Lymphozyten haben [Ladisch u. a. (1995)].

Außerdem fungieren GSL als Zelladhäsionsmoleküle bei Entzündungsreaktionen. Sialyl-Lewis^x-Strukturen (Neu5Ac α 2-3(Fuc α 4)Gal β 4-R) spielen bei der Adhäsion von Leukozyten mit dem Endothel durch die Funktion als E-Selektin-Rezeptor eine entscheidende Rolle [Brandley u. a. (1990), Nimrichter u. a. (2008)]. Die Inhibierung dieser Interaktion könnte zur Linderung von chronischen Entzündungsreaktionen oder zur Unterdrückung von Metastasierungen beitragen. Als Zelloberflächenmolekül sind GSL allerdings auch zu Rezeptoren für Viren, Bakterien, Toxine etc. geworden [Müthing (1996a)]. Influenzaviren binden beispielsweise an Ganglioside mit CD75s- und iso-CD75s-Epitop und einem noch nicht näher bestimmten Oligosaccharidrückgrat, das vermutlich interne Fukosen beinhaltet. Beispiele für Toxin-GSL-Wechselwirkungen sind das Cholera toxin und GM1 [Lencer u. Tsai (2003)], Botulinumtoxin und GT1b [Yowler u. Schöngrund (2004)] und Shiga Toxine und Gb3Cer/CD77 und Gb4Cer [Lingwood (1996), Schweppe u. a. (2008)].

Bei maligner Transformation einer Zelle ändert sich das Glykoexpressionsmuster durch die Veränderung des Biosyntheseapparates für Glykoproteine und -lipide. Sollten bestimmte Glykostrukturen auf Tumoren in höherer Quantität auftreten als im ursprünglichen gesunden Gewebe, werden sie als tumorassoziiert bezeichnet. Hakomori postulierte, dass sich jeder Tumor durch die Akkumulation von bestimmten GSL charakterisieren lässt [Hakomori (1989)].

2.3 Glykosphingolipidanalytik

Zur Analyse der GSL kommt im Rahmen der vorgelegten Arbeit die Dünnschichtchromatographie (DC) zum Einsatz. Sie wird zur Trennung der GSL eingesetzt. Anschließend erfolgt die Immundetektion zum spezifischen Nachweis der Oligosaccharidstrukturen. Dieses Verfahren wird als DC-Overlay-Assay bezeichnet.

2.3.1 Dünnschichtchromatographie

Für die DC (engl. *Thin-Layer Chromatography*, TLC) kommen vorbeschichtete Kieselgelplatten zum Einsatz. Auf Glasplatten wird eine dünne Schicht (0,2 mm) Kieselgel aufgetragen, die als polare, stationäre Phase dient. Als unpolare, mobile Phase werden vorwiegend Laufmittel bestehend aus Gemischen von Chloroform, Methanol und Wasser eingesetzt. Mit Hilfe eines Auftragegerätes werden die Proben ca. 1 cm oberhalb des

unteren Randes der Platte in Form einer dünnen Bande appliziert. Anschließend werden die Platten in einen Chromatographietank gestellt, so dass der untere Rand der Platte im Laufmittel steht. Um eine gleichmäßige Trennung zu erhalten, ist es wichtig, dass die Atmosphäre im Tank mit der Gasphase des Laufmittels abgesättigt ist. Dazu befindet sich im Tank Chromatographiepapier, in dem das Laufmittel aufsteigt und es gleichmäßig an die umgebende Luft abgibt. Das Laufmittel wandert aufgrund der Kapillarkräfte in der Kieselschicht der Platte nach oben und „zieht“ die GSL mit. Da die GSL aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten, die durch das Zusammenspiel der unterschiedlichen Oligosaccharidketten und Fettsäuren zustande kommen, verschieden stark mit der stationären Phase wechselwirken, trennt sich das GSL-Gemisch auf.

2.3.2 Automatisierte Mehrfachchromatographie

Die automatisierte Mehrfachchromatographie (AMD, engl. *Automated Multiple Development*) ist für die Trennung von langkettigen GSL die Methode der Wahl. Bei dieser Technik wird die Mehrfachentwicklung einer DC-Platte vollautomatisch in einem Gerät durchgeführt. Mit Hilfe des AMD 2 von CAMAG (MuttENZ, Schweiz) können maximale Auflösungen erzielt werden. Normalerweise wird die Polarität des Laufmittels mit jedem Lauf geringer [Jupille u. Perry (1976)]. Unterschiedliche Solvensstärke wird dabei mit zunehmender Lauflänge kombiniert. Nach jedem Lauf wird die DC-Platte vakuumgetrocknet. Die Trennleistung des AMD ist teilweise vergleichbar mit der



Abbildung 2.5: Das AMD2 von CAMAG (MuttENZ, Schweiz)

einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *High-Performance Liquid Chromatography*). Die größte Stärke des AMD ist das genaue Einstellen jedes einzelnen Chromatographieschritts. Nachteile sind allerdings eine längere Analysezeit und der mögliche Verlust von volatilen Stoffen, z.B. durch die Trocknungsperioden oder durch Ausschwemmen während sie an der Solvensfront laufen. Daher muss bei jeder neuentwickelten Methode eine Validierung stattfinden.

Das AMD 2 besitzt eine speziell konstruierte Vakuumkammer, in die vor jedem Lauf das Laufmittel eingefüllt wird. Das Gerät mischt dazu vollautomatisch aus den fünf vorhandenen Reservoirs die angemessenen Anteile zusammen. Mit Hilfe eines optischen Sensors

erkennt das Gerät die Laufmittelfront und unterbricht den Lauf, wenn die programmierte Höhe erreicht ist. Das in der Kammer verbleibende Solvens wird abgepumpt und die Kammer zur Trocknung der Platte unter Vakuum gesetzt.

Aufeinanderfolgende Entwicklungen werden normalerweise mit schwächer werdenden Laufmitteln und erweiterten Laufhöhen kombiniert. Chromatographien mit dem AMD sind reproduzierbar. Die größte Stärke des AMD ist die Trennung von Komponenten, die sich über einen hohen Polaritätsbereich erstrecken oder die sich in ihrer Polarität sehr ähneln. Im ersten Fall ist ein stark abfallender Gradient notwendig, während im zweiten Fall der fokussierende Effekt einer Mehrfachchromatographie und ein flacher Gradient mit leichter Entwicklungsdistanz in Kombination mit vielen Chromatographieschritten die beste Auflösung ermöglicht [Reich u. Schibli (2006)].

2.3.3 Immundetektion

Nach erfolgter Trennung der GSL-Gemische, ob konventionell oder mittels AMD, ist es nun möglich, bestimmte Strukturen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, Lektinen oder Toxinen nachzuweisen. Hierzu werden mono- oder polyklonale Antikörper verwendet, die gezielt an eine Struktur binden. An einen Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, ist ein Enzym, z.B. alkalische Phosphatase (AP), gekoppelt. Mittels Enzym-katalysierter Chromogenumwandlung eines präzipitierenden Farbstoffes entstehen an den Stellen, wo sich die ursprünglichen Zellstrukturen des Primärantikörpers befinden, farbige Banden [Müthing (1996b)].

2.4 Nierentumoren

2.4.1 Anatomie und Physiologie

Die Niere (lat. *ren*, griech. *nephros*) ist ein paarig angelegtes Organ der Wirbeltiere. Die Nephrologie als Teil der Inneren Medizin und die Urologie als operative Disziplin sind die beiden medizinischen Fachgebiete, die sich mit diesem Organ und seinen Krankheiten beschäftigen [Alken (2004)]. Beim Menschen liegen die beiden Nieren retriperitoneal (hinter dem Bauchfell), beiderseits der Wirbelsäule, die sie nach Vorne nicht überragen, unterhalb des Zwerchfells (lat. *Diaphragma*) in der *Fossa lumbalis* (Nierenlager). Sie liegen etwa auf Höhe des 12. Brustwirbels und ersten bis dritten Lendenwirbels, wobei die rechte Niere aufgrund des wesentlich größeren rechten Leberlappens ca. eine halbe Wirbelhöhe tiefer liegt als die Linke. Auf beiden Nieren sitzt hübchenartig die halbmondförmige Nebenniere [Netter u. Renner (1983)]. Die Nieren haben eine bohnenartige Form und eine braunrote Färbung. Sie sind zwischen 10 und 12 cm lang, 5 bis 6,5 cm breit und ihre Dicke schwankt

zwischen 3 und 5 cm bei einem variablen Gesamtgewicht von 120 bis 200 g [Netter u. Renner (1983), Alken (2004)]. In Abbildung 2.6 ist eine schematische Darstellung der Niere gezeigt.

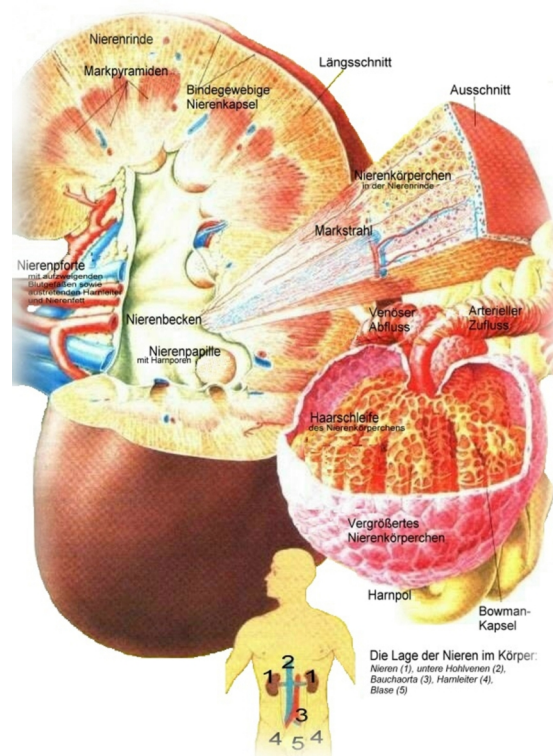


Abbildung 2.6: Schematische Abbildung der Niere (Quelle: Faller u. Schönke (2004))

Zu den Aufgaben der Niere gehört primär die Ausscheidung von Endprodukten des Stoffwechsels, den sogenannten harnpflichtigen Substanzen, und Giftstoffen aus dem Körper durch die Bildung des Harns, der schließlich über den Harnweg aus dem Körper ausgeschieden wird. Damit einhergehend bilanziert die Niere den Wasserhaushalt des Körpers und dient damit der langfristigen Blutdruckeinstellung [Alken (2004)]. Weiterhin reguliert sie über die Kontrolle der Zusammensetzung des Harns den Elektrolyt- und den Säure-Base-Haushalt. In der Niere findet die Glukoneogenese statt, weshalb sie ein bedeutendes Organ für den Zwischenstoffwechsel ist. Auch die Produktion von Hormonen wie bspw. Erythropoetin, das für die Bildung von roten Blutkörperchen (Erythrozyten) benötigt wird, und der Abbau von Peptidhormonen sind Teil der Nierenfunktion [Manski (2007)].

2.4.2 Karzinome

Das Nierenzellkarzinom (NZK) stellt etwa 3% aller malignen Tumorerkrankungen und 80% aller malignen Nierentumoren des Menschen dar. Es ist der dritthäufigste urologische Tumor, wobei sein Vorkommen Unterschiede bzgl. Geographie, Ethnie, Alter und Geschlecht aufweist [Bono u. Lovisolo (1997), Godley u. Taylor (2001)]. Durch die sich generell verschiebende Alterspyramide in den westlichen Industrieländern nimmt die Häufigkeit ebenfalls zu. Jährlich werden in Deutschland ca. 10.000 Neuerkrankungen registriert, wobei die altersbezogene Inzidenz ab dem 35. Lebensjahr kontinuierlich steigt und ihren Höhepunkt in der Mitte des sechsten Lebensjahrzehnts erreicht. Männer sind dabei etwa 1,5 bis 3 mal so häufig betroffen wie Frauen [Alken (2004)]. Adenokarzinome machen etwa 95% aller Nierenmalignome aus. Selten sind Nephroblastome (Wilms-Tumor, meist im Kindesalter), Sarkome, Lymphome, Hämangioperizytome und benigne Angiomyolipome [Rivera u. a. (2007)].

Die Ätiologie des NZK ist nicht vollständig geklärt. Eine Häufung innerhalb einer Familie tritt oft in Verbindung mit dem relativ seltenen von-Hippel-Landau-Krebssyndrom auf. In diesem Fall ist die Ausbildung eines NZK auf die Mutation des VHL-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 3 zurückzuführen [Chen u. a. (1995)]. Meistens entsteht ein Tumor allerdings sporadisch und unilateral, während NZK hereditären Ursprungs oft syn- oder metachron auftreten [Böcker u. a. (2004)].

Die Erkrankung ist in 50% ohne Beschwerden, weshalb NZK meist zufällig bei Untersuchungen anderen Ursprungs diagnostiziert werden. Harnanalysen, Serumanalysen und Blutbildveränderungen können ebenfalls Hinweise auf einen Nierentumor geben. Bildgebende Verfahren wie die Sonographie, Computer- oder Kernspintomographie werden dann genutzt, um die Verdachtsdiagnose abzusichern [Alken (2004)]. Metastasen breiten sich bereits in frühen Stadien in Lunge (>75%), Leber (40%), Knochen (30%) und Gehirn (15%) aus [Böcker u. a. (2004)]. In Verbindung mit einer späten Diagnose oder bei sonstigen Beschwerden werden daher oft Röntgenaufnahmen des Thorax und Knochenszintigraphien gemacht, um Metastasen zu lokalisieren bzw. auszuschließen [Manski (2007)].

Der Goldstandard ist nach wie vor die Nephrektomie, d.h. die Entfernung der betroffenen Niere. Bei Vorhandensein von nur einer Niere, einer Funktionsstörung der verbleibenden Niere wird von der Entfernung des Organs abgesehen. Auch bei bilaterale Tumoren, d.h. beide Nieren sind von einem Tumor betroffen, oder bei kleinen Tumoren der Klasse T1a, N0, M0 (siehe Kapitel 2.4.3), wird von der Entfernung des Organs abgesehen und auf alternative Therapiemöglichkeiten, wie eine Nierenteilresektion, zurückgegriffen [Manski (2007)]. Die laparoskopische Kryotherapie oder Radiofrequenzablation werden aktuell untersucht. Da das Nierenkarzinom und seine Metastasen aufgrund der Expression von MDR-1 (engl.

multi drug resistance) nicht auf Chemotherapien ansprechen, rücken Immuntherapien immer mehr in den Fokus des Interesses von Medizinerinnen und Tumorbiologen. Beim nicht-metastasierenden NZK ergab eine Immunisierung mit einem aus Tumoren gewonnenen Impfstoff allerdings keine Verbesserung der Überlebensrate [Jocham u. a. (2004)]. Beim metastasierenden NZK hat die Gabe von Interferon- α (IF- α) in Verbindung mit Interleukin-2 (IL-2) und 5-FU in ca. 40% der Fälle bei einer selektierten Patientengruppe zu einer Verbesserung der Überlebensrate geführt, während andere Studien allerdings eine weit geringere Wirkung zeigten [Negrier u. a. (2007)]. Die Inhibition der Signaltransduktion ist dagegen vielversprechend. In Phase-III Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Therapieansatz zu einer erhöhten Überlebensrate führt. Sunitinib ist ein Kinase-Hemmer, der vor allem VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) und PDGF-Rezeptor-Kinasen (engl. *platelet derived growth factor*) hemmt und im Gegensatz zu Interferon zu einer Erhöhung der Überlebensrate um 6 Monate führte [Motzer u. a. (2007)]. Die Zytostaktika Sorafenib und Temozolomid greifen in die intrazelluläre Signaltransduktion des Zellwachstums und der Angiogenese ein. Sorafenib hemmt u.a. RAF-Kinasen (engl. *rapidly growing fibrosarcoma*) und VEGF-Rezeptorkinasen und Temozolomid inhibiert mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*). Dadurch wurden erhöhte Überlebensraten von mehr als 3 Monaten erzielt [Faivre u. a. (2006), Escudier u. a. (2007a), Escudier (2007), Hudes u. a. (2007)]. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF. In Kombination mit Interferon konnte die Überlebensdauer um 5 - 10 Monate erhöht werden [Escudier u. a. (2007b), Motzer u. Bukowski (2006)]. Als Begleittherapie einer Nierentumorerkrankung werden bei schmerzhaften Beschwerden Bestrahlung, Behandlungen mit Kortison und/oder eine palliative Tumornephrektomie durchgeführt [Manski (2007)].

2.4.3 Klassifikation und stadienabhängige Prognose

In den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelte der Franzose Prof. Pierre Denoix eine Facettenklassifikation zur Stadieneinteilung von malignen Tumoren, das TNM-System. Dieses System beruht auf statistischen Untersuchungen, die Aussagen über das voraussichtliche Verhalten von Tumorerkrankungen zulassen, wie bspw., dass sich ab einer bestimmten Größe eines Tumors die Krankheitsprognose verschlechtert. Die Einstufung einer Tumorerkrankung in die einzelnen Kategorien des TNM-Systems erlaubt daher prognostische Aussagen und bestimmt auch häufig den Therapieansatz. Unter der Führung von Prof. Denoix etablierte die *Union Internationale Contre le Cancer (UICC)* das TNM-System und publizierte es erstmals im Jahre 1953. Mittlerweile existiert das *Livre de Poche* in der 7. Auflage.

Man unterscheidet in erster Linie zwischen klinischen (TNM) und einer pathologischen

(pTNM) Klassifikation. T (Tumor) beschreibt hierbei die Ausdehnung des Primärtumors, N (engl. *Nodes* = Lymphknoten) das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M (Metastasen) das Auftreten von Fernmetastasen. In Tabelle 2.2 ist die TNM-Klassifizierung für Nierenkarzinome aufgeführt.

Tabelle 2.2: TNM-Klassifizierung von Tumoren der Niere^a

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor begrenzt auf Niere und ≤ 7 cm in seiner größten Ausdehnung
T1a	Tumor begrenzt auf Niere und ≤ 4 cm in größter Ausdehnung
T1b	Tumor begrenzt auf Niere und > 4 cm aber ≤ 7 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf Niere und < 7 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich bis in Hauptvenen aus oder infiltriert <i>Glandula adrenalis</i> (Nebenniere) oder perirenales Fettgewebe, aber nicht außerhalb der <i>Fascia renalis</i> (Gerota'sche Faszie ^b)
T3a	Tumor infiltriert <i>Glandula adrenalis</i> oder <i>Capsula fibrosa renalis</i> (perirenale Fettkapsel), aber nicht über <i>Fascia renalis</i> hinaus
T3b	Ausgeprägte Tumorausdehnung in <i>Vena renalis</i> (Nierenvene) oder <i>Vena cava inferior</i> (Vene unterhalb des Zwerchfells bzw. hintere Hohlvene)
T3c	Tumorausdehnung in die <i>Vena cava superior</i> (Vene oberhalb des Zwerchfells bzw. vordere Hohlvene)
T4	Tumorausdehnung über die <i>Fascia renalis</i> hinaus
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastase in mehr als einem regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen liegen vor

^anach Greene (2002)

^bEin Faszien sack, der Niere, Nebenniere und Fettkörper nach vorne, seitlich und hinten einfasst, dabei aber nach medial oben und unten verschlossen ist

Basierend auf der TNM-Klassifikation lassen sich die Tumoren in verschiedenen Stadien einteilen. Liegen pathologische pTNM-Kategorien vor, so spricht man von definitiver sonst

von klinischer Stadiengruppierung. In folgender Tabelle 2.3 ist die Einteilung aufgeführt.

Tabelle 2.3: Stadiengruppierung von Nierentumoren

	N0	M0 N1	N2	M1
T1 T1a T1b	Stadium I	Stadium III	Stadium IV	Stadium IV
T2	Stadium II			
T3 T3a T3b T3b	Stadium III			
T4	Stadium IV			

Von dieser Liste ausgehend lassen sich statistische Aussagen über die 5-Jahres-Überlebensrate machen. Je nach Stadium ergibt sich ein prozentualer Anteil, der um so höher liegt je höher eine Chance auf Heilung besteht. Die folgende Tabelle 2.4 zeigt die 5-Jahres-Überlebensrate.

Tabelle 2.4: 5-Jahres-Überlebensrate

Stadium	Überlebensrate
I	96%
II	82%
III	64%
IV	23%

Neben der anatomischen Beurteilung eines Tumors ist auch die histomorphologische Charakterisierung von großer Wichtigkeit. Dabei liefert der Grad der Zelldifferenzierung innerhalb des malignen Gewebes essentielle Informationen für die Prognose und mit ihr einhergehende Therapiemöglichkeiten. Diese Art der Beurteilung wird als *grading* (G) bezeichnet. Dabei ist immer der ungünstigste Differenzierungsgrad massgebend für den gesamten Tumor. Es existiert für Nierenkarzinome das Grading nach Fuhrman, bei welchem besonders die Morphologie des Zellkerns berücksichtigt wird. In Tabelle 2.5 ist das Grading für Nierenkarzinomgewebe aufgeführt.

Tabelle 2.5: Grading maligner Nierentumoren nach Fuhrman

Grad (G)	Differenzierung
0	Nierenadenom
1	gut differenziert
2	mäßig differenziert
3	schlecht differenziert
4	undifferenziert

2.5 Pankreaskarzinomzelllinien

Das Pankreaskarzinom stellt die fünfthäufigste Todesursache bei Tumorerkrankungen dar. Nach Stellung der Diagnose verbleiben den Patienten meist noch 6 Monate. Die ersten fünf Jahre überleben weniger als 95% der Erkrankten. Daher gilt das Pankreaskarzinom als die Tumorerkrankung mit der schlechtesten Prognose [Jemal u. a. (2008)].

Aufgrund der späten Symptomentwicklung erfolgt die Diagnose meist in fortgeschrittenem Stadium. Beschwerden treten meist erst durch die bereits entstanden Metastasen auf, weshalb eine Heilung dann aber schon als ausgeschlossen gilt [Böcker u. a. (2004)]. Eine Operation ist nur sinnvoll, so lange sich die Neoplasie auf das Pankreas beschränkt und noch keine Metastasierung erfolgte.

In Deutschland lag die Inzidenzrate 2004 bei 15,7 pro 100.000 Einwohnern [RKI], wobei Männer 1,6 mal häufiger betroffen sind als Frauen. Ein Pankreaskarzinom tritt meist zwischen dem 60. und 80. Lebensjahrzehnt auf. Das duktales Adenokarzinom, das vom exokrinen Pankreas ausgeht, macht mit etwa 85% den größten Teil aller Pankreasneoplasien aus [Colombo-Benkman u. Senninger (2005)].

Während Alter, Übergewicht und Nikotinkonsum als gesicherte Risikofaktoren gelten, werden die Einflüsse von Alkohol, Kaffee und fettreicher Ernährung kontrovers diskutiert [Adler u. a. (2007)]. Chronische Pankreatitis, die Entzündung der Bauchspeicheldrüse, und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 weisen ein stark erhöhtes Risiko auf, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken [Böcker u. a. (2004), Adler u. a. (2007)].

Die einzige kurative Therapiemöglichkeit ist die Resektion, die aber aufgrund der meist späten Diagnose nur für ca. 10 - 20% aller Patienten in Frage kommt [Ghaneh u. a. (2007)]. Adjuvante Therapien in Form von Radio- und Chemotherapie liefern in Verbindung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin erzielt [Sultana u. a. (2008)]. Allerdings ergab noch keine Studie eine sichtbare Verbesserung der Prognose für die Patienten, weshalb Therapien mit neuen Chemostatika meist nur einen palliativen Ansatz darstellen. Aufgrund der schlechten Prognosen und der Aggressivität eines Pankreaskarzinoms, werden derzeit

neue Adjuvantien auf ihre Wirksamkeit untersucht. So konnten mit den monoklonalen Antikörpern Cetuximab und Bevacizumab, die gegen EGFR und VEGF gerichtet sind (vgl. Kap. 2.4.2 auf Seite 29) und beide in Pankreaskarzinomen überexprimiert sind, in klinischer Phase II Studien erste Erfolge erzielt werden [Ghaneh u. a. (2007), Kindler u. a. (2005)]. Kürzlich wurde allerdings auch eine Überexpression des Viscumin-Rezeptors CD75s in humanen Pankreaskarzinomen nachgewiesen, wodurch ein Einsatz des Lektins als mögliches Tumoradjuvanz in Betracht gezogen werden könnte [Distler u. a. (2008b)]. Zellkulturen aus humanen Pankreaskarzinomen können als Modellsystem für weitere Studien dienlich sein. Zur Etablierung einer Zelllinie wird zunächst Tumorgewebe aus dem Pankreaskarzinom oder aus einer daraus hervorgehenden Metastase isoliert. Die Zellen werden vereinzelt und unter geeigneten Bedingungen kultiviert. Bei den in dieser Arbeit untersuchten sieben Pankreaskarzinomzelllinien handelt es sich in vier Fällen um Zelllinien des Primärtumors und bei drei um Metastasen. Eine genaue Übersicht über die Pankreaszelllinien ist der Tabelle 4.6 auf Seite 51 zu entnehmen.

2.6 Massenspektrometrie

Unter Massenspektrometrie versteht man eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. In der Ionenquelle wird aus einer Substanzprobe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt. Im Massenanalysator werden die Ionen hinsichtlich ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses aufgetrennt. Mit Hilfe eines Detektors, der ein Massenspektrum liefert, kann dann abgelesen werden, welche Ionen mit welcher Molekülmasse gebildet worden sind [Lottspeich u. Engels (2006)].

2.6.1 NanoESI Q-TOF-MS

NanoESI Q-TOF MS steht für nanoElektrospray Ionisations-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (engl. *nanoElectrospray Ionization-Quadrupol-Time-of-Flight-Mass Spectrometry*). Das Ionisierungsprinzip beruht auf der Desolvatisierung von Probenmolekülen aus einer Lösung in die Gasphase. Eine Kapillare wird dazu mit der zu analysierenden Substanz befüllt. Zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode wird eine hohe Potentialdifferenz angelegt, die auch die Analytlösung durchströmt und dazu führt, dass sich die Ionen, ähnlich wie bei der Elektrophorese, auftrennen. Im Positivionenmodus (engl. *positive-ion mode*) werden die Kationen an die Oberfläche der Analytlösung gezogen und die Anionen verbleiben im Inneren der Analytlösung. Die positiv geladenen Teilchen werden immer weiter in Richtung Kathode gezogen und bilden an der Kapillarspitze

den sogenannten Taylor-Konus. Bei genügend hoher Potentialdifferenz entsteht dann ein filamentöser Film von Analytlösung, der bei weiterer Entfernung zur Anode in winzige aneinandergereihte Tröpfchen zerfällt. Durch kontinuierlichen Lösungsmittelverlust kommt es schließlich aufgrund der hohen Ladungsdichte zu Coulomb-Explosionen, was letztendlich zur Desolvatisierung der Ionen beim Transfer ins Massenspektrometer führt. Dieser Prozeß findet unter Atmosphärendruck statt. Im Massenanalysator liegt jedoch Hochvakuum vor. Ein *Interface* gewährleistet diesen Übergang [Lottspeich u. Engels (2006)].

Empfindlichkeitsstudien ergaben, dass der beobachtete Ionenstrom mit der Analytkonzentration und nicht mit dem versprühten Lösungsvolumen pro Zeiteinheit korreliert. Daher wurden die Flussraten stetig vermindert, wobei das „Nanospray“ beispielsweise Flussraten von ca. $1 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$ liefert.

Als Massenanalysator dient ein Flugzeitrohr (TOF, engl. *time-of-flight*), in dem sich eine feldfreie Driftstrecke befindet. Hier werden die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. Der vorgeschaltete Quadrupol kommt im MS/MS-Modus zu Einsatz. Er besteht aus vier parallelen Stäben, von denen sich je zwei mit der gleichen Spannung gegenüberliegen. An dem einen Paar liegt Wechselspannung und an dem anderen Gleichspannung an. Durch Einstellung der Spannung ist es nun möglich, dass nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis den Quadrupol passieren. Durch schnellen Wechsel der Spannungen an den Stäben, werden nun nur die Ionen mit dem zuvor bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis auf einer stabilen oszillierenden Bahn durch den Quadrupol geführt. Andere Ionen, die dieses Masse-zu-Ladungsverhältnis nicht aufweisen, haben diese Stabilität nicht und stoßen gegen die Stäbe oder Wände des Quadrupols. Die Ionen, die den Quadrupol passiert haben, gelangen dann in einen Hexapol, der als Kollisionskammer dient. In diesem Hexapol befindet sich ein inertes Gas wie z.B. Argon, das als Stoßgas dient. Die Ionen kollidieren mit den Gasmolekülen und fragmentieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als „*collision induced dissociation*“ oder kurz CID. Im nachgeschalteten TOF werden nun die Fragmentionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetrennt. Im MS/MS-Spektrum können nun die Molekülmassen der Fragmentionen abgelesen werden [Lottspeich u. Engels (2006)]. Mit Hilfe eines Fragmentierungsschemas nach Domon und Costello können die Molekülmassen einzelner Fragmente berechnet werden [Domon u. Costello (1988)]. Ein Abgleich der Peaks im Spektrum mit den theoretischen Werten des Fragmentierungsschemas ermöglicht eine Zuordnung der Fragmente. Auf diese Weise können Daten über die genaue Zusammensetzung eines im MS-Spektrum detektierten Moleküls gewonnen werden.

2.6.2 MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS steht für Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massen-spektrometrie (engl. *Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation-time-of-flight-Mass-Spectrometry*). Dem Analyten wird auf einem Probenhalter (Target) in hohem Überschuss eine Matrixsubstanz wie z.B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) zugegeben. Die Matrix spielt für den Ionisierungsprozeß eine entscheidende Rolle. Durch Kokristallisation werden die Analytmoleküle in das Kristallgitter der Matrix eingebaut. Zur Ionisation werden meistens UV-Laser eingesetzt, die mit Wellenlängen im Nanometerbereich arbeiten. Ein Laserimpuls von wenigen Nanosekunden bewirkt eine Energieübertragung vom Laserbeschuss in das Kristallgitter. Zuerst nehmen die Matrixmoleküle die Energie auf und geben sie teilweise an die Analytmoleküle ab, die auf diese Weise ionisiert werden. Die Energiewelle, die das Kristallgitter erfährt, führt zu einer explosionsartigen Freisetzung eines Teils des Festkörpers. Dabei werden neben Matrixmolekülen auch Analytmoleküle in die Gasphase freigesetzt. Ein elektrisches Feld von -20 kV (bei Messungen im Positivionenmodus) liegt an der Vorkammer, in der die Ionisierung abläuft, an. Die Molekülionen erfahren aufgrund ihrer Ladung eine Beschleunigung in Richtung der Gegenelektrode. Der Ionenstrahl wird durch optische Linsen fokussiert und passiert dann die feldfreie Driftstrecke des TOF-Massenanalysators. Die Trennung der Molekülionen erfolgt nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis. Die Ionen erreichen letztendlich den Detektor und über einen Konverter werden die Signale schließlich als Massenspektrum am Bildschirm ausgegeben. Die Peaks des Massenspektrums lassen Rückschlüsse auf die Molekülmasse der detektierten Ionen zu [Hillenkamp u. Peter-Katalinić (2007)].

IR-MALDI-o-TOF-MS

IR-MALDI-o-TOF-MS steht für Infrarot-Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-orthogonal-Flugzeit-Massenspektrometrie (engl. *Infrared-Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionisation-orthogonal-time-of-flight-Mass-Spectrometry*). Normalerweise werden für MALDI-MS UV-Laser mit Wellenlängen im Nanometerbereich verwendet. Die Proben befinden sich stets auf der Oberfläche eines Targets, weshalb es nicht notwendig ist, sehr tief mit dem Laser in die Probe einzudringen. Will man aber von DC-Platten direkt MALDI-MS betreiben, ist es notwendig, mit dem Laserimpuls tief in das Kieselgel einzudringen, um mehr Analytmoleküle in den Massenanalysator einzubringen. Dazu können IR-Laser verwendet werden, die mit Wellenlängen im Mikrometerbereich arbeiten und einen höheren Energieübertrag mit sich bringen. Während mit UV-Lasern nur wenige Nanometer der Matrix-Analyt-Kristalle abgetragen werden, werden mit IR-Lasern bis zu

einem Mikrometer abgetragen [Dreisewerd u. a. (2005)]. Abbildung 2.7 zeigt den schematischen Ablauf, einer Kopplung der DC mit der IR-MALDI-o-TOF MS.

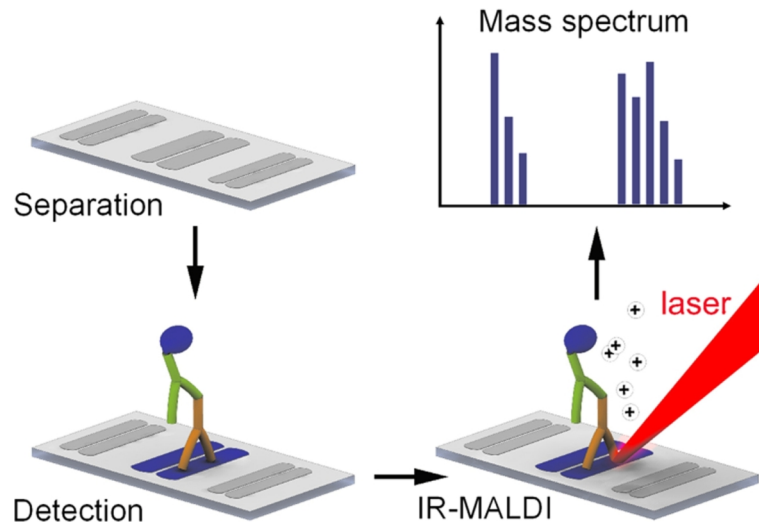


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der DC-IR-MALDI-o-TOF MS-Technik zur Charakterisierung von immundetektieren GSL. Nach der Dünnschichtchromatographie erfolgt der Overlay-Assay mit Primärantikörpern zur spezifischen Detektion eines GSLs. Mittels alkalischer Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper lässt sich durch einen Farbstoff (BCIP) der GSL-Primärantikörperkomplex sichtbar machen. Nach Ablösen des Fixativs (Plexigum) wird die Flüssigmatrix (Glycerin) auf die zu messende Position auf der DC-Platte aufgebracht und mit Hilfe eines IR-Lasers dann die entsprechende Probe direkt auf der Kieselgelplatte desorbiert und zeitgleich ionisiert. (Quelle: Distler u. a. (2008a))

Das Flugrohr als Massenanalysator ist beim IR-MALDI-o-TOF orthogonal (rechtwinklig) angebracht. Beim axial angebrachten TOF erhalten die Ionen, die sich an der Oberfläche des Matrix-Analyt-Kristalls befinden, durch den früheren Eintritt in das elektrische Feld eine schnellere Beschleunigung als die Ionen, die sich in den unteren Teilen des Kristalls befinden. Dem orthogonalen TOF ist ein Hexapol vorgeschaltet, in dem sich ein inertes Gas befindet, das die Molekülonen abbremst. Eine Fragmentierungsreaktion, wie bspw. beim ESI Q-TOF, wird dadurch umgangen, dass der Druck des Gases wesentlich niedriger ist. Die auf diese Weise „gesammelten“ Ionen gelangen dann in ein um 90° gedrehtes elektrisches Feld. So erhalten dann mehrere Ionen gleichzeitig eine identische Beschleunigungsenergie und treffen bei identischem Masse-zu-Ladungsverhältnis gleichzeitig am Detektor auf. Einer Signalverbreiterung, die durch zeitlich unterschiedliches Auftreffen von Ionen mit gleichem Masse-zu-Ladungsverhältnis erfolgt, wird damit entgegengewirkt und es werden zudem stärkere Signale erzeugt. Aus einem Massenspektrum kann dann wieder auf die Molekülmasse der Ionen geschlossen werden [Dreisewerd u. a. (2005), Distler u. a. (2008a)].

3 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Nierenkarzinomgewebe und Pankreaskarzinomzelllinien auf die Expression von GSL-Rezeptoren für Lektine und Toxine, die als potentielle Anti-Tumor Mittel gelten, zu untersuchen. Im Fall von Nierenkarzinomgeweben diente jeweils korrespondierendes gesundes Vergleichsgewebe als Referenz. Mittels differentieller Expressionsanalyse sollte eine Tumorassoziation nachgewiesen werden.

Die Expression des (r)Viscumin-Rezeptors Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc-R (CD75s) sollte bei 20 Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben immunchemisch und massenspektrometrisch analysiert werden. Dazu sollten die GSL aus den Geweben extrahiert und der Gehalt an CD75s mittels DC-Overlay-Assay bestimmt werden, um festzustellen, ob es sich beim (r)Viscuminrezeptor um eine tumorassoziierte Struktur handelt. Auch die isomere Struktur Neu5Ac α 3Gal β rGlcNAc-R war Gegenstand dieser Arbeit und sollte ebenfalls auf ihre Expression in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben untersucht werden. Die Vorläuferstruktur Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer (nLc4Cer) sollte ebenfalls auf die differentielle Expression untersucht werden, um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen der nLc4Cer-Expression und dem Auftreten von CD75s- und iso-CD75s-Strukturen besteht.

Ein weiteres GSL, das als Rezeptor für ein adjuvante Therapie von Interesse ist, ist das Gb3Cer/CD77. Der hochaffine Shiga Toxin-Rezeptor, sowie die um eine Galaktose verlängerte Struktur Gb4Cer, die ebenfalls eine Affinität zu Shiga Toxin zeigt, sollte im Fall von Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben untersucht werden. Dazu war wiederum der DC-Overlay-Assay vorgesehen. Durch massenspektrometrische Analyse mittels nanoESI Q-TOF und IR-MALDI-o-TOF sollten sämtliche Strukturen zudem noch identifiziert und charakterisiert werden.

Sieben Pankreaskarzinomzelllinien sollten auf ihre Reaktion bezüglich (r)Viscumin untersucht werden. Mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassays waren dazu Viabilitätsassays mit Viscumin bzw. rViscumin behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen vorgesehen. Weiterhin sollte mittels lektinvermittelter Immunfluoreszenz der Rezeptor auf den Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Glykosphingolipidanalytik

4.1.1 Vorbereitung

Reinigung der Glasgefäße

Mögliche Verunreinigungen der Glasgefäße würden sich störend auf die Dünnschichtchromatographie und die massenspektrometrischen Analysen auswirken. Daher werden die Glasgefäße einer speziellen Reinigungsprozedur unterzogen. Die gespülten Glaskolben werden zu zwei Dritteln mit Methanol befüllt und für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gehängt. Die 10 mL Schraubdeckelröhrchen (SDR), die zur Lagerung der GSL-Rohextrakte dienen, und die 1,2 mL SDR, die für die Probenaufbereitung zur massenspektrometrischen Analyse gebraucht werden, werden über Nacht in mit KOH gesättigtes Methanol gegeben, mit deionisiertem Wasser abgekocht und mit Methanol im Ultraschallbad für 20 Minuten beschallt.

4.1.2 Glykosphingolipidextraktion aus Gewebe

Mit Hilfe eines Skalpells werden die Gewebeproben auf einer bei -20°C gekühlten Glasplatte zerkleinert und in ein zuvor gewogenes SDR überführt. Nach einer weiteren Gewichtsbestimmung des SDRs wird aus der Differenz das Nassgewicht der Gewebeprobe ermittelt. Anschließend werden 2 mL Chloroform/Methanol (1/2) in das SDR gegeben und mit Hilfe des Homogenisators Polytron PT 1200, Spitzentyp PT-DA 1205/2 bzw. PT-DA 1207/2 (Kinematica AG, Littau, Schweiz) für 2 Minuten homogenisiert und daraufhin für 1 Minute mit dem Vortex Genie 2 (Bender & Hohbein AG, Zürich, Schweiz) gemischt. In weiteren 2 mL Chloroform/Methanol (1/2, v/v) wird die Spitze des Homogenisators für ebenfalls 2 Minuten gereinigt, um verbliebene Gewebereste nicht zu verlieren. Nach einminütigem Mischen mit dem Vortex Genie 2 werden die Proben vereinigt und für 5 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Nachdem die Probe für 2 Minuten bei 60% (~ 3000 rpm) zentrifugiert wurde, wird der Überstand in einen 50 mL Spitzkolben überführt. Zum Sediment werden 4 mL Chloroform/Methanol (1/1) gegeben, 1 Minute mit dem Vortex Genie 2 gemischt und 5 Minuten im Ultraschallbad beschallt. Danach wird erneut für 2 Minuten bei 60% zentrifugiert und der Überstand in den Glaskolben überführt. Es erfolgt eine weitere

Extraktion nach dem gleichen Prinzip allerdings mit Chloroform/Methanol (2/1, v/v). Als letzter Schritt wird die nun im Spitzkolben befindliche Probe am Rotationsverdampfer (Heidolph VV 2001, Kehlheim) bei 37°C und 210 UpM eingedampft.

4.1.3 Alkalische Hydrolyse

Nach der GSL-Extraktion befinden sich neben den GSL unter anderem noch Phospholipide und andere Esterlipide, die den größten Teil der Lipide einer Zelle ausmachen, im Extrakt. Diese werden mit Hilfe einer milden alkalischen Hydrolyse entfernt, wobei die gegenüber der Amidbindung der GSL schwächeren Esterbindung z.B. der Phospholipide aufgebrochen werden. Dazu werden zum eingedampften Extrakt 4 mL 1 N NaOH gegeben und der Spitzkolben wird für 1 Stunde bei 37°C am Rotationsverdampfer rotiert. Anschließend wird das Natriumhydroxid mit 400 μ L 10 N HCl neutralisiert.

4.1.4 Dialyse gegen deionisiertes Wasser

Durch die Neutralisation des NaOH mit HCl entstehen NaCl und Wasser. Zur Salzentfernung wird der Extrakt nach der alkalischen Hydrolyse für 2 Tage gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Hierzu wird eine Dialysemembran der Firma Medicell International Ltd. (London, UK) mit einer molekularen Ausschlußgröße von 12 kDa bis 14 kDa verwendet. Das Wasser wird zweimal täglich gewechselt. Nach der Dialyse wird die Probe in einen 50 mL Spitzkolben gegeben und erneut mit dem Rotationsverdampfer bei 37°C und 210 UpM eingedampft.

4.1.5 Dünnschichtchromatographie

Laufmittel:

Laufmittel für neutraleGSL (LM1)	Chloroform/Methanol/Wasser (120/70/17, v/v/v) +20 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$
-------------------------------------	---

Laufmittel für Ganglioside (LM2)	Chloroform/Methanol/Wasser (120/85/20, v/v/v) +20 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$
-------------------------------------	---

GSL-Referenzen:

Neutrale GSL aus humanen Erythrozyten:	Laborjournalcode: JM06/300-3 bzw. JM10/80
Hauptkomponenten:	MHC Lc2Cer Gb3Cer Gb4Cer
Konzentration:	$5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
Humane Granulozyten Ganglioside:	Laborjournalcode: JM07/7-1
Hauptkomponenten:	GM3 IV ³ nLc4Cer IV ⁶ nLc4Cer VI ³ nLc6Cer VI ⁶ nLc6Cer sLe ^X -Ganglioside
Konzentration:	$2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
Neutrale GSL humaner Granulozyten:	Laborjournalcode: HD02/188
Hauptkomponenten:	Lc2Cer nLc4Cer neutrale Le ^X -GSL
Konzentration:	$2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

Die DC kommt bei der Analyse der Rohextrakte der GSL zum Einsatz. Dazu werden gebrauchsfertige DC-Platten mit einer Matrix aus Kieselgel 60 und Glas als Trägermaterial verwendet. Die Platten (Kieselgel 60 HPTLC-Fertigplatten, 10 x 10 cm, 0,2 mm Schichtdicke, Art. 5633) werden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Mit Hilfe des Probenapplikators Linomat IV (CAMAG, Muttenz, Schweiz) werden die Proben auf die Platten aufgetragen und nach kurzer Trocknung in den mit Laufmittel befüllten Chromatographietank gestellt. Die Laufmittelzusammensetzung variiert je nach untersuchten GSL. Neutrale GSL werden im Laufmittel LM1 (s. Abschnitt 4.1.5) und Ganglioside im Laufmittel LM2 oder LM3 (s. Abschnitt 4.1.5) für 15 - 20 Minuten chromatographiert.

Orcin färbt jegliche Art von Zucker an und eignet sich daher sowohl zur Analyse von neutralen GSL als auch von Gangliosiden. Nach der Chromatographie lässt man die DC-Platten 5 Minuten bei Raumtemperatur trocknen. Danach werden sie für weitere 5 Minuten in einen Exsikkator über P_2O_5 unter Ölpumpenvakuum getrocknet, bevor sie für 15 Sekunden in die Orcinollösung getaucht werden. Nach Abtropfen überschüssiger Lösung werden die DC-Platten auf eine Heizplatte (CAMAG, Muttenz, Schweiz) gelegt und bei $100^\circ C$ so lange entwickelt, bis die Färbung der Banden sichtbar wird. Die Dokumentation erfolgt über einen Flachbettscanner (HP Scanjet, Hewlett-Packard, Palo Alto, Ca, USA).

4.1.8 Immundetektion

Puffer:

Glycinpuffer	0,1 M Glycin 1 mM $ZnCl_2$ 1 mM $MgCl_2$ in Milli-Q Wasser, pH 10,4
--------------	--

Lösungen:

PBS	140 mM NaCl 8 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4 0,02% (w/v) NaN_3 in Milli-Q Wasser, pH 7,2
Lösung A	1% (w/v) bovines Serumalbumin (BSA) (lipidfrei, Fraktion V, Serva, Heidelberg) in PBS
Lösung B	0,05% (v/v) Tween 21 (ICI, Surfactans, Wilton, UK) in PBS
Substratlösung	0,05% (w/v) BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) (Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe) in Glycinpuffer

Plexigumlösung 0,5% Polyisobutylmethacrylat
 (Plexigum P28, Röhm, Darmstadt)
 in wasserfreiem n-Hexan

Antikörper: Die für den Overlay-Assay eingesetzten Antikörper sind in den Tabellen 4.3 und 4.4 aufgeführt.

Durchführung eines Overlay-Assays

Antikörper sind geeignet, um spezifische Strukturen wie Kohlenhydratepitope auf GSL zu detektieren. Nach der Chromatographie werden die DC-Platten fünf Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wird restliche Feuchtigkeit durch Trocknung für 40 Minuten in einem Exsikkator über P_2O_5 unter Ölpumpenvakuum entfernt, bevor sie mit Plexigum beschichtet werden. Dazu werden ca. 12 mL der Plexigumlösung in einen Tank gegeben und die Platten hineingestellt. Die Platten verbleiben für 30 Minuten in der Lösung und werden nach kurzer Kontrolle erneut für 20 Minuten in die Lösung gestellt. Es folgt eine Inkubation mit 80 mL PBS bei 37°C über Nacht im Brutschrank.

Am nächsten Tag erfolgt die eigentliche Immundetektion. Dazu werden die Platten zuerst mit Lösung A für 15 Minuten abgesättigt. Darauf wird der Primärantikörper bei ganzen Platten in 40 mL Lösung A verdünnt (s. Tabelle 4.3), auf die DC-Platten gegeben und für 60 Minuten inkubiert. Es folgen drei Waschschritte mit je 40 mL Lösung B. Nun wird der Sekundärantikörper in Lösung A (40 mL, 1:2000) verdünnt, auf die Platten gegeben und wiederum für 60 Minuten inkubiert. Danach wird wieder drei Mal mit 40 mL Lösung B gewaschen und einmal mit 40 mL Glycinpuffer gespült. Anschließend wird die Substratlösung (0,05% BCIP in Glycinpuffer) auf die Platte gegeben und solange inkubiert, bis die alkalische Phosphatase, die an den Sekundärantikörper konjugiert ist, das Substrat in einen blauen Farbstoff umgewandelt hat. Die Dauer der Färbereaktion ist abhängig von der Menge an eingesetzter Probe und der Menge und Art des Primärantikörpers. Gestoppt wird die Reaktion durch Waschen mit Glycinpuffer.

Sämtliche Volumenangaben beziehen sich auf einen Overlay-Assay mit ganzen Platten (10 x 10 cm). Bei halben Platten (5 x 10 cm) müssen die Volumina entsprechend halbiert werden.

Zur Dokumentation werden die Platten mit einem Flachbettscanner (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) eingescannt. Mit dem Programm TINA 2.09d (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt) werden die Extinktionswerte der gefärbten Banden bestimmt.

4.1.9 Antikörper:

Tabelle 4.3: Primärantikörper

Antikörper	Epitop	Spezies	Isotyp	Klonalität	Klon	Referenz
AK2-6	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc-R (CD75s)	Huhn	IgY (IgG)	polyklonal	JM06/280-5	Meisen u. a. (2003) Müthing u. a. (2005)
AK2-3	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc-R (iso-CD75s)	Huhn	IgY (IgG)	polyklonal	JM06/280-4	Meisen u. a. (2003)
anti-nLc4Cer	Gal β 4GlcNAc-R	Huhn	IgY (IgG)	polyklonal	JM06/149-3	Müthing u. a. (1999)
anti-Gb3Cer	Gal α 4Gal β -R (CD77)	Huhn	IgY (IgG)	polyklonal	JM06/298-1	Müthing u. a. (1999)
anti-Gb4Cer	GalNAc β 3Gal α 4Gal β -R	Huhn	IgY (IgG)	polyklonal	JM06/206	Müthing u. a. (1999)
anti-Stx	Shiga Toxin 1 (Stx1)	Maus	IgG1	monoklonal	VT109/4-E9b	Sifin, Berlin
anti-ML-I	MLA ^{a,b}	Maus	IgG1	monoklonal	5F5	Sifin, Berlin
anti-Le ^X	Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc-R (CD15)	Maus	IgG	monoklonal	80H5	Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA

^aA-Untereinheit des ML-I

^breagiert auch mit der A-Untereinheit des rViscumins

Tabelle 4.4: Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugat	Referenz
Kaninchen anti-Huhn IgY (IgG)	Alkalische Phosphatase	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Ziege anti-Maus IgG & IgM	Alkalische Phosphatase	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Ziege anti-Maus IgG	Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe

Lektine und Toxine:

Tabelle 4.5: Lektine und Toxine

Toxin/Lektin	Referenz
Shiga Toxin 1 (Stx 1)	Dr. M. Bielaszwska, Institut für Hygiene, Universität Münster
ML-I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
rViscumin	BRAIN GmbH, Zwingenberg

4.2 Massenspektrometrie

4.2.1 Extraktion der Glykosphingolipide aus dem Kieselgel

Lösungen:

Solvent A Chloroform/Methanol/Wasser (30/60/8, v/v/v)

Um die DC-getrennten GSL einer massenspektrometrischen Analyse mit nanoESI Q-TOF zuführen zu können, müssen diese zuerst aus dem Kieselgel extrahiert werden [Meisen u. a. (2004)]. Dazu muss zunächst das Plexigum durch dreimaliges Tauchen in Chloroform entfernt werden. Die immunpositiven Banden werden mit Hilfe eines Skalpell abgekratzt und in ein konisches SDR überführt. Das SDR wird nach Zugabe von 100 μL Solvent A für 30 Minuten ins Ultraschallbad gehängt, mit dem Vortex Genie 15 Sekunden gemischt und für 2 Minuten bei ~ 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dann in ein kleines konisches SDR überführt und unter N_2 -Begasung bei 37°C eingengt. Diese Extraktionsprozedur inklusive Einengen wird zwei weitere Male wiederholt. Die extrahierten GSL wurden in 50 μL Methanol wieder aufgenommen und mittels nanoESI Q-TOF analysiert.

4.2.2 NanoESI Q-TOF-MS

Die strukturelle Charakterisierung der GSL erfolgte mit einem nanoESI Q-TOF Massenspektrometer der Firma Micromass (Waters, Milford, MA, USA, mit ZSprayTM-Ionenquelle). Mit einem Kapillarenzieher der Firma Hilgenberg (Masfeld) werden Kapillaren aus Borsilikatglas hergestellt, in die für eine Messung 10 μL einer Probe eingefüllt werden. Hochspannung wird mittels eines STahldrahtes an die Lösung angelegt. Alle Messungen erfolgten im Potitivionenmodus. Die Kapillarspannung wird auf 1100 V gesetzt,

die Konusspannung auf 40 V. Als Desolvatisierungsgas dient Stickstoff. Um Experimente im MS/MS-Modus durchzuführen, wird das zu untersuchende Mutterion mit Hilfe eines Quadrupols selektiert. In der Kollisionskammer wird mit Hilfe eines Kollisionsgases, in diesem Fall Argon, und Energie das ausgewählte Ion fragmentiert. Dieser Prozeß wird *collision induced dissociation*, kurz CID, genannt. Der Druck des Kollisionsgases wurde auf 15 psi gesetzt und die Kollisionsenergie zwischen 30 und 70 eV variiert. Mit Hilfe der erhaltenen Fragmente kann auf die Struktur der Mutterionen geschlossen werden. Die Nomenklatur der Fragmente erfolgte gemäß Domon und Costello [1988].

4.2.3 IR-MALDI-o-TOF-MS

Puffer:

Ammoniumacetatpuffer	10 mM Ammoniumacetat in Milli-Q Wasser, pH 3,6
----------------------	---

Zunächst werden die DC-Platten in 40 mL 10 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 3,6) für 2 Stunden bei RT inkubiert und anschließend getrocknet. Das Plexigum wird durch dreimaliges Tauchen in Chloroform entfernt und die Platten im Anschluß kurz an der Luft getrocknet. Die Platte wird dann in ca. 1 cm breite und maximal 4 cm lange Stücke zerschnitten und diese mittels doppelseitigen Klebepunkten in die Vertiefung des Probenhalters geklebt. Auf die gefärbten Banden werden dann einige Tropfen (je 0,3 μL) Glycerin als Flüssigmatrix gegeben. Die Experimente wurden mit einem modifizierten Prototypen der Firma MDS Sciex (Concord, ON, Kanada) mit einem ER:YAG-Laser (Bioscope, BiOptics Laser Systems AG, Berlin) durchgeführt [Dreisewerd u. a. (2005)]. Mittlerweile sind o-TOF Massenspektrometer auch in einer kommerziellen Version, wie z.B. das prOTOF 2000 von Perkin Elmer (Waltham, MA, USA), erhältlich. Abbildung 4.1 zeigt eine schematische Abbildung eines o-TOF Massenspektrometers.

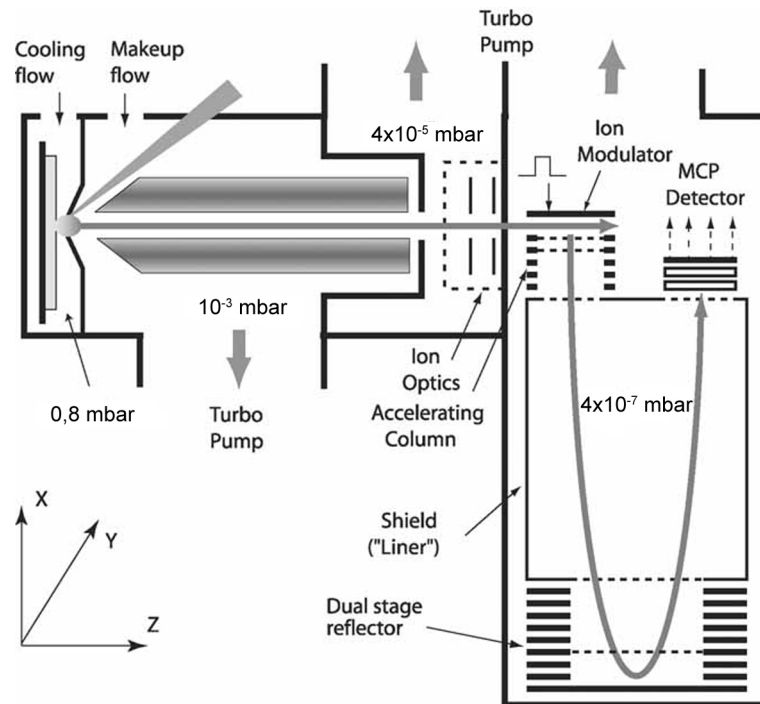


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung eines o-TOF Massenspektrometers . In einer Stickstoffatmosphäre bei einem Druck von 0,8 mbar erfolgt die Ionisierung. Der Stickstoff dient als Stoßgas zur Abbremsung und Stabilisierung der Ionen (*collisional cooling*). Nach Fokussierung in einen Quadrupol gelangen die Ionen in den orthogonal angebrachten Massenanalysator. Die in der Abbildung angegebenen Drücke entsprechen den für die massenspektrometrischen analysen mit DC-IR-MALDI-o-TOF (Quelle: modifiziert nach Loboda u. a. (2003))

Der ER:YAG-Laser hat eine Pulsdauer von 100 ns bei einer Wellenlänge von $2,94 \mu\text{m}$, wodurch die Hydroxylgruppen der Glycerinmatrix angeregt werden. Die Massenauflösung des Prototyps liegt bei etwa 10.000 und die Massengenauigkeit bei ca. 20 ppm. Der Infrarotlaser wird durch ein zusätzliches Vakuumfenster in die Ionenquelle eingekoppelt und mittels plankonvexen Linsen mit einer Fokusgröße von ca. $250 \mu\text{m}$ im Durchmesser auf die Probe gerichtet. Eine CCD-Kamera ermöglicht die Visualisierung der Probe mit einer Auflösung von bis zu ca. $10 \mu\text{m}$. In der Ionenquelle liegt eine Stickstoffatmosphäre mit einem Druck von ca. 0,8 mbar an. Die Beschleunigungsspannung des Massenanalysators beträgt 10 kV. Alle Messungen wurden im Positivionenmodus durchgeführt.

Die Kombination des DC-Overlay-Assays mit der IR-MALDI-o-TOF MS ermöglicht eine Ionisierung der GSL direkt auf der DC-Platte [Distler u. a. (2008a)]. Dadurch werden zeitaufwendige Extraktionsschritte, die zudem mit Probenverlust einhergehen, vermieden.

4.3 Zellkulturtechnik

4.3.1 Zelllinien

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um Pankreaskarzinomzelllinien, die vom molekularbiologischen Labor der Klinik- und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Leitung Prof. Dr. Haier, zur Verfügung gestellt wurden.

Alle Zelllinien können aber bei Stammsammlungen wie der *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA) oder der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen werden.

Capan-2

Capan-2 (ATCC-Nr.: HTB-80) ist eine Adenokarzinomzelllinie des Pankreas. Sie entstammt dem primären Pankreaskarzinom eines 56-jährigen Mannes aus dem Jahr 1980 [Fogh u. a. (1980)]. Die polygonalen, in Kultur adhärent wachsenden Zellen ergeben im Nacktmausmodell gut differenzierte Tumoren.

HPAF-II

HPAF-II (ATCC-Nr.: CRL-1997) ist eine Pankreaskarzinomzelllinie, die aus der peritonealen aszitischen Flüssigkeit eines 44-jährigen Mannes mit primärem Pankreaskarzinom und Metastasen in Leber, Zwerchfell und Lymphknoten im Jahr 1982 generiert wurde [Metzgar u. a. (1982)]. HPAF-II ist eine spontane Variante mit grenzenloser Replikationsfähigkeit und ging aus einer statischen HPAF-I-Kultur hervor. HPAF-II-Zellen sind pleomorph und könnten in Kultur spontan differenzieren.

MIA PaCa-2

Bei MIA PaCa-2 (ATCC-Nr.: CRL-1420) handelt es sich um eine Zelllinie eines Primärtumors des Pankreas eines 65-jährigen Mannes und wurde 1975 etabliert [Yunis u. a. (1975)]. Der Differenzierungsgrad wird als undifferenziert angegeben. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 40 Stunden.

PANC-1

PANC-1 (ATCC-Nr.: CRL-1469) stammt aus einer Pankreatico-Duodenectomy eines 56-jährigen Mannes aus dem Jahr 1975 [Lieber u. a. (1975)]. Der Tumor lag im Pankreaskopf und drang bereits in die Wand des Duodenum vor. Die pathologische Analyse ergab, dass es sich bei dem Pankreaskarzinom um einen Tumor mit undifferenziertem Differenzierungsgrad handelte. Perineurale Invasion und Metastasen in einen peripankreatischen

Lymphknoten wurden ebenfalls diagnostiziert.

Pa-Tu-8902

Pa-Tu-8902 (DSMZ-Nr.: ACC 179) wurde im Jahre 1985 aus dem primären duktalem Adenokarzinom des Pankreas einer 44-jährigen Frau generiert [Elsässer u. a. (1993)]. Die epithelialen Tumorzellen wachsen in Kultur adhärent als Monolayer und sind in der Lage in Nacktmäusen Metastasen zu induzieren. Der Differenzierungsgrad wird als mäßig bis schlecht angegeben und die Verdopplungszeit liegt bei 25 - 40 Stunden..

Pa-Tu-8988S und Pa-Tu-8988T

Die Schwesternzelllinien Pa-Tu-8988S (DSMZ-Nr.: ACC 204) und Pa-Tu-8988T (DSMZ-Nr.: ACC 162) wurden aus einer Lebermetastase eines primären Pankreasadenokarzinoms einer 64-jährigen Frau 1985 die Zelllinie Pa-Tu-8988S etabliert [Elsässer u. a. (1992)]. Während der Differenzierungsgrad für Pa-Tu-8988S als gut beschrieben ist, ist er bei Pa-Tu-8988T als schlecht angegeben. Beide Zelllinien wachsen ausschließlich adhärent als Monolayer. Die Verdopplungszeit liegt bei 40 - 60 Stunden für Pa-Tu-8988S und bei ca. 22 Stunden bei Pa-Tu-8988T.

Pa-Tu-8988T induziert im Gegensatz zur ihrer Schwesternzelllinie Pa-Tu-8988S im Nacktmausmodell Tumoren mit stark tubulärer Struktur und polarisierten Zellen mit definierten apikalen und basolateralen Plasmamembranen. Dabei liegen die Organellen meist im Plasma einer Zelle. Pa-Tu-8988S zeigt solche Merkmale nicht, sondern führt im Nacktmausmodell zu soliden gut abgrenzbaren Tumoren. Allerdings metastasiert Pa-Tu-8988S in umliegende Gewebe, was Pa-Tu-8988T nicht der Fall ist.

In Tabelle 4.6 sind alle Pankreaskarzinomzelllinien mit Angabe des Ursprungs, des Differenzierungsgrads, der Stammsammlung und der Referenz nochmals zusammengefasst.

4.3.2 Zellkultivierung

Das verwendete Medium DMEM (engl. *Dulbeccos's Modified Eagle Medium*, Art. BE12-614F) und PBS (Art. BE17-516F) wurden von LONZA (Basel, Schweiz) bezogen. Das Enzym Accutase (Art. L11-007), das zum Ablösen der Zellen von den Böden der T-Flaschen verwendet wird, stammt von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich).

Tabelle 4.6: Verwendete Pankreaskarzinomzelllinien

Zelllinie	Ursprung	Differenzierung	Stamm-sammlung	Referenz
Capan-2	Primärtumor	gut	ATCC ^a HTP-80	Fogh u. a. (1980)
HPAF-II	Metastase (Aszites)	mäßig	ATCC CRL-1997	Fogh u. a. (1980)
MIA PaCa-2	Primärtumor	undifferenziert	ATCC CRL-1420	Yunis u. a. (1975)
PANC-1	Primärtumor	mäßig bis schlecht	ATCC CRL-1469	Lieber u. a. (1975)
Pa-Tu-8902	Primärtumor	mäßig bis schlecht	DSMZ ^b ACC 179	Elsässer u. a. (1993)
Pa-Tu-8988S	Metastase (Leber)	gut	DSMZ ACC 204	Elsässer u. a. (1992)
Pa-Tu-8988T	Metastase (Leber)	schlecht	DSMZ ACC 162	Elsässer u. a. (1992)

^aAmerican Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

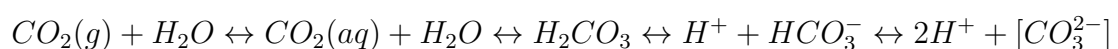
^bDeutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

4.3.2.1 Kulturmedium

Die Pankreaszellen werden DMEM kultiviert, das mit 5 mL 200 mM L-Glutamin pro 500 mL Medium und fötalem Kälberserum (FCS, engl. *Fetal Calf Serum*) supplementiert wird. Das L-Gutamin (Art. M11-004) und das FCS (Art. a15-551) wurden von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) bezogen.

4.3.2.2 Kultursystem

Die Pankreaszellen werden in Einmal-Kultursystemen gezüchtet. Die Gewebekulturflasche (engl. *tissue flask*, T-Flasche) ist ein Kultursystem, das in Brutschränken betrieben wird. In diesen wird zum Einen die Temperatur auf 37°C gehalten, was für die meisten tierischen Zellen die optimale Wachstumstemperatur ist. Zum Anderen gewährleistet ein integriertes Wasserbad eine hohe Luftfeuchtigkeit, um Verdunstungseffekte zu minimieren. Die T-Flaschen müssen während der Inkubation im Brutschrank leicht geöffnet sein, damit 8%ige CO₂-Atmosphäre in die T-Flaschen gelangen kann. Alternativ kann man auch T-Flaschen verwenden, die einen in den Deckel integrierten Sterilfilter haben. Durch den Gasaustausch der Atmosphäre mit dem Kulturmedium, stellt sich über ein Natriumhydrogencarbonat-Puffersystem der physiologische pH-Wert von 7,40 ein, der über nachfolgende Formel berechnet werden kann:



T-Flaschen bestehen aus Polystyrol und haben eine durch Gasionisation hydrophilisierte Oberfläche, was den Zellen die Adhäsion ermöglicht. In dieser Arbeit wurden Varianten mit 25, 75 und 175cm² Bodenfläche und einem korrespondierenden Kulturvolumen von 10, 30 und 50 mL eingesetzt. Die 25 cm²- und 75 cm²-T-Flaschen (T-25, Art. bzw. T-75, Art.) wurden von Nunc bzw. Thermo Fisher Scientific (Rochester, NY, USA) und die 175 cm²-T-Flaschen (T-175, Art. 3292) wurden von Corning Incorporated (Corning, NY, USA) bezogen.

Der Brutschrank stammen von der Firma Sanyo (Akato, Japan).

4.3.2.3 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Die Kryoröhrchen werden zum Antauen kurz in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad gehalten, bis am inneren Rand des Kryoröhrchens ein Flüssigkeitsfilm entsteht. Der Inhalt des Kryorörchens (1 mL) wird dann in ein mit 9 mL Kulturmedium befülltes 13 mL-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei XXX g zentrifugiert. Auf diese Weise wird das zytotoxische DMSO entfernt. Der Überstand wird verworfen, das Zellsediment in 10 mL auf 37°C temperiertes Medium resuspendiert und in eine 25 cm²-T-Flasche gegeben.

4.3.2.4 Passagieren

Adhärente Zelllinien stellen ihre Proliferation nach Erreichen der Konfluenz weitestgehend aufgrund von Kontaktinhibition ein, wenn keine Wachstumsfläche mehr zur Verfügung steht. Daher sollten die Zellen möglichst vor Erreichen der Konfluenz passagiert werden. Vor der Passagierung wird das Kulturmedium abgenommen und verworfen und der Zellrasen mit ca. 0,2 mL · cm⁻² temperiertem PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Zusätzlich werden zweiwertige Ionen, wie Calcium²⁺ und Magnesium²⁺, die die Accutase inhibieren, abgereichert. Das PBS wird entfernt und das Enzym Accutase zugegeben. In T-25 Flaschen wird mit 1 mL, in T-75 Flaschen mit 3 mL und in T-175 Flaschen mit 5 mL Accutase gearbeitet. Die T-Flaschen werden kurz geschwenkt, damit die Enzymlösung den gesamten Zellrasen bedeckt. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 8 Minuten im Brutschrank. Unter Umständen muss ein Zellschaber zu Hilfe genommen werden, um die Zellen vollständig vom Flaschenboden zu lösen. Die Zellsuspension wird dann mit einem äquivalenten Volumen Medium zur Inhibierung des Enzyms gemischt und einige μ L in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, um die Zellzahl zu bestimmen. Zur Zeitersparnis kann auch eine Verdünnung der Zellsuspension hergestellt werden, um eine geringere Anzahl

an zu zählenden Zellen zu erhalten. Der Verdünnungsfaktor muss dann natürlich in die Berechnung der Zellzahl einfließen.

Die Zählkammer ist ein modifizierter Objektträger mit einer eingeschliffenen Netzeinteilung, die es erlaubt, in einem definierten Volumen die Zellzahl zu ermitteln und so die Zelldichte mittels nachfolgender Formel zu bestimmen:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate}} \cdot 10^4 = \text{Zelldichte [Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}\text{]}$$

Im Anschluß werden die Zellen gemäß der empfohlenen Zellkonzentration eingesät. Einfacher und sehr viel praktikabler ist es allerdings, ein Splitverhältnis zu ermitteln. Nach mehrmaligem Passagieren und Bestimmen der Zelldichte ergibt sich normalerweise immer wieder das gleiche Volumen an Zellsuspension, das eingesetzt werden muss. Die empfohlenen Zellkonzentrationen zur Einsaat und die Zelllinien-spezifischen Splitverhältnisse können der Tabelle 4.6 entnommen werden.

4.3.2.5 Kryokonservierung

Der Kryokonservierungsprozess beginnt mit der Ernte von Zellen durch Behandlung des Zellrasens mit Accutase. Nach einer Auszählung wird eine Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹ eingestellt. Das Zellsediment wird in kaltem Kryokonservierungsmedium, das zur Verhinderung von membranschädigenden Eiskristallen 10% (v/v) DMSO enthält, resuspendiert. Das Einfriermedium erhält man durch Zugabe von 2 mL sterilfiltriertem DMSO zu 8 mL Medium, was eine 20%ige DMSO-Lösung ergibt. Die Zellsuspension wird mit dem gleichen Volumen Kryomedium versetzt und je 1 mL dieses Gemischs in beschriftete und mittels eines bei -20°C gelagerten Teflonständers vorgekühlte 2 mL-Kryoröhrchen (Cryo.sTM, Art. 122279, Grainer Bio One, Frickenhausen) aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden dann in ein auf -20°C vorgekühltes Kryoeinfriergerät („Mr. Frosty“, Thermo Fisher Scientific, Rochester NY, USA) gegeben, das 70%iges Propanol enthält und somit ein gleichmäßiges Einfrieren ermöglicht. Die Kammer wird dann in einen -70°C-Gefrierschrank gegeben, in dem die Zellen für kurze Zeit aufbewahrt werden können. Für eine dauerhafte Lagerung werden sie allerdings nach einem Tag in die Gasphase eines Stickstofftanks bei ca. -187°C überführt. Dort können tiefgefrorene Zellen für mehrere Jahre gelagert werden.

4.3.3 Proliferationsassay mit WST-1

Das leicht rötliche, wasserlösliche Tetrazoliumsalz (WST, engl. *Water-Soluble Tetrazolium*, Roche, Mannheim) wird von Succinat-Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen zu einem dunkelroten, wasserunlöslichen Formazansalz reduziert. Succinat-Dehydrogenasen befinden sich sowohl in Mitochondrien als auch im Zytoplasma der Zelle. Die Intensität der Färbung korreliert mit der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase und damit auch mit der Stoffwechselaktivität der Zelle. Somit ist dieses Reagenz dazu geeignet, um sowohl die Proliferation von Zelllinien in Gegenwart von Toxinen bzw. Lektinen als auch die Zytotoxizität der Toxine auf die Zellen zu bestimmen.

Dazu werden die Zellen in einer 96-well Mikrotiterplatte (MT) von NUNC (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) in 100 μL Medium pro Kavität und in einem Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^4$ bis $3 \cdot 10^4$ eingesät und für 24 Stunden bei 37°C und 8% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Eine Spalte bleibt dem Blindwert (engl. *blank*) vorbehalten und wird nur mit Medium befüllt. Im Anschluß an die Inkubation wird nun das jeweilige Lektin in 1:10-Verdünnungsstufen, beginnend mit $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, in die Kavitäten pipettiert. Als Negativkontrolle dient eine Spalte mit Zellen, die nicht mit dem Lektin behandelt werden. Als Positivkontrolle werden die Zellen einer Spalte mit Triton X-100 noch vor der Inkubation mit dem Lektin für 1 Stunde behandelt, was zu einem hundertprozentigem Absterben der Zellen führt. Als Blindwert dient Medium. Die MT werden dann für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 8% CO_2 inkubiert. Danach werden dann in jede Kavität 10 μL des WST-1 Reagenz gegeben und die Platten für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Extinktionsmessungen erfolgen mit Hilfe eines ELISA-Readers (Dy nex Technologies, Chantilly, USA). Dabei erfolgt die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenzwert wird aus einer Messung bei einer Wellenlänge von 630 nm bestimmt.

4.3.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ermöglicht den spezifischen Nachweis von Makromolekülen wie beispielsweise Rezeptoren und deren Verteilung auf Zellen und Geweben. In dieser Arbeit wird diese Methode zur Lokalisation der GSL-Strukturen CD75s und iso-CD75s in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben sowie für CD75s bei Pankreaskarzinomzelllinien eingesetzt. Alle Inkubationsschritte zur Durchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgen, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Lösungen:

Blockierlösung 5% BSA (w/v), sterilfiltriert

	0,2 % Fischhautgelatine (engl. <i>Fish Skin Gelatine</i>)
	1 μL unspezifischer Antikörper (Ziege Anti-Transferrin)
	in PBS
DAPI-Gebrauchslösung	1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dichlorid), (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)
	in PBS

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4.3 und 4.4 aufgeführt.

Durchführung:

Der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei Pankreaskarzinomzelllinien erfolgt in sogenannten *Chamber-Slides* von Lab TekTM (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Objektträger, auf denen Kunststoffkammern mittels Silikon aufgeklebt sind. In *4er-Slides* wird ein jeweils ein Arbeitsvolumen von 600 μL verwendet, in *8er-Slides* dementsprechend 300 μL . Die Zellen werden gemäß ihrer Proliferationsgeschwindigkeit in verschiedenen Konzentrationen eingesät, wobei eine Zelleinsaat von $3 \cdot 10^4$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$ bei schnellwachsenden Zelllinien bis $5 \cdot 10^4$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$ bei langsamwachsenden Zelllinien vorgenommen wird. Die Kulturkammern werden dann bei 37°C und 8% CO₂ für 24 Stunden bzw. nach optischer Kontrolle am Lichtmikroskop bis zu einer Konfluenz von 70% im Brutschrank inkubiert. Das Medium wird verworfen, und die Zellen werden einmal mit temperiertem PBS gewaschen. Mit 3,7%igem Paraformaldehyd (PFA) werden die Zellen auf den Objektträgern für 60 Minuten fixiert und im Anschluß einmalig mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper bzw. Lektine zu unterbinden, müssen die Kulturkammern mit der Blockierlösung für 120 Minuten bei RT oder bei 4°C über Nacht abgesättigt werden. Daraufhin wird der Primärantikörper bzw. das Lektin mit Lösung A (vgl. Puffer und Lösungen in 4.1.8) in geeigneter Verdünnung angesetzt und in die Kammern gegeben. Nach einstündiger Inkubation werden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper bzw. Primärantikörper ebenfalls in Lösung A verdünnt zugegeben wird. Nach einstündiger Inkubation erfolgt erneut der dreimalige Waschschrift mit PBS und im Falle des Lektins wird nun der Sekundärantikörper wiederum in geeigneter Verdünnung mit Lösung A auf die Zellen gegeben. Nachdem einstündiger Inkubation erfolgen wiederum drei Waschschriffe mit PBS. Im Anschluß erfolgt die Zugabe der DAPI-Gebrauchslösung und für weitere 15 Minuten und wiederum ein dreimaliger Waschschrift mit PBS. Zuletzt

werden die Rahmen der Kammern durch einfaches Abziehen von den Objektträgern gelöst und die Objektträger kurz an der Luft getrocknet. Mit Mounting Medium (Dianova GmbH, Hamburg) werden die Präparate eingedeckt.

Die Visualisierung der immungefärbten Zellen erfolgt mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axio Image A.1 mit dem Objektiv EC Plan-Neofluar (40x) und den Filtersätzen 17 und 21HE. Die Fluoreszenz wird mit der Schwarz-Weiß-CCD-Kamera Axio Cam MRM aufgenommen und mit der Software AxioVison (AxioVs40 V 4.6.3.0) prozessiert, so dass farbige Bilder ausgegeben werden. Alle Teile des Fluoreszenzmikroskops sowie die verwendete Software zur Aufnahme der Bilder stammen von Zeiss (Jena). Die weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

4.4 Tumordaten

Die Gewebeproben der Nierenkarzinome stammen von Patienten, denen der Primärtumor operativ entfernt wurde. Direkt nach der Entnahme wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Korrespondierende gesunde Kontrollproben wurden den jeweiligen Patienten an tumorfreien Gewebestellen entnommen, die sich in geringer Distanz zum Tumor befanden. Die Feuchtmassen der Gewebeproben lagen zwischen 44 mg und 716 mg.

In Tabelle 4.7 sind die pathologischen Daten der untersuchten Nierenkarzinomproben mit Klassifizierung nach dem TNM-System der UICC und dem Gewebefeuchtgewicht aufgeführt.

Tabelle 4.7: Pathologische Daten der Nierenkarzinome inklusive Gewebefeuchtgewichte der gesunden und malignen Nierengewebeproben

Patient	T ^a	N ^a	M ^a	UICC- Staging ^a	G ^a	Gewebefeuchtgewicht [mg]	
						Tumor	Normal
1	1a	X ^b	X ^b	X ^b	1	159,2	463,0
2	3a	0	X ^b	X ^b	2	524,3	679,9
3	3a	2	1	IV	2	267,6	716,0
4	1a	0	0	I	2	352,3	150,1
5	1b	0	1	IV	2	156,3	94,5
6	3b	0	0	III	2-3	654,0	398,0
7	1a	0	0	I	1-2	59,9	44,2
8	2	0	0	II	2	265,5	367,2
9	1b	0	0	I	2	197,9	56,5
10	3b	X ^b	X ^b	X ^b	2	118,1	466,3
11	3b	0	0	III	3	87,0	82,3
12	3a	0	0	III	2-3	496,0	661,6
13	1b	0	0	I	2	307,7	209,9
14	3	0	1	IV	3	415,1	127,5
15	3b	0	0	III	3	639,5	113,4
16	1	0	0	I	2	226,9	159,9
17	2	0	1	IV	3	355,0	157,0
18	1b	0	0	I	2	178,1	336,9
19	1b	0	0	I	2	481,8	397,2
20	4	1	0	IV	3	504,6	403,5

^aTNM-Klassifikation, Staging, Grading, vgl. Tabelle 2.2 und 2.3

^bkann nicht beurteilt werden

5 Ergebnisse

5.1 Dünnschichtchromatographie von GSL-Rohextrakten aus Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben

Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse der GSL-Expressionsanalysen dargestellt, die mit Lipidrohextrakten aus Nierenkarzinomgeweben sowie zugehörigen gesunden Vergleichsgeweben durchgeführt wurden. Zur Durchführung der GSL-Expressionsanalysen wurden die verschiedenen GSL zunächst mittels DC getrennt und im Anschluss auf der DC-Platte durch Immundetektion nachgewiesen. Zur Auswertung wurden die immungefärbten Banden densitometrisch mit dem Programm TINA 2.09d quantifiziert und die ermittelten Extinktionswerte für Proben des gesunden Gewebes von den entsprechenden Werten des Tumorgewebes subtrahiert, um für jede Patientenprobe einen differentiellen GSL-Expressionswert zu erhalten. Diesen Werten wurden nach folgendem Prinzip Ränge zugeordnet: Rang 1 wurde an den Patienten mit der höchsten differentiellen Expression, Rang 2 an den Patienten mit der zweithöchsten, usw., und der letzte Rang an den Patienten mit der niedrigsten Expression der jeweils untersuchten GSL-Struktur vergeben. Zuerst wurden die Grenzen für die differentiellen Expressionswerte definiert.

Gruppe I	$(OD_{Tumor} - OD_{Gesund}) \geq 700.000^a$
Gruppe II	$700.000 < (OD_{Tumor} - OD_{Gesund}) \leq 100.000$
Gruppe III	$100.000 < (OD_{Tumor} - OD_{Gesund}) > 0$
Gruppe IV	$(OD_{Tumor} - OD_{Gesund}) \leq 0$

^aDie Werte der Extinktion sind dimensionslos und besitzt daher keine Einheit

Daraus ergaben sich die Kategorien für die vier Expressionsgruppen.

- Gruppe I: stark erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe
- Gruppe II: moderat erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe
- Gruppe III: gleiche GSL-Expression im Tumor- und Normalgewebe
- Gruppe IV: verminderte GSL-Expression im Tumorgewebe

Zur Bestätigung der immundetektierten Strukturen und weiteren strukturellen Charakterisierung der einzelnen Spezies wurden die immundetektierten GSL einerseits direkt auf der DC-Platte mittels IR-MALDI-o-TOF MS analysiert oder andererseits von den DC-Platten abgekratzt, aus dem Kieselgel extrahiert und der nanoESI Q-ToF MS zugeführt.

5.1.1 Expressionsanalyse von Gangliosiden

Die Untersuchung der Expression von CD75s- und iso-CD75s-Gangliosiden aus Nierenkarzinom- und korrespondierenden Vergleichsgeweben mittels DC-Overlay-Assay erfolgte mit den polyklonalen Huhn-IgY-AK AK2-6 und AK2-3. AK2-6 erkennt das Epitop Neu5Aca6Gal β 4GlcNAc und AK2-3 Neu5Aca3Gal β 4GlcNAc-Epitope. Als Referenz für die CD75s- und iso-CD75s-Ganglioside wurden Ganglioside aus humanen Granulozyten (HGG) auf die DC-Platten aufgetragen.

5.1.1.1 CD75s-Ganglioside

Insgesamt wurden 20 Nierenkarzinome und entsprechendes Kontrollgewebe (Patientenproben 1-20, vgl. Tabelle 4.7) auf die Expression von CD75s-Gangliosiden untersucht. Die Ergebnisse der CD75s-Gangliosidexpressionsanalyse der Tumoren, ihre Rangzuordnung von 1 bis 20 sowie ihre Einteilung in Expressionsgruppen werden im Folgenden gezeigt.

DC-Overlay-Assay

Aliquots der GSL-Extrakte wurden entsprechend zu jeweils 2 mg Feuchtmasse auf die DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie wurde im Laufmittel für Ganglioside durchgeführt. Die Laufzeit betrug 20 Minuten.

Für den DC-Overlay-Assay diente ein Huhn Anti-CD75s-AK (AK2-6) als pAK, und als sAK wurde ein AP-konjugierter Kaninchen Anti-Huhn IgY-AK eingesetzt. Die BCIP-Färbung dauerte 60 Minuten.

Referenzganglioside aus humanen Granulozyten wurde neben Antikörper-vermittelter Immundetektion von CD75s zusätzlich mit Viscumin (V) und rViscumin (rV) und einem entsprechenden Anti-(r)Viscumin-AK gefärbt, um die Bindespezifität des AK und der Lektine vergleichen zu können.

Die Abbildung 5.1 auf der nächsten Seite zeigt repräsentativ für jede Expressionsgruppe eine Probe.

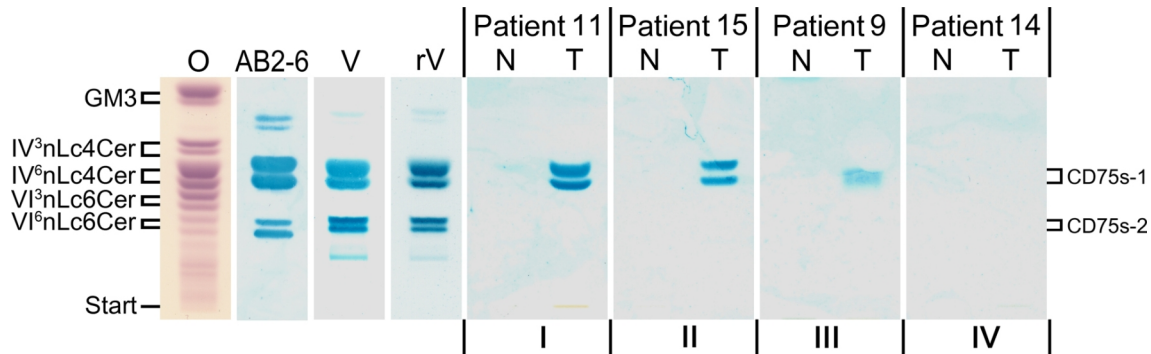


Abbildung 5.1: DC-Overlay-Assay von CD75s-Gangliosiden in GSL-Extrakten aus Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben. Aliquots der Lipidextrakte aus Tumor- und gesunden Vergleichsgeweben wurden entsprechend zu 2 mg Feuchtgewicht auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittel für Ganglioside entwickelt. Mit einem polyklonalen Huhn Anti-CD75s-AK (AK2-6) wurden CD75s-Ganglioside nachgewiesen. Die Färbung erfolgte mit BCIP. Repräsentativ für die vier Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 11 (Expressionsgruppe I), Patient 15 (Expressionsgruppe II), Patient 9 (Expressionsgruppe III) und Patient 14 (Expressionsgruppe IV) (siehe Tabelle 5.1) abgebildet. Als Referenz wurden 2 μg HGG-Ganglioside zur Durchführung der AK-vermittelten (AB2-6) und 10 μg für die Lektin-vermittelte DC-Immundetektion aufgetragen (V = Viscumin, rV = rViscumin). Für die Orcinolfärbung (O) dienten 10 μg der Referenzganglioside.

In der Referenzmischung konnten mit dem Antikörper und den Lektinen zwei verschiedene Ganglioside nachgewiesen werden, die das CD75s-Epitop tragen. Zum Einen wurde das CD75s-1-Gangliosid IV⁶nLc4Cer und das um eine Gl₄β4GlcNAc-Einheit verlängerte CD75s-2-Gangliosid VI⁶nLc6Cer detektiert. Eine CD75s-2-Expression ist in den Gewebeproben nicht nachweisbar.

Dass der polyklonale Antikörper AK2-6, Viscumin und rViscumin die gleiche Bindespezifität besitzen, wurde anhand der Immunfärbung von Referenzgangliosiden aus humanen Granulozyten nachgewiesen.

Gemäß ihrer Extinktion wurden die Tumoren dann bezüglich CD75s-1 in die Expressionsgruppen I bis IV eingeteilt. Außerdem wurden ihnen Ränge von 1 - 20 zugeordnet. Nachfolgende Tabelle 5.1 auf der nächsten Seite zeigt die Zuordnung in die Expressionsgruppen sowie die Rangvergabe.

Tabelle 5.1: Expression von CD75s-1-Gangliosiden in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G ^a
I	15%	1	11	3
		2	18	2
		3	17	3
II	15%	4	15	3
		5	20	3
		6	9	2
III	35%	7	6	2-3
		8	16	2
		9	4	2
		10	7	1-2
		11	2	2
		12	8	1
		13	13	2
IV	35%	14	1	1
		15	10	2
		16	14	3
		17	19	2
		18	5	2
		19	12	2-3
		20	3	2

^aHistopathologisches Grading (vergleiche Tabelle 2.5). Von den pathologischen Daten ist das Grading für die weitere Auswertung von Relevanz und wird daher mit aufgeführt.

Aus der Tabelle 5.1 geht hervor, dass die Expressionsgruppen folgendermaßen besetzt sind:

- | | |
|--|----------------|
| 1. stark erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe | 3 Tumore (15%) |
| 2. moderat erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe | 3 Tumore (15%) |
| 3. gleiche GSL-Expression im Tumor- und Normalgewebe | 7 Tumore (35%) |
| 4. verminderte GSL-Expression im Normalgewebe | 7 Tumore (35%) |

Demnach zeigen 30% des Tumorgewebes eine erhöhte Expression von CD75s-1-Gangliosiden gegenüber den gesunden Kontrollgeweben.

5.1.1.2 iso-CD75s-Ganglioside

Insgesamt wurden 20 Nierenkarzinome (Patientenproben 1 - 20, vgl. Tabelle 4.7) auf die Expression von iso-CD75s-Gangliosiden untersucht. Die Ergebnisse der iso-CD75s-Gangliosidexpressionsanalyse der Tumoren, ihre Rangzuordnung von 1 bis 20 sowie ihre Einteilung in Expressionsgruppen werden im Folgenden gezeigt.

DC-Overlay-Assay

Aliquots der GSL-Extrakte wurden entsprechend zu jeweils 2 mg Feuchtmasse auf die DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie wurde im Laufmittel für Ganglioside durchgeführt. Die Laufzeit betrug 20 Minuten.

Für den DC-Overlay-Assay diente ein Huhn Anti-iso-CD75s-AK (AK2-3) als pAK, und als sAK wurde ein AP-konjugierter Kaninchen Anti-Huhn IgY-AK verwendet. Die BCIP-Färbung dauerte 90 Minuten. Als Referenz für die iso-CD75s-Ganglioside wurden Ganglioside aus humanen Granulozyten eingesetzt.

Die Abbildung 5.2 zeigt exemplarisch für jede Expressionsgruppe eine Tumorprobe mit dem korrespondierenden gesunden Vergleichsgewebe.

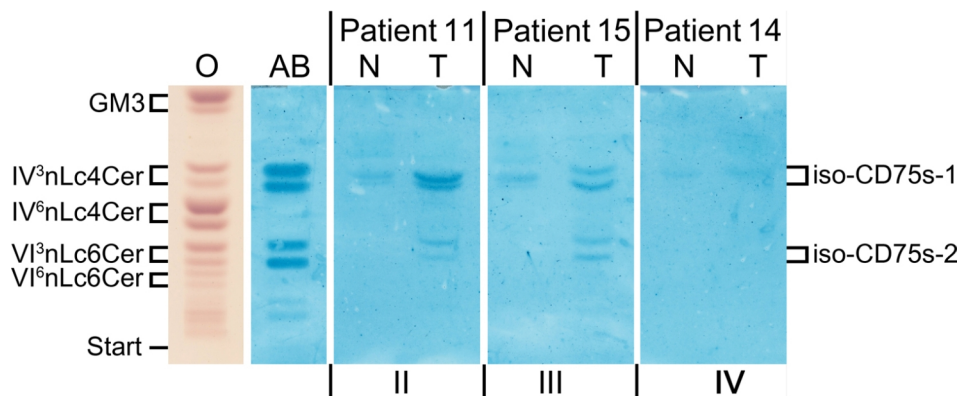


Abbildung 5.2: DC-Overlay-Assay von iso-CD75s-Gangliosiden in GSL-Extrakten aus Nierenkarzinomen und gesundem Vergleichsgewebe. Aliquots der Lipidextrakte aus Tumor- und gesundem Vergleichsgewebe wurden entsprechend zu jeweils 2 mg Feuchtweg auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittel für Ganglioside entwickelt. Mit einem polyklonalen Huhn Anti-iso-CD75s-AK (AK2-3) wurden iso-CD75s-Ganglioside nachgewiesen. Die Färbung erfolgte mit BCIP. Nach Ermittlung der differentiellen Extinktionswerte konnte keine Patientenprobe in die Expressionsgruppe I (stark erhöhte Expression) eingeordnet werden, weshalb repräsentativ für die drei verbleibenden Expressionsgruppen II - IV DC-Immunfärbungen gezeigt werden. Im Detail sind dies Patient 11 für Expressionsgruppe II, Patient 15 für Expressionsgruppe III und Patient 14 für Expressionsgruppe IV (siehe Tabelle 5.2). Als Referenz dienten humane Granulozyten-Ganglioside. Es wurden 2 μ g der Referenz zur Durchführung der AK-vermittelten Immundetektion (AK2-3) und 10 μ g für die Orcinolfärbung (O) aufgetragen.

Im Gegensatz zu der CD75s-Expressionsanalyse, wo im Kontrollgewebe keine CD75s-Expression detektierbar war, ließen sich hier iso-CD75s-Ganglioside im Normalgewebe nachweisen. Außerdem wurden sowohl in der Referenz als auch in den Tumorgeweben iso-CD75s-Ganglioside detektiert, die um eine Disaccharideinheit der Struktur Gal β 4GlcNAc verlängerte sind und somit zu den iso-CD75s-2-Gangliosiden gehören.

Gemäß ihrer Extinktion wurden den Tumoren bezüglich iso-CD75s-1 entsprechende Ränge zugewiesen und es erfolgte eine Einteilung in die vier Expressionsgruppen. Nachfolgende Tabelle 5.2 zeigt die Rangvergabe und die Zuordnung in die Expressionsgruppen.

Tabelle 5.2: Expression von iso-CD75s-Gangliosiden in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G ^a
II	25%	1	11	3
		2	18	2
		3	17	3
		4	20	3
		5	9	2
III	25%	6	15	3
		7	4	2
		8	7	1-2
		9	8	1
		10	13	2
IV	50%	11	1	1
		12	2	2
		13	3	2
		14	19	2
		15	5	2
		16	12	2-3
		17	14	3
		18	10	2
		19	16	2
		20	6	2-3

^aHistopathologisches Grading (vergleiche Tabelle 2.5 auf Seite 33). Von den pathologischen Daten ist das Grading für die weitere Auswertung von Relevanz und wird somit aufgeführt.

Aus Tabelle 5.2 geht hervor, dass die Expressionsgruppen folgendermaßen besetzt sind:

1. stark erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe	0 Tumore (0%)
2. moderat erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe	5 Tumore (25%)
3. gleiche GSL-Expression im Tumor- und Normalgewebe	5 Tumore (25%)
4. verminderte GSL-Expression im Normalgewebe	10 Tumore (50%)

Demnach zeigen 25% der Tumoren eine erhöhte Expression an iso-CD75s-1-Gangliosiden im Vergleich zu gesunden Kontrollgeweben.

5.1.2 Expressionanalyse von neutralen GSL der Neolaktoserie

Da in diesem Kontext auch die gemeinsame Vorläuferstruktur nLc4Cer der beiden CD75s- und iso-CD75s-Gnaglioside von Interesse ist, wurden die Gewebe auch auf ihre differentielle nLc4Cer-Expression untersucht.

Entsprechend zu 2 mg Gewebefeuchtgewicht wurden GSL-Extrakte auf die DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie wurde im Laufmittel für nGSL durchgeführt. Die Laufzeit betrug 20 Minuten.

Für den DC-Overlay-Assay diente ein polyklonaler Huhn Anti-nLc4Cer-AK als pAK, und als sAK wurde ein AP-konjugierter Kaninchen anti-Huhn IgY-AK eingesetzt. Die BCIP-Färbung wurde über 90 Minuten durchgeführt.

Als Referenz für nLc4Cer wurden neutrale GSL aus humanen Granulozyten auf die DC-Platten aufgetragen.

Die Abbildung 5.3 auf der nächsten Seite zeigt repräsentativ für jede Expressionsgruppe eine Tumorprobe mit entsprechendem gesunden Vergleichsgewebe.

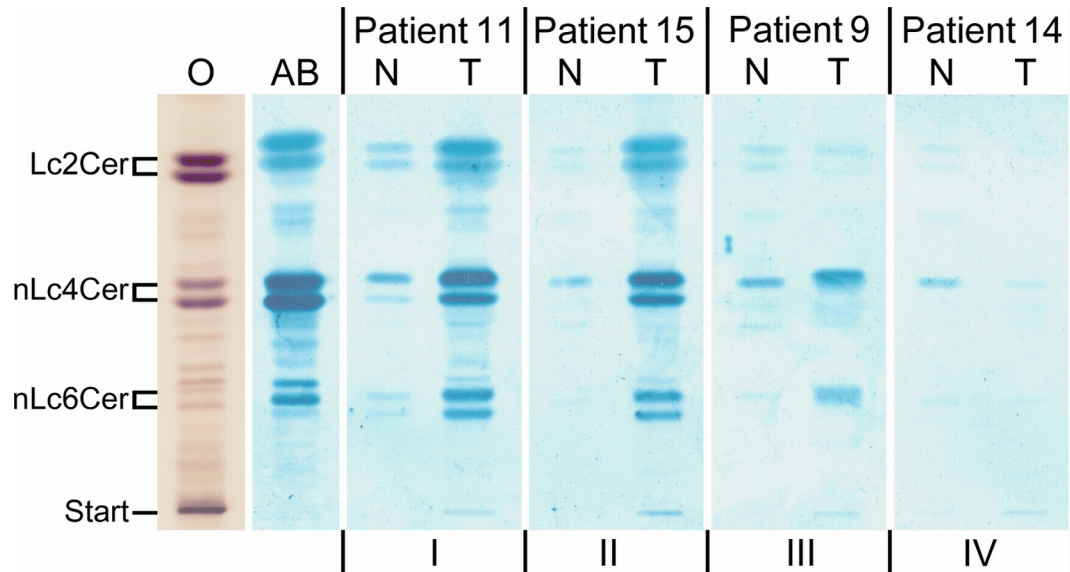


Abbildung 5.3: DC-Overlay-Assay von nLc4Cer in GSL-Extrakten aus Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben. Aliquots der Lipidextrakte aus Tumor- und gesunden Vergleichsgeweben, entsprechend zu jeweils 2 mg Feuchtgewicht, wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittel für nGSL entwickelt. Mit einem polyklonalen Huhn Anti-nLc4Cer-AK wurden neutrale Neolaktoserie-GSL mit terminalem Gal β 4GlcNAc-Epitop nachgewiesen. Die Färbung erfolgte mit BCIP. Repräsentativ für die vier Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 11 (Expressionsgruppe I), Patient 15 (Expressionsgruppe II), Patient 9 (Expressionsgruppe III) und Patient 14 (Expressionsgruppe IV) (siehe Tabelle 5.3) aufgeführt. Als Referenz dienten nGSL aus humanen Granulozyten. Es wurden 2 μ g der Referenz-GSL zur Durchführung der AK-vermittelten DC-Immundetektion aufgetragen (AK) und 10 μ g zur Durchführung der Orcinol-färbung (O).

Es konnten sowohl in den Referenz-GSL als auch in den Tumor- und gesunden Vergleichsgeweben Neolaktoserie-GSL mit Gal β 4GlcNAc-Epitop nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde teilweise noch das um eine Disaccharideinheit (Gal β 4GlcNAc) längere nLc6Cer detektiert. Aufgrund einer Kreuzreaktion des polyklonalen Antikörpers kommt es darüberhinaus zu einer Reaktion des Antikörpers mit Lactosylceramid (Gal β 4Glc β 1Cer). Gemäß ihrer Extinktion wurden die Tumoren dann bezüglich nLc4Cer in die Expressionsgruppen eingeteilt. Außerdem wurden ihnen Ränge zugeordnet. Nachfolgende Tabelle 5.3 zeigt die Zuordnung in die Expressionsgruppen sowie die Rangvergabe.

Tabelle 5.3: Expression von nLc4Cer in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G ^a
I	20%	1	11	3
		2	15	3
		3	6	2-3
		4	4	2
II	30%	5	9	2
		6	17	3
		7	18	2
		8	20	3
		9	12	2-3
		10	19	2
III	10%	11	16	2
		12	2	2
IV	40%	13	5	2
		14	8	1
		15	3	2
		16	1	1
		17	14	3
		18	13	2
		19	10	2
		20	7	1-2

^aHistopathologisches Grading (vgl. Tabelle 2.5 auf Seite 33). Von den pathologischen Daten ist das Grading für weitere Auswertungen von Relevanz und wird daher mit aufgeführt.

Der Tabelle 5.3 ist zu entnehmen, dass die Expressionsgruppen folgendermaßen besetzt sind:

- | | |
|--|----------------|
| 1. stark erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe | 4 Tumore (20%) |
| 2. moderat erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe | 6 Tumore (30%) |
| 3. gleiche GSL-Expression im Tumor- und Normalgewebe | 2 Tumore (10%) |
| 4. verminderte GSL-Expression im Tumorgewebe | 8 Tumore (40%) |

Demnach zeichnen sich 50% des Tumoren durch eine erhöhte Expression an nLc4Cer gegenüber den gesunden Kontrollgeweben aus.

5.1.3 Expressionsanalyse von neutralen GSL der Globoserie

Zum Nachweis von Gb3Cer und Gb4Cer in Nierenkarzinomen wurden jeweils ein polyklonaler Huhn-AK eingesetzt. Zusätzlich erfolgte der Nachweis des Stx-Rezeptors Gb3Cer mit einer Kombination aus Stx1 und Anti-Stx1-AK.

5.1.3.1 Antikörper-vermittelter Nachweis von Gb3Cer

Nachfolgend sind die Ergebnisse für die Expression von Gb3Cer in Nierenkarzinomen dargestellt. 20 Patientenproben (vgl. Tabelle 4.7) sind insgesamt untersucht worden.

DC-Overlay-Assay

Es wurden entsprechend zu 0,5 mg Feuchtmasse je ein Aliquot der GSL-Extrakte auf die DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie wurde im Laufmittel für neutrale GSL durchgeführt. Die Laufzeit betrug 20 Minuten.

Für den DC-Overlay-Assay diente ein Huhn Anti-Gb3Cer-AK als Primär-AK. Als Sekundär-AK wurde ein AP-konjugierter Kaninchen Anti-Huhn IgY-AK eingesetzt. Die BCIP-Färbung dauerte 90 Minuten.

Referenz-GSL für die neutralen Globoserie-GSL stammen aus humanen Erythrozyten. Die Abbildung 5.4 zeigt repräsentativ für jede Expressionsgruppe eine Probe.

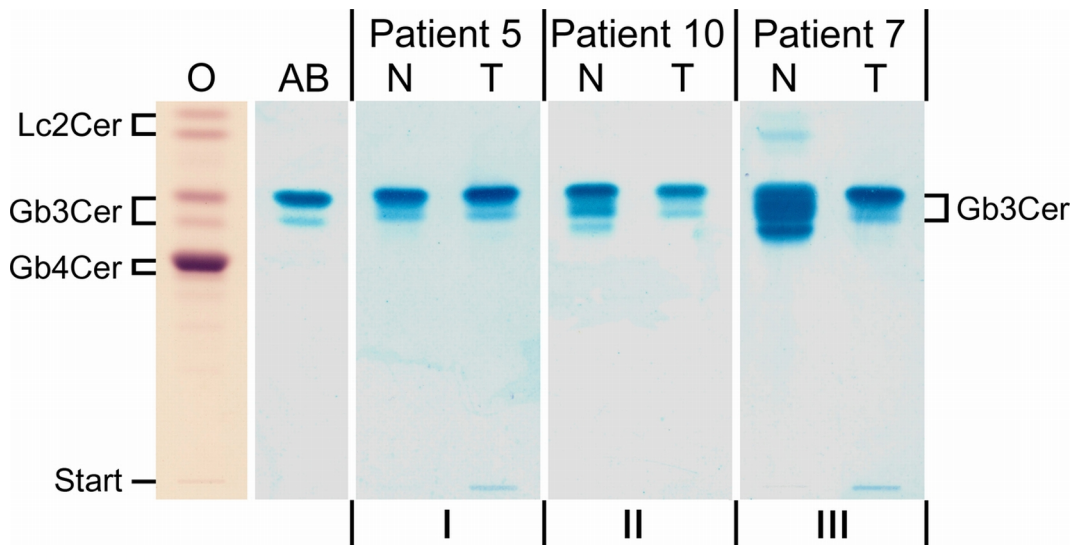


Abbildung 5.4: DC-Overlay-Assay von Gb3Cer in GSL-Extrakten aus Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben. Je ein Aliquot der Lipidextrakte aus Tumor- und gesunden Vergleichsgeweben, entsprechend zu jeweils 0,5 mg Feuchtwicht, wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittel für neutrale GSL entwickelt. Mit einem polyklonalen Huhn Anti-Gb3Cer-AK wurde die Strukturen von Gb3Cer nachgewiesen. Die Färbung erfolgte mit BCIP. Repräsentativ für die drei neu definierten Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 5 (Expressionsgruppe I), Patient 10 (Expressionsgruppe II) und Patient 7 (Expressionsgruppe III) abgebildet (siehe Tabelle 5.4). Als Referenz dienten 2 μ g neutraler GSL aus humanen Erythrozyten (AK).

Bei der Auswertung der Gb3Cer-Expression in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben ergab sich im Vergleich zu den vorherigen GSL-Expressionsanalysen ein völlig anderes Bild hinsichtlich der differentiellen Expression. Demzufolge und um den Unterschied zwischen den 20 Gewebeproben verdeutlichen zu können, wurden die Expressionsgruppen für die GSL-Expressionsanalyse von neutralen GSL der Globoserie wie folgt definiert:

- Gruppe I: identische oder leicht erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe
- Gruppe II: schwach verminderte GSL-Expression im Tumorgewebe
- Gruppe III: stark verminderte GSL-Expression im Tumorgewebe

Gemäß ihrer Extinktion wurden die Tumoren dann in die neu definierten Expressionsgruppen eingeteilt und ihnen wurden Ränge zugeteilt. Nachfolgende Tabelle 5.4 auf der nächsten Seite zeigt die Zuordnung in die Expressionsgruppen sowie die Rangvergabe.

Tabelle 5.4: Antikörper-vermittelte Expressionsanalyse von Gb3Cer in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G ^a
I	25%	1	2	2
		2	5	2
		3	8	1
		4	16	2
		5	12	2-3
II	45%	6	20	3
		7	4	2
		8	11	2
		9	18	2
		10	19	2
		11	13	3
		12	17	3
		13	9	2
III	30%	14	10	2
		15	14	3
		16	1	1
		17	15	3
		18	6	2-3
		19	3	2
		20	7	1-2

^aHistopathologisches Grading, vergleiche Tabelle (2.5). Von den pathologischen Daten ist das Grading für die weiter Auswertung von Relevanz und wird daher mit aufgeführt.

Aus Tabelle 5.4 geht hervor, dass die Expressionsgruppen folgendermaßen besetzt sind:

- | | |
|---|----------------|
| 1. identische oder leicht verminderte Expression im Tumorgewebe | 5 Tumore (25%) |
| 2. schwach verminderte Expression im Tumorgewebe | 9 Tumore (45%) |
| 3. stark verminderte Expression im Tumorgewebe | 6 Tumore (30%) |

Demnach besteht das Hauptkriterium darin, dass 75% der Tumoren eine verminderte Expression an Gb3Cer gegenüber den gesunden Kontrollgeweben besitzen.

5.1.3.2 Antikörper-vermittelter Nachweis von Gb4Cer

Nachfolgend sind die Ergebnisse für die GSL-Expression von Gb4Cer in Nierenkarzinomen dargestellt. 20 Patientenproben (vgl. Tabelle 4.7) sind insgesamt untersucht worden.

DC-Overlay-Assay

Es wurden entsprechend zu 0,5 mg Feuchtmasse je ein Aliquot der GSL-Extrakte auf die DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie wurde im Laufmittel für nGSL durchgeführt. Die Laufzeit betrug 20 Minuten.

Für den DC-Overlay-Assay diente ein Huhn Anti-Gb4Cer-AK als Primär-AK. Als Sekundär-AK wurde ein AP.-konjugierter Kaninchen Anti-Huhn IgY-AK verwendet. Die BCIP-Färbung dauerte 45 Minuten.

Als Referenz für die Gb4Cer-GSL dienten neutrale GSL aus humanen Erythrozyten.

Die Abbildung 5.5 zeigt repräsentativ für jede Expressionsgruppe eine Tumorprobe mit entsprechenden gesunden Vergleichsgeweben.

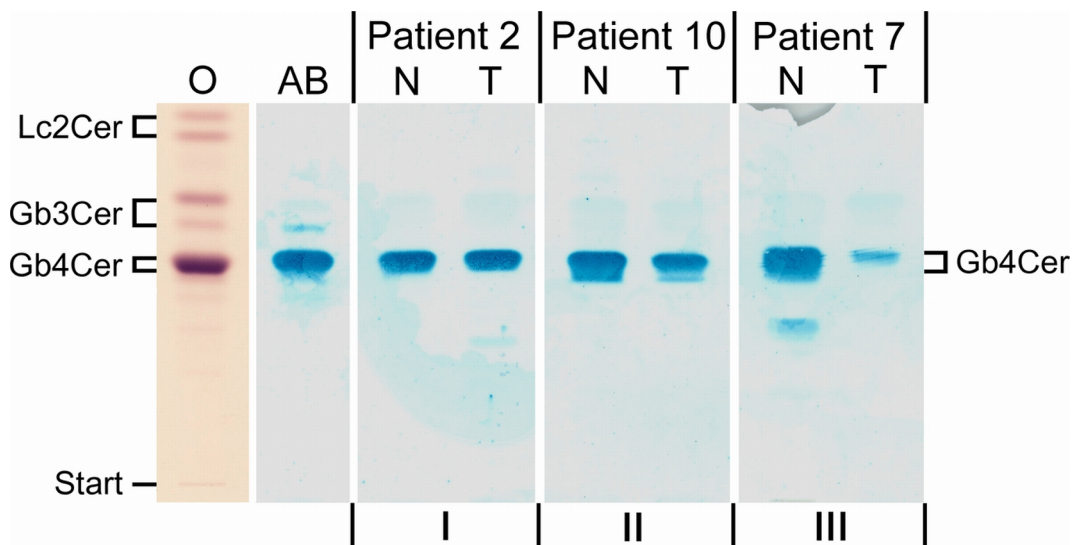


Abbildung 5.5: DC-Overlay-Assay von Gb4Cer in GSL-Extrakten aus Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben. Je ein Aliquot der Lipidextrakte aus Tumor- und gesundem Vergleichsgewebe, entsprechend zu 0,5 mg Feuchtgewicht, wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittel für nGSL entwickelt. Mit einem polyklonalen Huhn Anti-Gb4Cer-AK wurden die Struktur des Gb4Cer nachgewiesen. Die Färbung erfolgte mit BCIP. Exemplarisch für die drei Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 2 (Expressionsgruppe I), Patient 10 (Expressionsgruppe II) und Patient 7 (Expressionsgruppe III) (siehe Tabelle 5.5). Als Referenz dienten 2 μ g neutrale GSL aus humanen Erythrozyten (R).

Gemäß ihrer Extinktion wurden die Patientenproben dann in die für die Globoserie neu definierten Expressionsgruppen eingeteilt. Die Zuordnung in die Expressionsgruppen sowie die Rangvergabe sind im Detail in Tabelle 5.5 aufgelistet.

Tabelle 5.5: Antikörper-vermittelte Expression von Gb4Cer in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G ^a
I	15%	1	12	2-3
		2	16	2
		3	2	2
II	55%	4	20	3
		5	5	2
		6	19	2
		7	18	2
		8	13	2
		9	4	2
		10	10	2
		11	14	3
		12	17	3
		13	11	3
		14	9	2
III	30%	15	1	1
		16	6	2-3
		17	3	2
		18	8	1
		19	7	1-2
		20	15	3

^aHistopathologisches Grading, vergleiche Tabelle 2.5 auf Seite 33. Von den pathologischen Daten ist das Grading für nachfolgende Auswertungen von Relevanz und wird daher mit aufgeführt.

Der Tabelle 5.5 ist zu entnehmen, dass die Expressionsgruppen folgendermaßen besetzt sind:

- | | |
|--|-----------------|
| 1. gleiche oder leicht verminderte Expression im Tumorgewebe | 3 Tumore (15%) |
| 2. schwach verminderte Expression im Tumorgewebe | 11 Tumore (55%) |
| 3. stark verminderte Expression im Tumorgewebe | 6 Tumore (30%) |

Demnach zeigen 85% der Tumoren eine verminderte Expression an Gb4Cer gegenüber den gesunden Kontrollgeweben.

5.1.3.3 Stx-vermittelter Nachweis von Gb3Cer

Nachfolgend sind die Ergebnisse für den Nachweis von GSL der Globo-Serie mittels Stx-vermittelter Detektion dargestellt. 20 Patientenproben sind insgesamt untersucht worden.

DC-Overlay-Assay

Es wurden entsprechend zu 2 mg Feuchtmasse je ein Aliquot der GSL-Extrakte auf die DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie wurde im Laufmittel für nGSL durchgeführt. Die Laufzeit betrug 20 Minuten.

Für den DC-Overlay-Assay wurde zuerst Stx1 auf die DC-Platte gegeben. Als pAK diente ein monoklonaler Maus Anti-Stx-AK. Als sAK wurde ein AP-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG + IgM-AK verwendet. Die BCIP-Färbung dauerte 45 Minuten.

Als Referenz-GSL dienen neutrale GSL aus humanen Erythrozyten.

Die Abbildung 5.6 zeigt repräsentativ für jede Expressionsgruppe eine Tumorprobe mit entsprechendem gesunden Vergleichsgewebe.

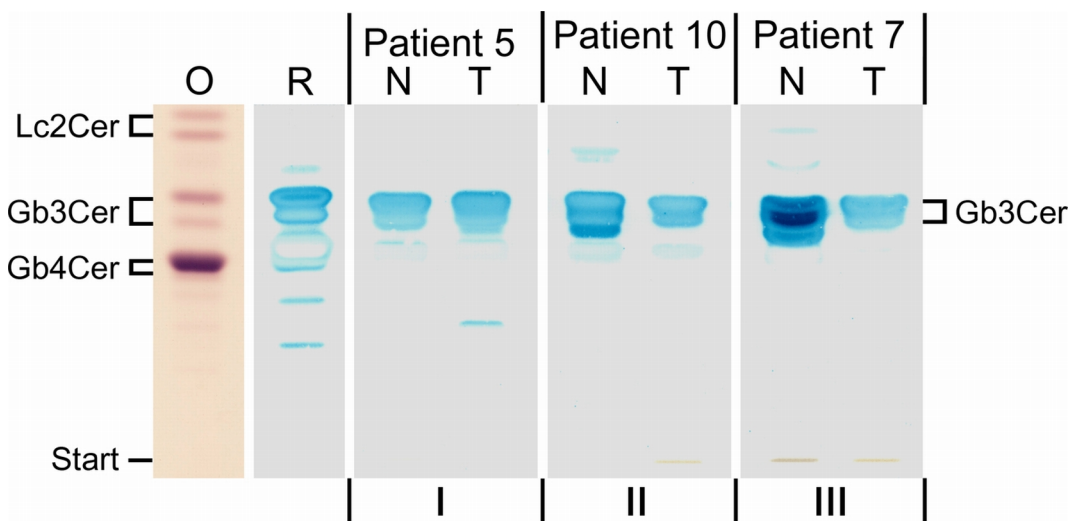


Abbildung 5.6: Stx-vermittelter DC-Overlay-Assay von GSL der Globoserie in GSL-Extrakten aus Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben. Je ein Aliquot der Lipidextrakte aus Tumor- und gesunden Vergleichsgewebe, entsprechend zu jeweils 0,5 mg Feuchtwicht, wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittel für neutrale GSL entwickelt. Mit einem polyklonalen Maus Anti-Stx-Ak wurde die Struktur des Gb3Cer nachgewiesen. Die Färbung erfolgte mit BCIP. Repräsentativ für die drei Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 2 (Expressionsgruppe I), Patient 10 (Expressionsgruppe II) und Patient 7 (Expressionsgruppe III) abgebildet (siehe Tabelle 5.6). Als Referenz dienten 2 μ g neutraler GSL aus humanen Erythrozyten (R).

Gemäß ihrer Extinktion wurden die Patientenproben dann in die neu definierten Expressionsgruppen eingeteilt. Tabelle 5.6 zeigt die Zuordnung aller untersuchten Patientenproben in die Expressionsgruppen sowie die Rangvergabe.

Tabelle 5.6: Stx-vermittelte Expressionsanalyse von Gb3Cer in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G ^a
I	15%	1	12	2-3
		2	16	2
		3	2	2
II	55%	4	20	3
		5	5	2
		6	19	2
		7	18	2
		8	13	2
		9	4	2
		10	10	2
		11	14	3
		12	17	3
		13	11	3
		14	9	2
		15	1	1
III	30%	16	6	2-3
		17	3	2
		18	8	1
		19	7	1-2
		20	15	3

^aHistopathologisches Grading, vergleiche Tabelle 2.5 auf Seite 33. Von den pathologischen Daten ist das Grading für nachfolgende Auswertungen von Relevanz und wird daher mit aufgeführt.

Aus Tabelle 5.6 geht hervor, dass die Expressionsgruppen folgendermaßen besetzt sind:

1. gleiche oder leicht verminderte Expression im Tumorgewebe	3 Tumore (15%)
2. schwach verminderte Expression im Tumorgewebe	11 Tumore (55%)
3. stark verminderte Expression im Tumorgewebe	6 Tumore (30%)

Demnach zeigen 85% des Tumorgewebes bei Stx-vermittelter Detektion eine verminderte Expression an Gb3Cer im Vergleich zu gesunden Kontrollgeweben.

5.2 Massenspektrometrische Analyse der immundetektieren GSL in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben

Die aus den Overlay-Assays gewonnenen Daten zur GSL-Expression wurden anschließend noch massenspektrometrisch strukturell verifiziert. Zur Charakterisierung der analysierten GSL wurde zum Einen die IR-MALDI-o-TOF MS und zum Anderen die nanoESI Q-TOF MS eingesetzt.

Die von Dreisewerd *et al.* [2005] beschriebene Methode per DC getrennte Lipide direkt auf der DC-Platte mittels IR-MALDI-o-TOF MS zu analysieren, wurde durch Distler *et al.* [2008] weiterentwickelt und ermöglichte die Strukturaufklärung immundetektierter GSL mit dieser Technik. Nach Entfernung des Plexigums werden die DC-Platten in Stücke zerschnitten, um sie passgenau auf einem speziell für diese Technik konstruierten Probenhalter oder *Target* zu fixieren. Glycerin wird als Flüssigmatrix auf die immungefärbten Banden gegeben. Der Vorteil dieser Technik ist, dass zeitaufwendige Extraktionsschritte entfallen und Strukturdaten ohne Probenverlust direkt von der DC-Platte gewonnen werden können [Distler u. a. (2008a)].

Bei der nanoESI Q-TOF MS wird das für den Overlay-Assay benötigte Plexigum-Fixativ zuvor durch mehrmaliges Tauchen der DC-Platte in Chloroform entfernt und im Anschluß die immungefärbten Banden abgekratzt. Die GSL aus dem Silikagel werden anschließend durch ein LM-Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (30/60/8, v/v/v) extrahiert und massenspektrometrisch analysiert [Meisen u. a. (2004), Meisen u. a. (2005)]. Vorteil dieser MS-Technik liegt im vorhandenen Geräteaufbau. Eine Kollisionskammer ermöglicht die Durchführung von CID-Experimenten, die eine genauere Charakterisierung der GSL ermöglicht.

5.2.1 Massenspektrometrische Analyse von CD75s- und iso-CD75s-Gangliosiden

Um die im Overlay-Assay detektierten CD75s-1 und iso-CD75s-1-Ganglioside (vgl. Abbildungen 5.1 und 5.2) strukturell zu analysieren, wurden die immungefärbten Ganglioside direkt auf der DC-Platte mittels IR-MALDI-o-TOF massenspektrometrisch charakterisiert. Alle Messungen erfolgten im Positivionenmodus mit Glycerin als Flüssigmatrix.

5.2.1.1 DC-IR-MALDI-o-TOF MS von CD75s-1-Gangliosiden

Im Folgenden werden exemplarisch die IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von immundetektieren CD75s-1-Gangliosiden gezeigt, die in GSL Extraktion des Tumors des Patienten 15 (Expressionsgruppe II, vgl. Abbildung 5.1 und Tabelle 5.1) detektiert wurden.

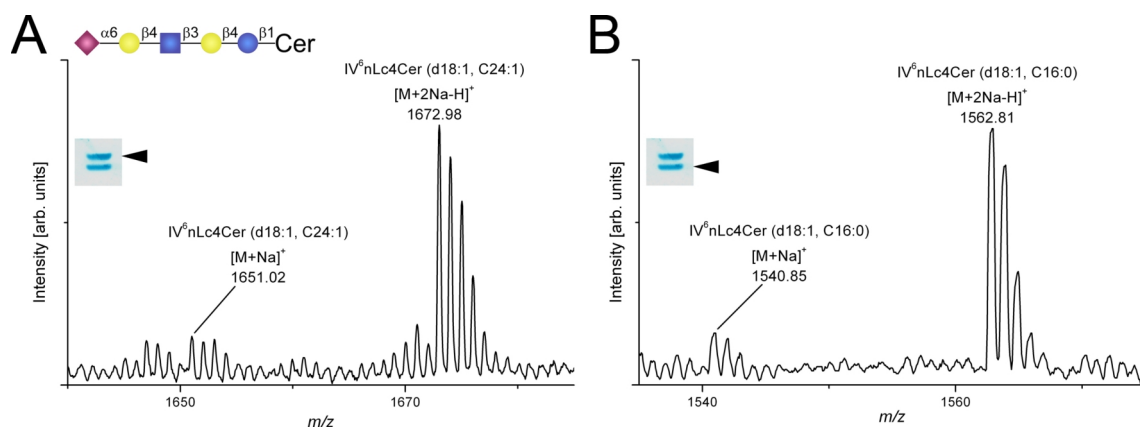


Abbildung 5.7: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von immundetektieren CD75s-1-Gangliosiden aus Nierenkarzinomgewebe von Patient 15 (Expressionsgruppe II, vergleiche Abbildung 5.1 und Tabelle 5.1). Die Messung erfolgte nach Immundetektion der CD75s-1-Ganglioside direkt auf der DC-Platte. Die aufgetragene Menge an GSL-Rohextrakt entsprach 2 mg Gewebefeuchtgewicht. Detektierte Molekülonen, m/z -Werte und dazugehörige Strukturvorschläge sind in Tabelle 5.7 aufgelistet. (A) Massenspektrum von IV⁶Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:0/24:1) (B) Massenspektrum von IV⁶Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)

Wie aus Abbildung 5.7 A ersichtlich, konnten nach Durchführung der DC-IR-MALDI-o-TOF MS in der oberen immungefärbten Bande bei m/z 1651,02 und 1672,98 Molekülionen der Spezies IV⁶Neu5Ac-nLc4Cer mit d18:1-Sphingosin und C24:1-Fettsäure als einfach $[M+Na]^+$ und doppelt $[M+2Na-H]^+$ mit Natrium kationisierte Ionen detektiert werden. In der unteren Bande (vgl. Abbildung 5.7 B) wurden ebenfalls einfach und doppelt mit Natrium-kationisierte GSL-Spezies mit m/z 1540,85 $[M+Na]^+$ und m/z 1562,81 $[M+2Na-H]^+$ nachgewiesen werden, was den mittels Overlay-Assay detektierten CD75s-1-Gangliosiden entspricht. In Tabelle 5.7 sind die detektierten Molekülionen mit dazugehörigen Strukturvorschlägen und theoretischen m/z -Werten aufgelistet.

Tabelle 5.7: Mittels (+)IR-MALDI-o-TOF MS detektierte CD75s-1-Ganglioside im GSL-Extrakt des Nierentumors von Patient 15^a.

m/z theoretisch	m/z experimentell	Ladungszustand	Strukturvorschlag	CD-Nomenklatur
1540,84	1540,85	$[M+Na]^+$	IV ⁶ Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	CD75s-1
1562,82	1562,81	$[M+2Na-H]^+$	IV ⁶ Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	CD75s-1
1650,94	1651,02	$[M+Na]^+$	IV ⁶ Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)	CD75s-1
1672,93	1672,98	$[M+2Na-H]^+$	IV ⁶ Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)	CD75s-1

^avgl. Tabelle 4.7

Die massenspektrometrischen Analysen weiterer Patientenproben (vgl. Tabelle 4.7) ergaben im Falle einer Überexpression ebenfalls CD75s-1-Gangliosidspezies mit C16- oder C24-Fettsäuren im Ceramidteil, die als einfach oder doppelt mit Natrium kationisierte Molekülonen nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

5.2.1.2 DC-IR-MALDI-o-TOF MS von iso-CD75s-1- und iso-CD75s-2-Gangliosiden

Die immungefärbten iso-CD75s-Ganglioside wurden direkt auf der DC-Platte mittels IR-MALDI-o-TOF untersucht. Die Ergebnisse werden exemplarisch für Patient 11 (Expressionsgruppe II, vgl. Abbildung 5.2 und Tabelle 5.2) in Abbildung 5.8 dargestellt.

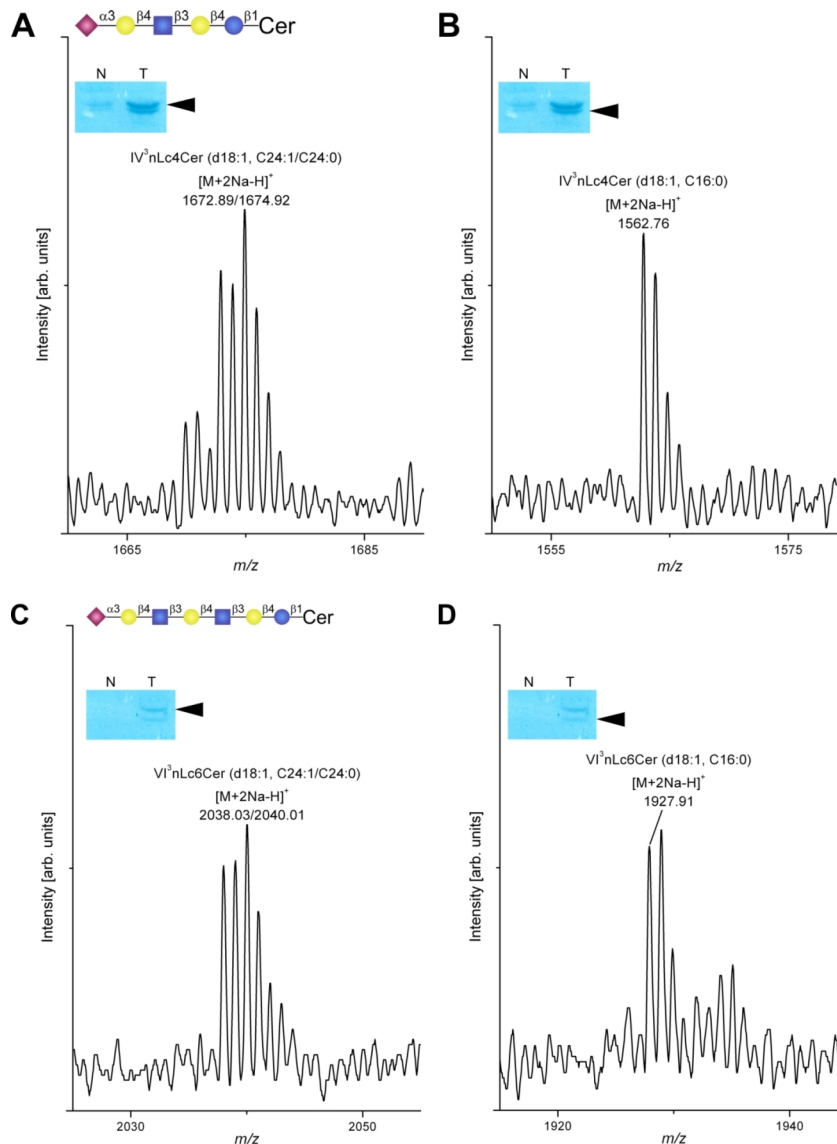


Abbildung 5.8: (+)DC-IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von immundetektierten iso-CD75s-1 und isoCD75s-2-Gangliosiden aus Nierenkarzinomgewebe von Patient 11 (Expressionsgruppe II, vgl. Abbildung 5.2 und Tabelle 5.2). Die Messung erfolgte nach Immundetektion der iso-CD75s-Ganglioside direkt auf der DC-Platte. Die aufgetragene Menge an GSL-Rohextrakt entsprach 2 mg Gewebefeuchtwegewicht. Detektierte Molekülonen, m/z -Werte und dazugehörige Strukturvorschläge sind in Tabelle 5.8 aufgelistet. Massenspektrum von IV^3 Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:0/24:1) (A), IV^3 Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0) (B), VI^3 Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:0/24:1) (C) und IV^3 Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0) (D).

Der Abbildung 5.8 A kann entnommen werden, dass mittels DC-IR-MALDI-o-TOF MS in der oberen immungefärbten Bande mit m/z 1672,89 und 1674,92 $[M+2Na-H]^+$ Molekülionen der Spezies $IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ mit d18:1-Sphingosin und C24:1- bzw. 24:0-Fettsäure detektiert wurden. In der unteren Bande (Abbildung 5.8 B) wurden ausschließlich einfach geladene, doppelt mit Natrium-kationisierte GSL-Spezies bei m/z 1562,76 nachgewiesen. Teil C der Abbildung 5.8 zeigt in der oberen Bande bei m/z 2038,03 und 2040,01 Molekülspezies des Gangliosids $VI^3\text{Neu5Ac-nLc6Cer}$ (d18:1, C24:1/24:0) als einfach geladene, doppelt mit Natrium kationisierte Ionen. Die Messung der unteren Bande (Abbildung 5.8 D) ergab zweifach mit Natrium kationisierte $VI^3\text{Neu5Ac-nLc6Cer}$ -Ganglioside mit d18:1-Sphingosin und C16-Fettsäure bei m/z 1927,91. In Tabelle 5.8 sind die detektierten Molekülionen mit dazugehörigen Strukturvorschlägen und theoretischen m/z -Werten aufgelistet.

Tabelle 5.8: Mittels (+)IR-MALDI-o-TOF MS detektierte iso-CD75s-Ganglioside im GSL-Extrakt des Nierenkarzinoms von Patient 11.

m/z theoretisch	m/z experimentell	Ladungszustand	Strukturvorschlag	CD-Nomenklatur
1562,82	1562,76	$[M+2Na-H]^+$	$IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ (d18:1, C16:0)	iso-CD75s-1
1672,93	1672,74	$[M+2Na-H]^+$	$IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ (d18:1, C24:1)	iso-CD75s-1
1674,94	1674,92	$[M+2Na-H]^+$	$IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ (d18:1, C24:0)	iso-CD75s-1
1927,95	1927,91	$[M+2Na-H]^+$	$VI^3\text{Neu5Ac-nLc6Cer}$ (d18:1, C16:0)	iso-CD75s-2
2038,06	2038,03	$[M+2Na-H]^+$	$VI^3\text{Neu5Ac-nLc6Cer}$ (d18:1, C24:1)	iso-CD75s-2
2040,08	2040,01	$[M+2Na-H]^+$	$VI^3\text{Neu5Ac-nLc6Cer}$ (d18:1, C24:0)	iso-CD75s-2

Die massenspektrometrischen Analysen weiterer Patientenproben ergaben ebenfalls $IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ und $VI^3\text{Neu5Ac-nLc6Cer}$ -Gangliosidspezies mit C16- oder C24-Fettsäuren im Ceramidteil (Daten nicht gezeigt).

5.2.2 DC-IR-MALDI-o-TOF MS von nLc4Cer

Im Folgenden werden exemplarisch die IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von immundetektierter nLc4Cer-GSL gezeigt, die in Extraktion des Tumors des Patienten 15 (Expressionsgruppe II, vgl. Abbildung 5.3 und Tabelle 5.3) detektiert wurden.

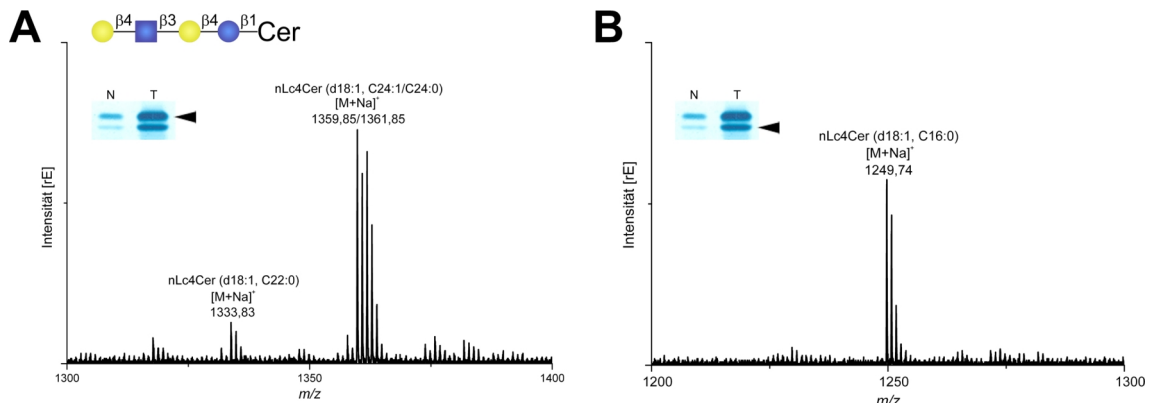


Abbildung 5.9: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von immundetektierter nLc4Cer-Spezies aus Nierenkarzinomen von Patient 15 (Expressionsgruppe II, vgl. Abbildung 5.3 und Tabelle 5.3). Massenspektren von AK-detektiertem nLc4Cer des Tumorgewebes der Patientenprobe 15. Die Messung erfolgte nach Immundetektion direkt auf der DC-Platte. Die aufgetragene Menge an GSL-Rohextrakt entsprach 2 mg Gewebefeuchtgewicht. Massenspektrum von nLc4Cer (d18:1, C24:1/24:0) bzw. nLc4Cer (d18:1, C22:0) bei m/z 1359,87/1361,86 bzw. 1333,83 (A) und nLc4Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1249,72 (B).

Aus Abbildung 5.9 A ist ersichtlich, dass es sich bei der oberen immungefärbten Bande um nLc4Cer (d18:1; C24:1/24:0) mit m/z 1359,87/1361,86 bzw. nLc4Cer (d18:1, C22:0) handelt, belegt durch einfach geladene mit Natriumaddukte vorliegende Molekülonen von nLc4Cer. In der unteren Bande (Abbildung 5.9) wurden bei m/z 1249,72 einfach geladene, mit Natrium kationisierten nLc4Cer-Spezies mit d18:1-Sphingosin und C16:0-Fettsäure mit detektiert.

Bei Messungen weiterer Tumorproben mittels DC-IR-MALDI-o-TOF MS wurden vornehmlich die beiden nLc4Cer-Spezies mit C16:0- und C24:1/C24:0-Fettsäure in den Doppelbanden detektiert (Daten nicht gezeigt).

5.2.3 NanoESI Q-TOF MS von Gb3Cer

Aufgrund der wesentlich höheren Expression der Gb3Cer-GSL, war es möglich, diese massenspektrometrisch mit nanoESI Q-TOF MS zu analysieren. Im Gegensatz zur DC-IR-MALDI-o-TOF MS besitzt das Q-TOF eine Kollisionskammer, mit der es möglich ist, CID-Experimente durchzuführen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, detektierte Molekülspezies zu fragmentieren und genauere Strukturinformationen zu erhalten.

Um die immundetektieren Gb3Cer-GSL mit nanoESI Q-TOF MS analysieren können, müssen die Gb3Cer-positiven Banden von der DC-Platte abgekratzt und die GSL aus dem Kieselgel extrahiert werden. Zur Extraktion wird das Lösungsmittelgemisch C/M/W (30/60/8, v/v/v) eingesetzt. Im Anschluß werden diese Extrakte eingedampft und in 30 μL MeOH resuspendiert. Für die MS-Analysen werden 4 μL des Extraktes mit 4 μL MeOH und 1 μL x N HCOOH gemischt. Aufgrund der hohen Expressionen im Tumor- und gesundem Vergleichsgewebe, können die massenspektrometrischen Analysen der immundetektieren Gb3Cer-Spezies direkt miteinander verglichen werden. Repräsentativ werden die Ergebnisse des Tumor- und gesunden Vergleichsgewebes von Patient 5 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 5.4 und Abbildung 5.4) dargestellt.

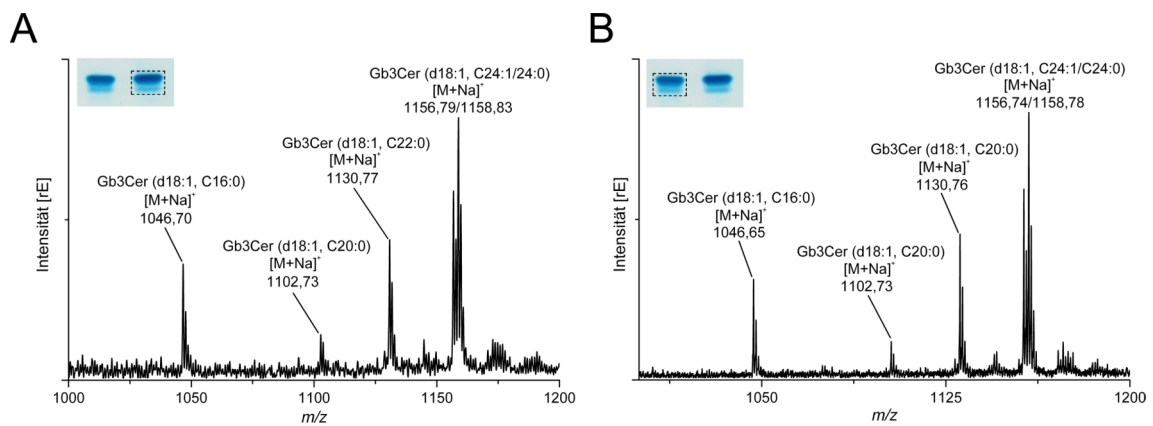


Abbildung 5.10: (+)NanoESI Q-TOF Massenspektren immundetektierter Gb3Cer-Spezies aus Nierenkarzinom- und gesundem Vergleichsgewebe des Patienten 5 (Expressionsgruppe I, vgl. Tabelle 5.4 und Abbildung 5.4). Vier mal 0,5 mg Gewebefeuchtwicht wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und für die Extraktion der GSL aus dem Kieselgel zusammengefasst. Dieser insgesamt 2 mg Gewebefeuchtwicht entsprechende Extrakt wurde dann der massenspektrometrischen Analyse mit nanoESI Q-TOF zugeführt. Detektierte Molekülonen, m/z -Werte sowie Strukturen der Gb3Cer-Varianten sind in Tabelle 5.9 für die Übersichtsspektren aufgeführt. (A) Massenspektrum von Gb3Cer des Nierenkarzinomgewebes von Patient 5 (B) Massenspektrum von Gb3Cer des Normalgewebes von Patient 5.

Wie aus Abbildung 5.10 A ersichtlich ist, konnten mehrere als Natriumaddukt vorliegende Gb3Cer-Spezies in der Tumorgewebeprobe des Patienten 5 detektiert werden. Neben den Hauptkomponenten Gb3Cer (d18:1, C16:0) mit m/z 1046,67 und Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) mit m/z 1156,79 bzw. 1158,83 konnten darüber hinaus Spezies mit C20:0- und C22:0-Fettsäure bei m/z 1102,73 bzw. 1130,77 detektiert werden. Im Normalgewebe des Patienten 5 (vgl. Abbildung 5.10 B) konnten die gleichen Molekülspezies mit leichter Abweichung der m/z -Werte nachgewiesen werden. In Tabelle 5.9 sind die detektierten Moleküle mit dazugehörigen Strukturvorschlägen und theoretischen m/z -Werten aufgelistet.

Tabelle 5.9: (+)NanoESI Q-TOF MS detektierte Gb3Cer-Spezies im GSL-Extrakt des Nierenkarzinom- und gesunden Vergleichsgewebes von Patient 5.

m/z theoretisch	m/z experimentell Tumorgewebe	m/z experimentell Normalgewebe	Ladungszustand	Strukturvorschlag
1046,66	1046,70	1046,65	[M+Na] ⁺	Gb3Cer (d18:1, C16:0)
1102,73	1102,73	1102,73	[M+Na] ⁺	Gb3Cer (d18:1, C20:0)
1130,75	1130,77	1130,76	[M+Na] ⁺	Gb3Cer (d18:1, C22:0)
1156,77	1156,79	1156,74	[M+Na] ⁺	Gb3Cer (d18:1, C24:1)
1158,79	1158,83	1158,78	[M+Na] ⁺	Gb3Cer (d18:1, C24:0)

Bei beiden Gewebeprobeen stellten sich die Gb3Cer-Spezies mit C16:0- und C24:1/C24:0-Fettsäure als die dominierenden Moleküle heraus. Daher wurden diese sowohl für die Tumor- als auch für die Normalgewebeprobe zur weiteren Charakterisierung durch CID-Experimente ausgewählt. Abbildung 5.11 zeigt die MS2-Massenspektren für die jeweiligen fragmentierten Moleküle des jeweiligen Gewebes sowie beispielhafte Fragmentierungsschemata von Gb3Cer mit C16:0-Fettsäure.

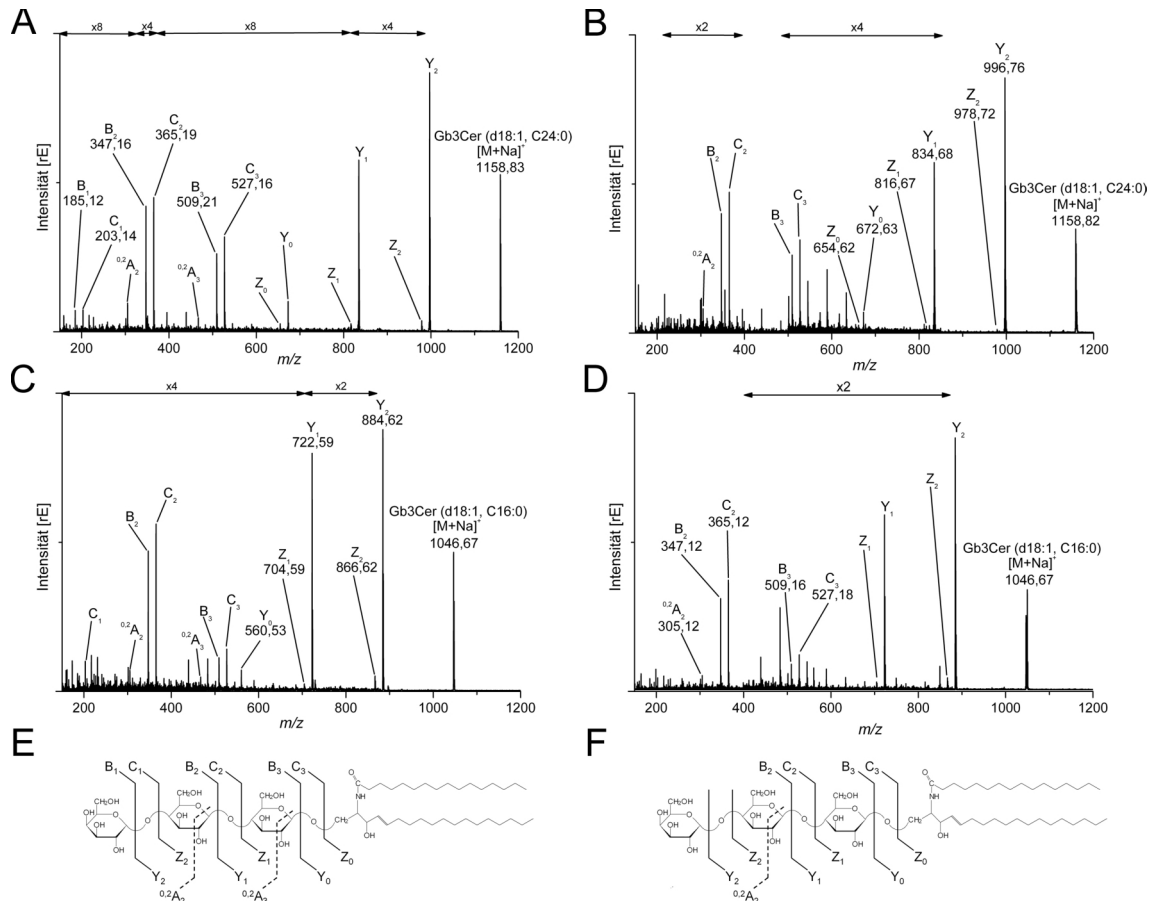


Abbildung 5.11: (+)NanoESI Q-TOF Massenspektren immundetektierter Gb3Cer-Spezies aus Nierenkarzinom- und gesundem Vergleichsgewebe des Patienten 5 (Expressionsgruppe I, vgl. Tabelle 5.4 und Abbildung 5.4). **(A)** Massenspektrum der Fragmentationen von Gb3Cer (d18:1, C24:0) bei m/z 1158,83 des Nierenkarzinomgewebes von Patient 5. **(B)** Korrespondierendes Massenspektrum der Fragmentationen von Gb3Cer (d18:1, C24:0) bei m/z 1158,78 des Normalgewebes von Patient 5. **(C)** Fragmentationen von Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,70 des Tumorgewebes von Patient 5. **(D)** Korrespondierendes Massenspektrum von Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,65 des Normalgewebes von Patient 5. **(E) + (F)** Fragmentierungsschemata von Gb3Cer der aus CID-Experimenten hervorgegangen Ionen (**(E)** Tumorgewebe und **(F)** Normalgewebe)

Aus Abbildung 5.11 geht hervor, dass bei beiden Vorläuferionen sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe die meisten bzw. alle Ionen der Y- und Z-Serie nachgewiesen werden konnten. Im Fall der Gb3Cer-Spezies mit C24:0-Fettsäure konnten im Tumorgewebe die komplette B- und C-Ionenserien nachgewiesen werden. Beim Normalgewebe konnten die B_1 und C_1 -Ionen und die Z_0 - und Z_1 -Ionen nicht nachgewiesen werden. Weiterhin sind in beiden Geweben bei beiden Fettsäuretypen Ionen detektiert worden, die auf Ringbrüche zurückzuführen sind und als A-Fragmentationen bezeichnet werden. In Tabelle 5.10 sind alle detektierten Fragmentationen des Tumor- und Normalgewebes und ihre Zuordnung zu den

einzelnen Serien aufgelistet.

Tabelle 5.10: (+)NanoESI Q-TOF MS Fragmentationen von Gb3Cer in GSL-Extrakten aus Nierenkarzinomen.

Fragmentation	Patient 5 (Tumorgewebe)		Patient 5 (Normalgewebe)	
	Gb3Cer (d18:1, C16:0) <i>m/z</i> 1046,70	Gb3Cer (d18:1, C24:0) <i>m/z</i> 1158,83	Gb3Cer (d18:1, C16:0) <i>m/z</i> 1046,65	Gb3Cer (d18:1, C24:0) <i>m/z</i> 1158,78
$^{0,2}A_2$	305,17	305,17	305,10	—
$^{0,2}A_3$	467,22	467,20	—	—
$Y_0; Z_0$	560,53; —	672,67; 654,67	560,51; —	672,63; —
$Y_1; Z_1$	722,59; 704,59	834,75; 816,70	722,57; 704,57	834,68; —
$Y_2; Z_2$	884,62; 866,62	996,78; 978,77	884,61; 866,61	996,72; 978,72
$B_1; C_1$	—; 203,16	185,12; 203,14	—; —	—; —
$B_2; C_2$	347,16; 365,16	347,16; 365,19	347,12; 365,12	347,09; 365,11
$B_3; C_3$	509,19; 527,21	509,21; 527,16	509,16; 527,18	509,15; 527,18

5.3 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden in Nierenkarzinomen

Der immunfluoreszenzmikroskopische, AK-vermittelte Nachweis von CD75s-Gangliosiden in Gewebeschnitten von Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben ist im Folgenden dargestellt. Die Abbildung 5.12 zeigt exemplarisch den mit dem polyklonalen Anti-CD75s-AK geführten Nachweis für die Patientenprobe 15 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 5.1) und dem zugehörigen Normalgewebe.

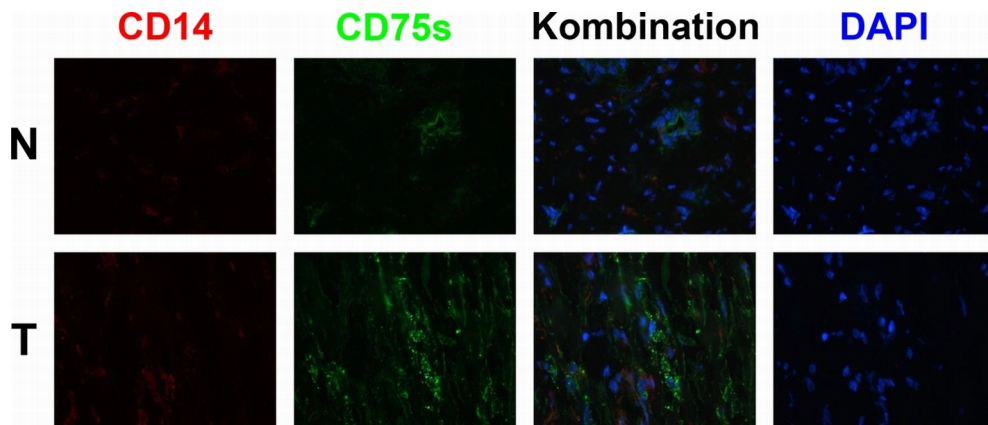


Abbildung 5.12: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden in gesundem, normalem (N) und tumorösem Nierengewebe (T) des Patienten 15 (Expressionsgruppe I, s. Tabelle 5.1). Die Färbung erfolgte durch Bindung des Alexa568 gekoppelten Sekundärantikörpers gegen den polyklonalen Huhn Anti-CD75s AK (AK2-6). Mit einem monoklonalen Maus Anti-CD14-AK wurden Makrophagen, die ebenfalls CD75s exprimieren können, identifiziert. Die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen.

Aus Abbildung 5.12 ist ersichtlich, dass große Teile des Tumorgewebes eine positive CD75s-Gangliosidfärbung zeigen. Im gesunden Vergleichsgewebe lässt sich hingegen nur sporadisch CD75s nachweisen. Die Färbung von CD14 zeigt, dass sich nur wenige infiltrierende Immunzellen in den Geweben befinden. Auch zeigen diese nur eine geringe CD75s-Expression. Daraus lässt sich schließen, dass die im Overlay-Assay nachgewiesenen CD75s-Ganglioside auf Expression der Viscumin-Rezeptoren in den Tumorzellen zurückzuführen sind. In Kontrollexperimenten wurden weiterhin Lipide durch Extraktion mit Methanol und Chloroform/Methanol (1/1, v/v) aus den Geweben entfernt, woraufhin keine Färbung nachweisbar war. Dieser Befund ist ein Beleg dafür, dass es sich bei den detektierten Strukturen um Ganglioside handelt (Daten nicht gezeigt). Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Frau Petra Hoffmann durchgeführt.

5.4 Statistische Auswertung

Sämtliche GSL-Expressionsdaten der Nierenkarzinome und der zugehörigen Normalgewebe ($n = 20$) aus den DC-Overlay-Tests wurden statistisch ausgewertet. Dazu wurde der Vorzeichentest eingesetzt, um eventuell vorhandene signifikante Unterschied zwischen der jeweiligen GSL-Expression im Normal- gegenüber dem Tumorgewebe statistisch zu belegen. Mit Hilfe des Mediantests sollte ein etwaiger Zusammenhang zwischen der GSL-Expression und den verschiedenen pathologischen Merkmalen überprüft werden. Abschließend wurde noch die Korrelation mittels Kendalls τ bestimmt, um Aussagen über die Expressionsdaten der verschiedenen GSL untereinander und den klinischen Parametern machen zu können. Alle Tests waren zweiseitig und erfolgten auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

Die mit dem Programm Tina 2.09d erzeugten densitometrischen Daten werden in Form von sogenannten Boxplot-Diagrammen dargestellt. Die einzelnen Stichproben werden dabei durch eine rechteckige Box repräsentiert. Das erste Quartil begrenzt diese Box an der oberen Grenze und das dritte Quartil an der unteren. Der Median befindet sich in Form einer horizontalen Linie in der Box und das arithmetische Mittel ist durch Quadrat gekennzeichnet. Der Median ist gegenüber dem arithmetischen Mittel stabiler gegen Ausreißer, allerdings sind beide ein Maß für die zentrale Tendenz der Verteilung. Die von der Box vertikal abgehenden Striche markieren das 5%- bzw. 95%-Perzentil und die Kreuze oben und unten das Maximum bzw. Minimum.

5.4.1 CD75s-1, iso-CD75s-1 und nLc4Cer

Die Abbildung 5.13 zeigt die Boxplots der densitometrischen Daten der Expressionsanalyse von CD75s- und iso-CD75s-Gangliosiden sowie deren Vorläuferstruktur nLc4Cer in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben ($n = 20$ Patienten).

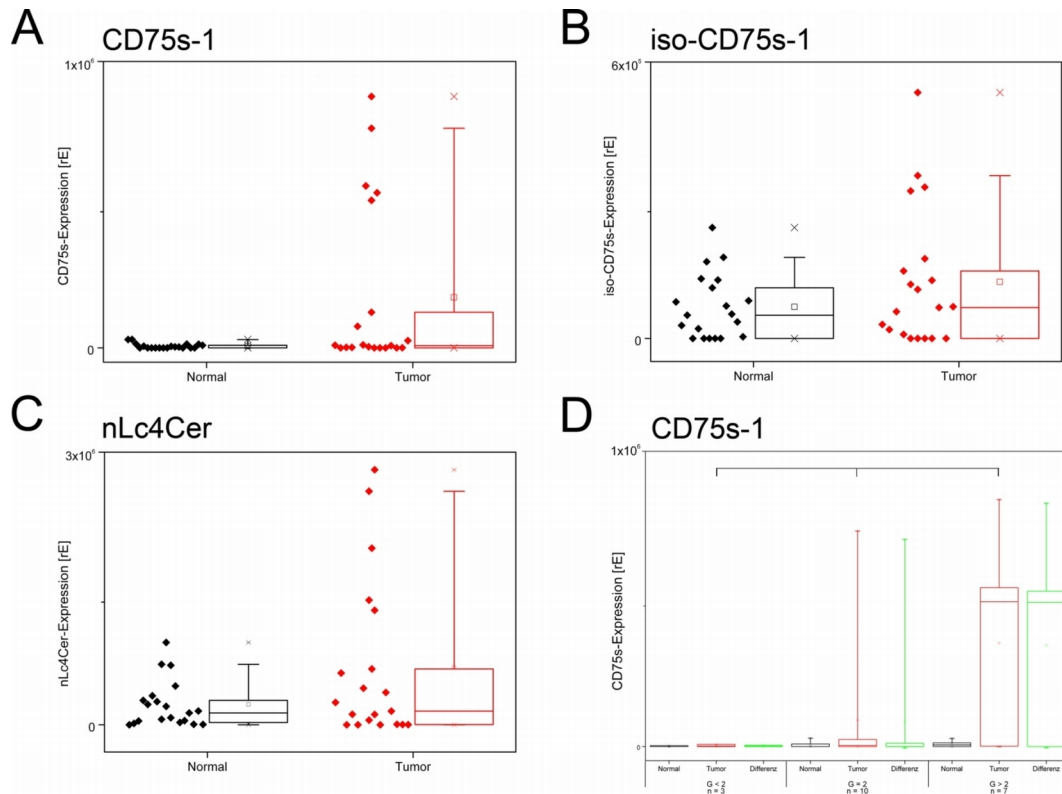


Abbildung 5.13: Boxplot-Diagramme der Expression von CD75s-1-Gangliosiden (A), iso-CD75s-1-Gangliosiden (B), deren Vorläuferstruktur nLc4Cer (C) und die Korrelation der CD75s-1-Gangliosidexpression mit dem Differenzierungsgrad G (D) in Nierenkarzinomen und gesundem Vergleichsgewebe (n = 20 Patienten). Die Begrenzung der in der Box befindlichen Stichproben erfolgt durch das 25%- bzw. 75%-Perzentil. Der Median wird durch die horizontale Linie innerhalb der Box angegeben. Das arithmetische Mittel wird durch das kleine Quadrat gekennzeichnet. Die Kreuze ober- und unterhalb der Box geben den höchsten bzw. niedrigsten Messwert an. **(A)** Die Expression von CD75s-1-Gangliosiden ist im Falle von Nierenkarzinomen und gesundem Vergleichsgewebe signifikant erhöht (*, $P = 0,025$). **(B)** Die iso-CD75s-1-Expression ist im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Normalgewebe hoch signifikant erhöht (**, $P = 0,000$). **(C)** Die Expression der Vorläuferstruktur beider Ganglioside, nLc4Cer, ist bei Nierentumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe ebenfalls, aber nicht signifikant erhöht ($P = 0,144$). **(D)** Entsprechend ihrer Differenzierung wurden die Proben in drei Gruppen eingeteilt: $G < 2$ (n = 3 Patienten), $G = 2$ (n = 10 Patienten) und $G > 2$ (n = 7 Patienten). Es besteht eine Korrelation zwischen der CD75s-Expression in Nierentumorgewebe und dem Differenzierungsgrad G. Sowohl die absolute Expression an CD75s-1-Gangliosiden in Tumorgewebe als auch die differentielle Expression steigt mit höherem Differenzierungsgrad an (*, $P = 0,033$ bzw. $P = 0,048$).

In Abbildung 5.13 A und B ist gezeigt, dass die Expression von CD75s-1- und iso-CD75s-1-Gangliosiden in Nierentumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht ist. Bei CD75s ist dieser Unterschied signifikant ($P = 0,025$) und bei iso-CD75s hoch signifikant ($P = 0,000$). Die Boxplots spiegeln auch wieder, dass die Expression der Vorläuferstruktur nLc4Cer

ebenfalls erhöht ist (vgl. Abb. 5.13 C), allerdings ergab die statistische Auswertung mittels Vorzeichentest keinen signifikanten Zusammenhang.

Die statistische Analyse der Rangkorrelation τ nach Kendall ergab weiterhin, dass die Expression von CD75s-1- und iso-CD75s-1-Gangliosiden korreliert. Maligne Gewebe mit erhöhter Expression an CD75s-1 zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression an iso-CD75s-1-Gangliosiden ($P = 0,001$, $\tau = 0,550$). Dieser hoch signifikante Zusammenhang lässt sich auch bei den differentiellen Expressionen nachweisen ($P = 0,001$, $\tau = 0,535$). Ebenso ist die Expression der Vorläuferstruktur nLc4Cer im Vergleich zur CD75s-1-Expression in Tumorgewebe hoch signifikant erhöht ($P = 0,005$, $\tau = 0,469$). Dieser Zusammenhang wurde in der Verbindung der Daten aus nLc4Cer-Expression und der Expression von iso-CD75s-Gangliosiden nicht gefunden ($P = 0,158$, $\tau = 0,234$).

Eine weitere Korrelation konnte zwischen dem Grading G und der CD75s-Expression in Tumorgewebe nachgewiesen werden (vgl. 5.13 D). Dabei weisen die Proben mit gutem Differenzierungsgrad ($G < 2$, $n = 3$ Patienten) gegenüber mäßig bis schlechtem Differenzierungsgrad ($G = 2$, $n = 10$ Patienten) und undifferenzierter Einstufung ($G > 2$, $n = 7$ Patienten) einen signifikanten Unterschied auf ($P = 0,033$, $\tau = 0,388$). Weitere Zusammenhänge zwischen anderen klinischen Parametern des TNM-Systems und/oder anderen Expressionen anderer GSL wurden nicht gefunden.

5.4.2 Gb3Cer und Gb4Cer

Die Abbildung 5.14 zeigt die Boxplots der densitometrischen Daten der Expressionsanalyse von Gb3Cer und Gb4Cer in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben ($n = 20$ Patienten).

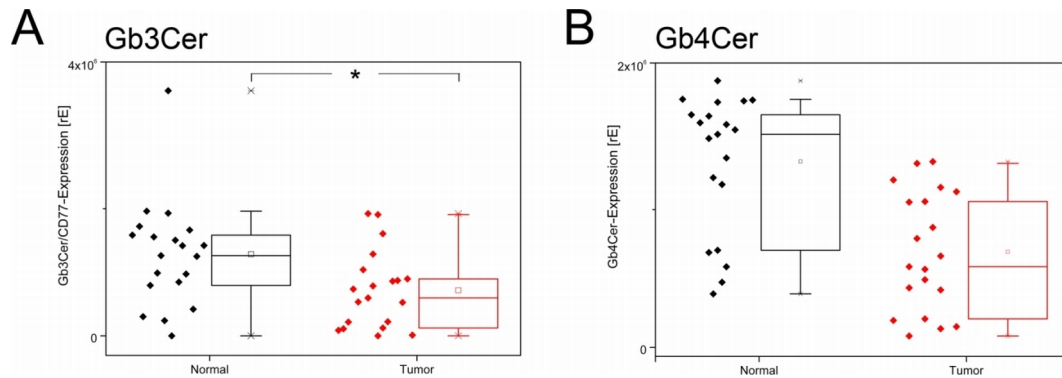


Abbildung 5.14: Boxplot-Diagramme der Gb3Cer- (A) und Gb4Cer-Expression (B) in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben ($n = 20$ Patienten). Die Begrenzung der in der Box liegenden Stichproben erfolgt durch das 25%- bzw. 75%-Perzentil. Der Median (horizontale Linie) und das arithmetische Mittel (Quadrat) befinden sich innerhalb der Box. Die Kreuze ober- und unterhalb der Box geben den höchsten bzw. niedrigsten Messwert an. **(A)** Die Expression von Gb3Cer unterscheidet sich signifikant im Falle von Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben (*, $P = 0,027$). **(B)** Bei Gb4Cer ist ebenfalls eine Verminderung zu beobachten, allerdings ist diese nicht signifikant ($P = 0,194$).

Die Abbildung 5.14 veranschaulicht, dass die Gb3Cer-Expression im Falle von Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben verringert ist. Auch bei Gb4Cer scheint dies der Fall zu sein, allerdings liegt im Gegensatz zu Gb3Cer ($P = 0,027$) keine Signifikanz vor. Die statistische Analyse der Expression von Gb3Cer und Gb4Cer im Normalgewebe mittels Rangkorrelation τ nach Kendall zeigte ebenfalls einen hoch signifikanten Unterschied ($P = 0,000$, $\tau = 0,568$). Die Expression dieser beiden GSL ist auch im Fall der Tumorgewebe mit $P = 0,001$ und $\tau = 0,526$ hoch signifikant verschieden. Vergleicht man die differentielle Expression, welche ein Maß für die Änderung von Tumor- zu Normalgewebe darstellt, so lässt sich auch hier ein signifikanter Zusammenhang bezüglich der Gb3Cer-Expression im Normalgewebe und der differentiellen Expression ($P = 0,004$, $\tau = -0,474$) ausmachen. Bei Gb4Cer verhält es sich in letzterem Fall auch so, d. h., dass die Expression im Normalgewebe im Vergleich zur differentiellen Expression mit $P = 0,002$ und $\tau = -0,495$ hoch signifikant verschieden ist. Diese Daten belegen, dass während der malignen Transformation eine Verringerung der Expression an Globoserie-GSL stattfindet.

Weiterhin wurden die Daten aus den Expressionsanalysen mit den pathologischen Merk-

malen und den klinischen Parametern verglichen. Es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expressionen von Gb3Cer/CD77 bzw. Gb4Cer und dem Grading, UICC-Stadium oder einem der Parameter des TNM-Systems gefunden werden.

5.5 Tumorassoziierte Glykosphingolipide in Pankreaskarzinomzelllinien

5.5.1 Proliferationsassay mit WST-1

Mit einem Proliferationsassay, wie dem WST-1-Assay, lässt sich der Einfluss eines Toxins auf die Viabilität von Zellen bestimmen. Das WST-1-Reagenz, ein tertiäres Tetrazoliumsalz, wird durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase, einem Enzym der Atmungskette, in intakten viablen Zellen in das dunkelrote Formazan umgesetzt. Dieses kann photospektrometrisch quantifiziert werden, wobei über die Extinktionswerte auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden kann. Somit kann nach der Zugabe einer bestimmten Menge Lektin im Vergleich zu Kontrollproben ohne Toxinbehandlung, die Zytotoxizität bestimmt werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der WST-1 Assays der sieben Pankreaskarzinomzelllinien (vgl. Kap. 4.3.1) mit ML-I und rekombinant hergestelltem rViscumin dargestellt.

WST-1-Assay mit ML-I

Die Abbildung 5.15 zeigt die Ergebnisse der WST-1 Assays der sieben Pankreaskarzinomzelllinien nach Behandlung mit ML-I. Die Einsaat der Zellen erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie, so dass die Zellen innerhalb von 48 h die Konfluenz erreicht hatten. Jeder Ansatz wurde dann für weitere 48 h mit 100 μ L in Zellkulturmedium verdünntem ML-I in den Konzentrationen von 0,00001 bis 100 ng \cdot mL inkubiert. Alle Ansätze wurden in Vierfachbestimmung ausgeführt.

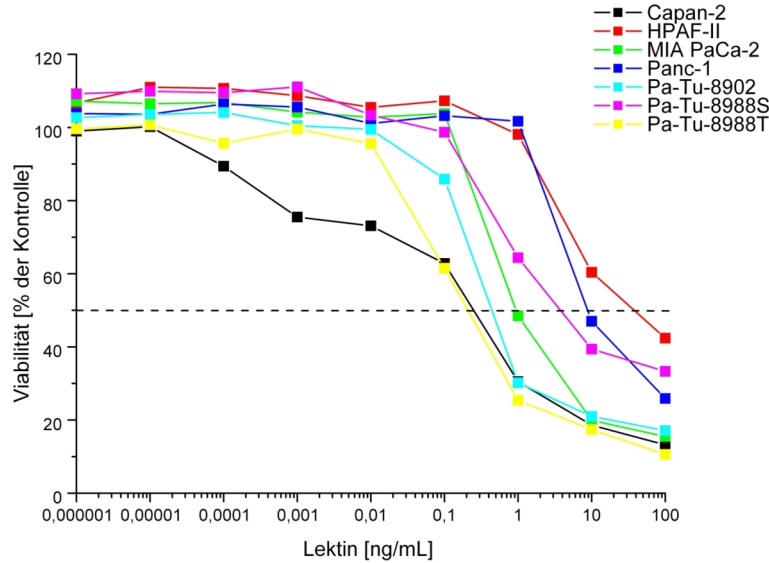


Abbildung 5.15: Viabilität der sieben Pankreaskarzinomzelllinien unter Einfluss von ML-I.

Die Zellen wurden 48 h mit ML-I in Konzentrationen von 0,00001 bis 100 ng · mL inkubiert. Es sind die Mittelwerte der Ergebnisse als Prozent der nicht mit ML-I behandelten Kontrolle dargestellt. Alle Ansätze wurden in Vierfachbestimmung ausgeführt.

Den Graphen aus Abbildung 5.15 kann entnommen werden, dass die sieben untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien eine konzentrationsabhängige Sensitivität gegenüber ML-I zeigen, im Vergleich zueinander aber unterschiedlich auf das ML-I reagieren. Während Capan-2 schon ab einer Konzentration von 1 pg · mL⁻¹ auf das Lektin anspricht, zeigt die Mehrheit der Zelllinien bei dieser Konzentration keine Reaktion. Ab 0,1 ng · mL⁻¹ kann bei der Zelllinie Pa-Tu-8902 eine Reduktion der Viabilität verzeichnet werden. Während bei HPAF-II und Panc-1 selbst bei einer Konzentration von 1 ng · mL⁻¹ noch keinerlei Reaktion auf das Toxin auftrat, zeigen die anderen Zelllinien ab dieser Konzentration einen starken Abfall der Viabilität von 50 bis 70%. Die zuvor erwähnten Capan-2 und Pa-Tu-8902 fallen hier auf unter 40% der Viabilität. Konzentrationen von 100 ng · mL⁻¹ des Lektins führen bei den Zelllinien Capan-2, MIA PaCa-2, Pa-Tu-8902 und Pa-Tu-8988T zu einem Wert von 20% der ursprünglichen Viabilität. Die halbmaximale lethale Dosis (LD₅₀) des ML-I auf die sieben Pankreaskarzinomzelllinien wird durch die gestrichelte Linie in Abbildung 5.15 gekennzeichnet. Die LD₅₀-Werte sind in nachfolgender Tabelle 5.11 aufgeführt.

Tabelle 5.11: LD₅₀-Werte für die mit ML-I behandelten Pankreaskarzinomzelllinien

Pankreaskarzinomzelllinie	LD ₅₀ [ng · mL]
Capan-2	0,7
HPAF-II	11,3
MIA PaCa-2	0,4
Panc-1	4,6
Pa-Tu-8902	0,3
Pa-Tu-8988S	3,9
Pa-Tu-8988T	0,3

WST-1 Assay mit rViscumin

Die Abbildung 5.16 zeigt die Ergebnisse des WST-1 Assays der sieben Pankreaskarzinomzelllinien nach der Behandlung mit rViscumin. Die Zellen wurden über 48 h bis zur Konfluenz in den Mikrotiterplatten gezüchtet und für weitere 48 h mit in 100 μ L verdünntem rViscumin in Konzentrationen von 0,00001 bis 100 ng · mL inkubiert. Alle Ansätze wurden in Vierfachbestimmung durchgeführt.

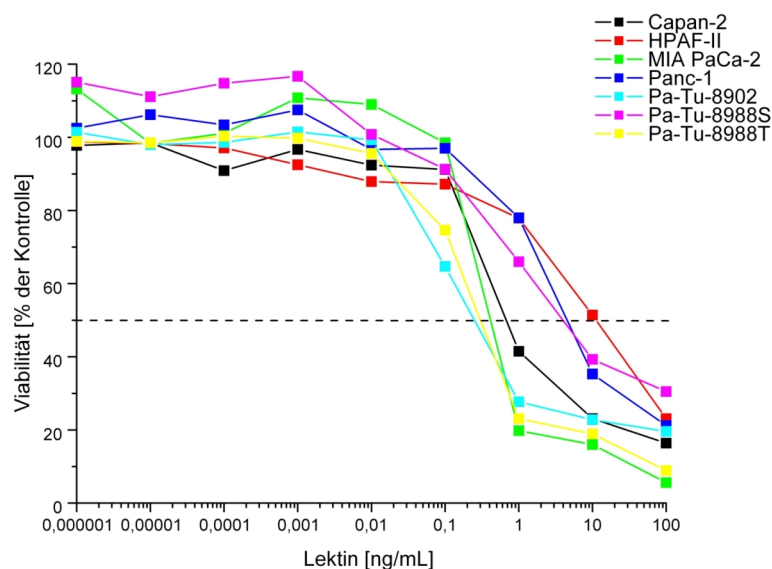


Abbildung 5.16: Einfluss auf die sieben Pankreaskarzinomzelllinien unter Einfluss von rViscumin. Die Zellen wurden 48 h mit rViscumin in Konzentrationen von 0,00001 bis 100 ng · mL inkubiert. Es sind die Mittelwerte der Ergebnisse als Prozent der nicht mit rViscumin behandelten Kontrolle dargestellt. Alle Ansätze wurden in Vierfachbestimmung ausgeführt.

Aus den Graphen aus Abbildung 5.16 ist ersichtlich, dass die sieben untersuchten Pankreaszelllinien unterschiedlich sensitiv auf das rViscumin reagieren. Erst bei einer Konzentration von $0,1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ zeigen Pa-Tu-8902 und Pa-Tu-8988T eine Reaktion auf das Lektin. Eine Reaktion bei den verbleibenden fünf Zelllinien kann ab einer Lektinkonzentration von $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ nachgewiesen werden. Es ist ein starker Abfall der Viabilität der Zelllinien MIA PaCa-2, Pa-Tu-8902, Panc-1 und Capan-2 auf 20 bis 40% zu verzeichnen. Pa-Tu-8988S, Pa-Tu-8988T und HPAF-II weisen allerdings immer noch eine Viabilität von 60% bis 80% auf. Bei einer rViscumin-Konzentration von $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ sinkt die Viabilität für diese drei Zelllinien unter 50%. Konzentrationen von $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ des Lektins führen bei den Zelllinien MIA PaCa-2 und Pa-Tu-8988T zu einem Wert von 10% der ursprünglichen Viabilität. Capan-2, Pa-Tu-8902, Panc-1 und HPAF-II fallen auf ca. 20% und Pa-Tu-8988S auf 30%. Die halbmaximale lethale Dosis (LD_{50}) des rViscumins auf die sieben Pankreaskarzinomzelllinien wird durch die gestrichelte Linie in der Abbildung 5.15 angegeben. Die LD_{50} -Werte sind in nachfolgender Tabelle 5.11 aufgeführt.

Tabelle 5.12: LD_{50} -Werte für die mit rViscumin behandelten Pankreaskarzinomzelllinien

Pankreaskarzinomzelllinie	LD_{50} [ng · mL]
Capan-2	0,3
HPAF-II	36,5
MIA PaCa-2	0,9
Panc-1	8,7
Pa-Tu-8902	0,4
Pa-Tu-8988S	3,7
Pa-Tu-8988T	0,2

Vergleich der WST-1 Assays

Im Folgenden werden die Ergebnisse der beiden WST-1 Assays bezüglich jeder einzelnen Zelllinie verglichen. Für einen direkten Vergleich wird jeweils ein Säulendiagramm für jede einzelne Zelllinie dargestellt. Dabei werden die Viabilitäten als Prozent der Kontrolle gegen die Lektinkonzentration aufgetragen. Die schwarzen Balken geben die Werte für ML-I und die weißen Balken die Werte für rViscumin an. In nachfolgender Abbildung 5.17 sind die Säulendiagramme für den direkten Vergleich der Lektine abgebildet.

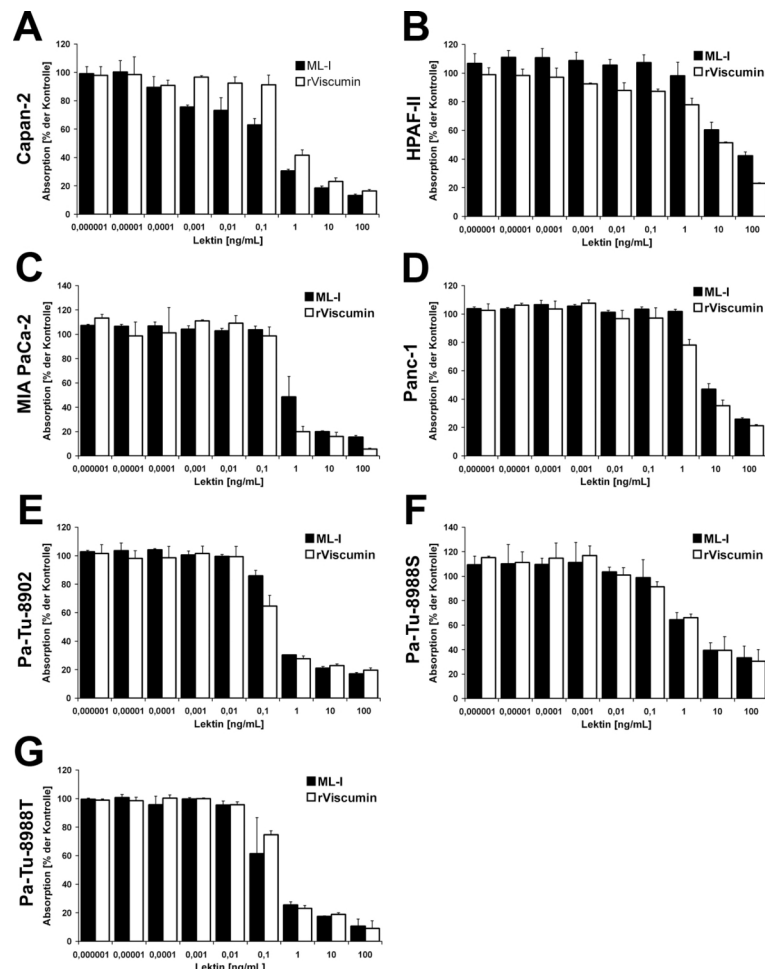


Abbildung 5.17: Vergleich der WST-1 Assays. Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Assays werden die Viabilitäten als Prozentzahl der Kontrolle gegen die Lektinkonzentration in Form eines Säulendiagramms aufgetragen. Die schwarzen Balken stehen dabei für den WST-1 Assay mit ML-I und die weißen Balken repräsentieren die Ergebnisse des WST-1 Assays mit rViscumin.

Aus Abbildung 5.17 geht hervor, dass jede Zelllinie für sich genommen sehr ähnlich auf die beiden Lektine reagieren. Wie schon aus den vorherigen Abbildungen 5.15 und 5.16 deutlich geworden ist, zeigt Capan-2 die stärkste Reaktion auf die Lektine. Aber auch

HPAF-II und Pa-Tu-8988S weisen eine stetig zunehmende Verminderung mit höheren Lektinkonzentrationen auf. Während Pa-Tu-8902 und Pa-Tu-8988T bereits ab $0,1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf die Lektine reagieren, zeigen die verbleibenden Zelllinien MIA PaCa-2 und Panc-1 erst ab 1 ng eine Reaktion auf die Lektine.

Kleine Unterschiede lassen sich bei Capan-2 erkennen. ML-I wirkt sich bereits in geringen Konzentration von $0,1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ negativ auf die Viabilität der Zelllinie aus. Beim rViscumin hingegen nimmt die Überlebensrate erst ab einer Konzentration von $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ab. Allerdings nähern sich die Werte der Viabilitäten bei einer Erhöhung der Konzentration um einer Zehnerpotenz wieder an, um dann bei weiterer Erhöhung der Lektinkonzentration annähernd gleich zu bleiben. Bei HPAF-II gilt es einen weiteren Unterschied festzuhalten. Insgesamt gesehen scheint das ML-I einen höheren Effekt auf die Viabilität der Zelllinie zu haben. Den ganzen Verlauf betrachtet zeigt sich kein Unterschied in der Abnahme der Überlebensrate. Was allen Zelllinien gemein ist und erst in dieser Darstellungsweise deutlich wird, ist die rapide Reduktion der Viabilität bei einer Lektinkonzentration von $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nur HPAF-II und Panc-1 zeigen bei dieser Konzentration noch eine Überlebensrate von über 80%.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass beide Assays zu annähernd gleichen Ergebnissen geführt haben. Somit besitzen ML-I und sein rekombinantes Pendant rViscumin eine nahezu identische Wirksamkeit.

5.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die immunfluoreszenzmikroskopische Nachweise von CD75s-Gangliosiden durch Lektin vermittelte Detektion bei Pankreaskarzinomzelllinien (vgl. Tabelle 4.6) ist im Folgenden dargestellt. Insgesamt wurden sieben Zelllinien mit ML-I und rViscumin untersucht. Es wurden zwei verschiedene Kontrolllexperimente durchgeführt, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, die durch unspezifische Bindungen der Antikörper mit bspw. Fc-Rezeptoren auf den Zellen zustande kommen könnten. Dazu wurde in Kontrolle 1 auf Zugabe des Lektins verzichtet und in Kontrolle 2 der gegen die Lektine gerichtete Primärantikörper weggelassen.

Die Abbildung 5.18 zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie der Pankreaskarzinomzelllinie Capan-2.

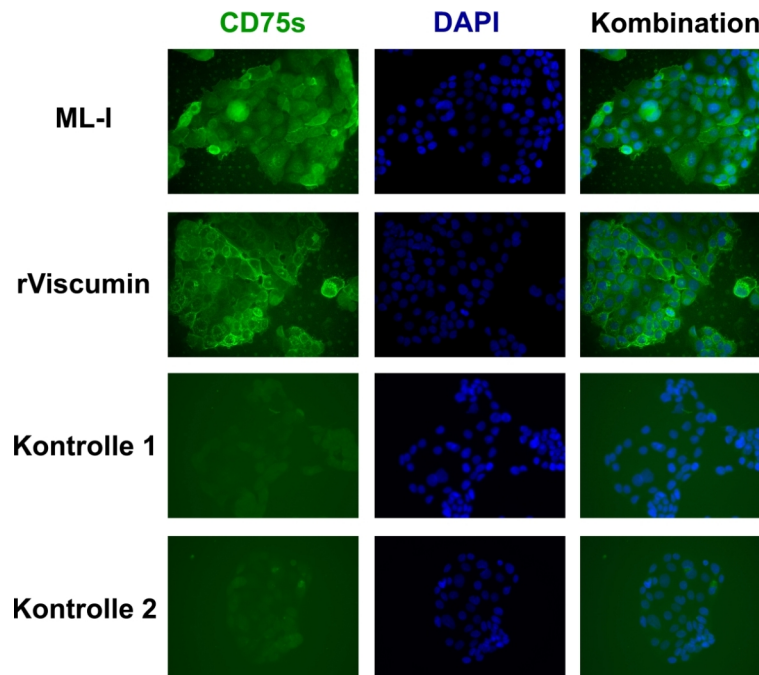


Abbildung 5.18: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie Capan-2. Nach Zugabe von 1 ng ML-I bzw. rViscumin wurde die Bindung der Lektine an die Zellen mittels einem Maus Anti-ML-I-AK und einem Alexa488-gekoppelten Ziege Anti-Maus-IgG-AK nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. In Kontrolle 1 wurde auf die Zugabe der Lektine verzichtet und bei Kontrolle 2 wurde der gegen die Lektine gerichtete Primärantikörper weggelassen.

Die Pankreaskarzinomzelllinie Capan-2 zeigt eine deutliche Expression an CD75s-Gangliosiden. Insgesamt konnte im gesamten Zellverbund eine Färbung nachgewiesen werden,

wobei einzelne Zellen sich aufgrund stärkerer Färbung ihrer Membranen erkennen lassen. Da sich bei den beiden Kontrollen keine Färbung zeigt, ist eine Kreuzreaktion bzw. unspezifische Bindung des Primär- und/oder Sekundärantikörpers auszuschließen.

Nachfolgende Abbildung 5.19 zeigt den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-II.

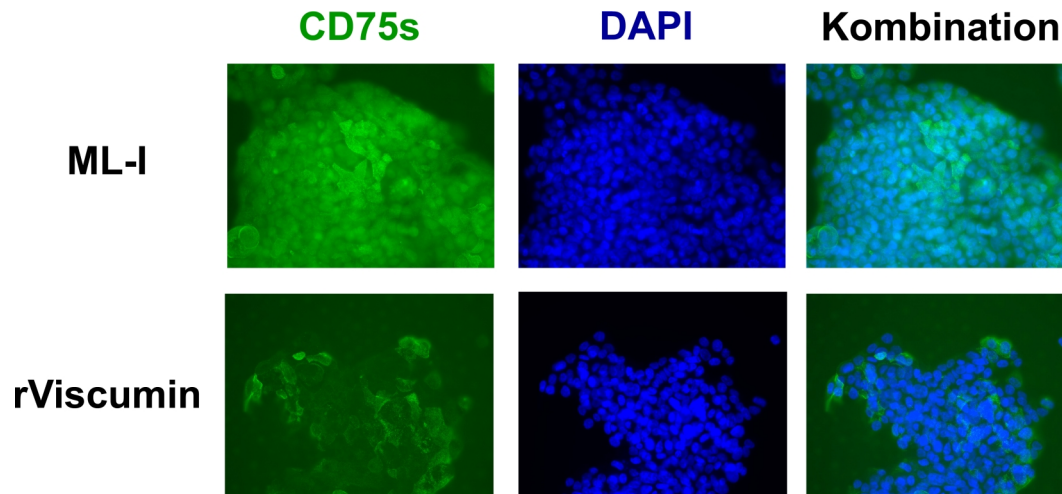


Abbildung 5.19: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-II. Nach Zugabe von 1 ng ML-I bzw. rViscumin wurde die Bindung des Lektins an die Zellen mittels Maus Anti-ML-I-AK und einem Alexa488-gekoppelten Ziege Anti-Maus-IgG-AK nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Auch hier zeigen die Zellen eine Expression an CD75s-Gangliosiden. Während allerdings beim ML-I der gesamte Zellverbund eine nahezu einheitliche Färbung zeigt, sind bei dem Experiment mit rViscumin einzelne Zellen an den Rändern des Verbunds deutlich stärker gefärbt. Die Kontrolleexperimente führten zu den gleichen negativen Resultaten wie bei Capan-2 (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 5.20 zeigt den Nachweis von CD75-Gangliosiden mittels Immunfluoreszenz bei der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2.

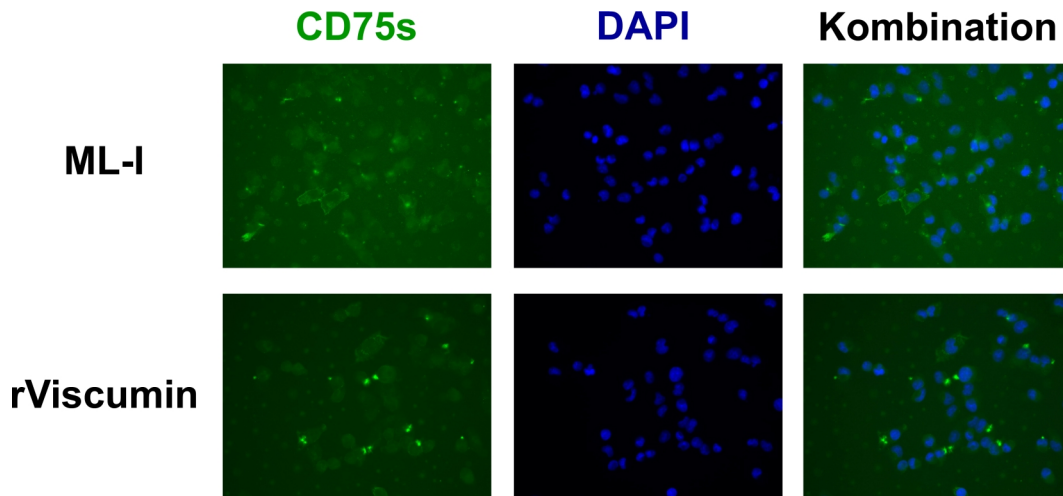


Abbildung 5.20: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2. Nach Zugabe von 1 ng ML-I bzw. rViscumin wurde die Bindung des Lektins an die Zellen mittels Maus Anti-ML-I-AK und einem Alexa488-gekoppelten Ziege Anti-Maus-IgG-AK nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Bei MIA PaCa-2 lässt sich CD75s nur in geringer Menge nachweisen. Der Abbildung 5.20 ist zu entnehmen, dass eine Expression von CD75-Gangliosiden vorhanden ist, allerdings ist diese sehr viel schwächer als die von bspw. Capan-2. Nur einzelne Zellen zeigen eine deutliche Färbung. Wie schon bei HPAF-II zeigen die Zellen auch hier eine stärkere Reaktion bezüglich des ML-I. Die Kontrollexperimente ermöglichen den Ausschluß von Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Im nachfolgenden Bild 5.21 ist die immunfluoreszenzmikroskopische CD75s-Expressionsanalyse bei der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 dargestellt.

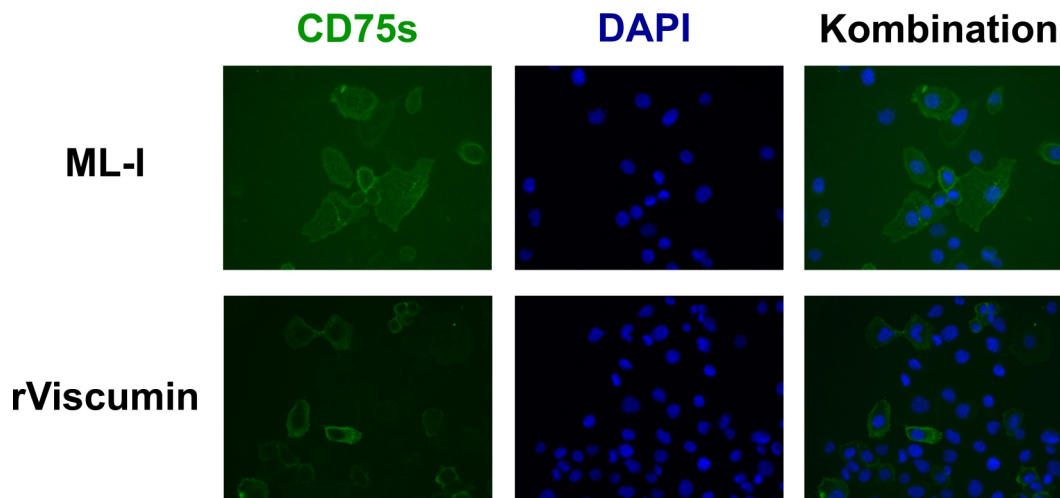


Abbildung 5.21: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1. Nach Zugabe von 1 ng ML-I bzw. rViscumin wurde die Bindung des Lektins an die Zellen mittels Maus Anti-ML-I-AK und einem Alexa488-gekoppelten Ziege Anti-Maus-IgG-AK nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Wie der Abbildung 5.21 zu entnehmen ist, zeigte auch diese Pankreaszelllinie eine Expression an CD75s-Gangliosiden. Sowohl bei der Behandlung mit ML-I als auch mit der rekombinanten Variante können deren Rezeptoren auf den Zellen nachgewiesen werden. Allerdings weisen wiederum nur einzelne Zellen eine Färbung auf. Diese ist vornehmlich an der Zellmembran lokalisiert. Auch hier wurden die Kontrollexperimente durchgeführt und waren ebenfalls negativ (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 5.22 zeigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie der Pankreaskarzinomzelllinie Pa-Tu-8902.

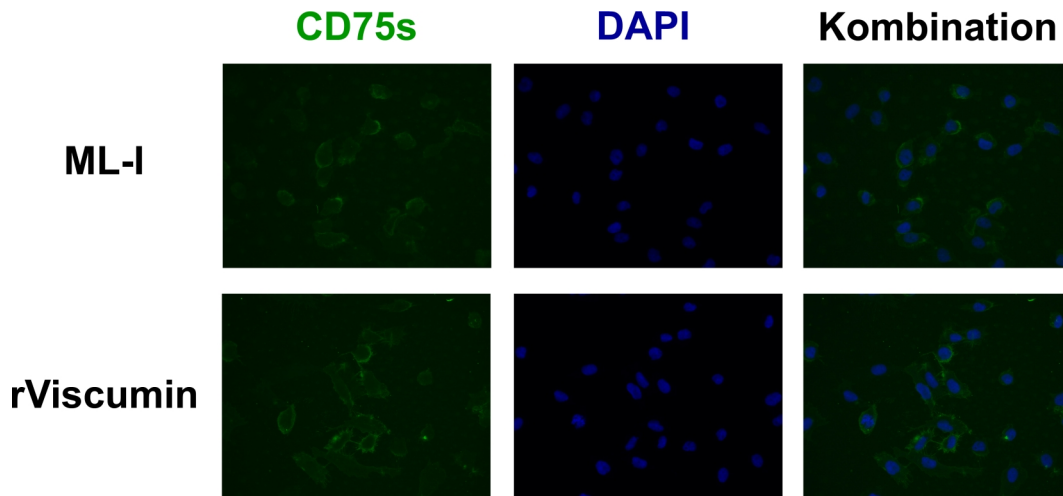


Abbildung 5.22: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie Pa-Tu-8902. Nach Zugabe von 1 ng ML-I bzw. rViscumin wurde die Bindung des Lektins an die Zellen mittels Maus Anti-ML-I-AK und einem Alexa488-gekoppelten Ziege Anti-Maus-IgG-AK nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Auch die Zelllinie Pa-Tu-8902 zeigt eine CD75s-Expression, wie dem Bild 5.22 zu entnehmen ist. Wiederum befindet sich die Färbung ausschließlich an den Zellmembranen einzelner Zellen. Auffällig ist, dass manche Zellen Podien ausbilden, die eine stärkere Färbung aufweisen, als der Rest der Zelle. Die Kontrollexperimente führten auch bei Pa-Tu-8902 zu negativen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

Nachfolgende Abbildung 5.19 zeigt den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie Pa-Tu-8988S.

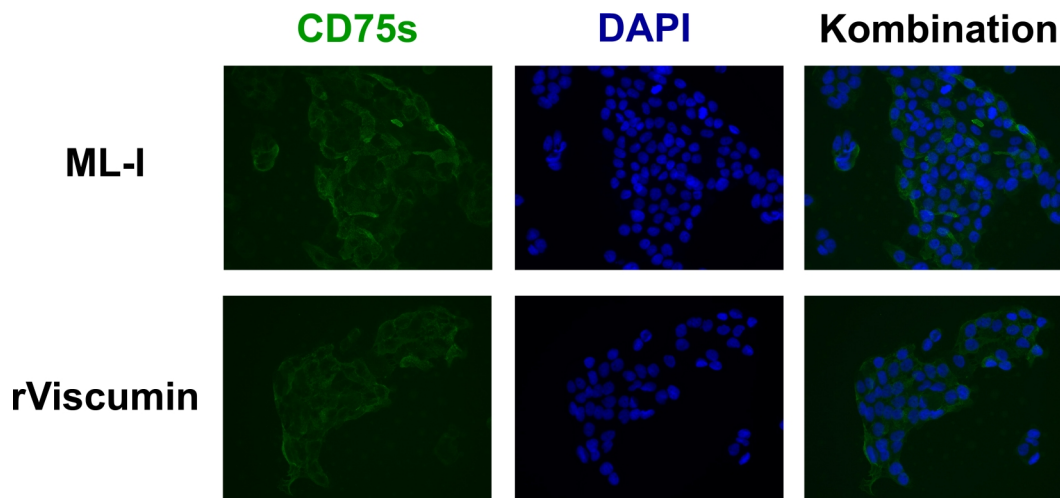


Abbildung 5.23: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie Pa-Tu-8988S. Nach Zugabe von 1 ng ML-I bzw. rViscumin wurde die Bindung des Lektins an die Zellen mittels Maus Anti-ML-I-AK und einem Alexa488-gekoppelten Ziege Anti-Maus-IgG-AK nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Auch die sphäroid wachsenden Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie Pa-Tu-8988S zeigen eine starke CD75s-Expression. Auffällig ist vor allem der äußere Bereich der Sphären, der eine höhere Expression des Gangliosids aufweist. Die Kontrollexperimente führten auch hier zu negativen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

Im nachfolgenden Bild 5.24 ist die immunfluoreszenzmikroskopische CD75s-Expressionsanalyse bei der Pankreaskarzinomzelllinie Pa-Tu-8988T dargestellt.

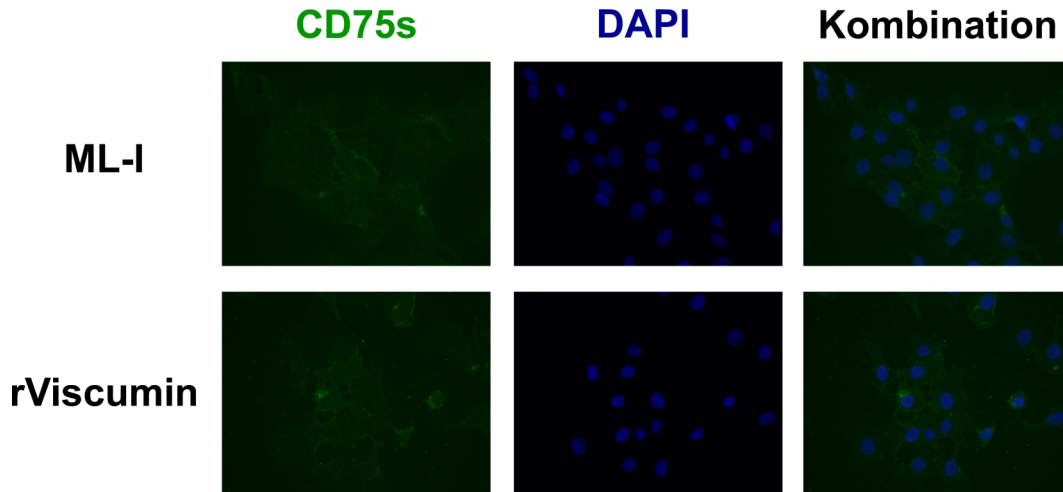


Abbildung 5.24: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden bei der Pankreaskarzinomzelllinie Pa-Tu-8988T. Nach Zugabe von 1 ng ML-I bzw. rViscumin wurde die Bindung des Lektins an die Zellen mittels Maus Anti-ML-I-AK und einem Alexa488-gekoppelten Ziege Anti-Maus-IgG-AK nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Bei der Pankreaskarzinomzelllinie Pa-Tu-8988T kann von einer Expression der CD75s-Ganglioside ausgegangen werden. Die Färbung ist vor allem an den Zellmembranen zu erkennen. Wie schon bei Pa-Tu-8902 sind gerade die Ausläufer der Zellen stärker gefärbt als der Rest der Zelle. Die Negativkontrollen führten auch hier zu negativen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

Der immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von CD75s-Gangliosiden führte insgesamt bei alle sieben Pankreaskarzinomzelllinien zu positiven Ergebnissen. Sowohl bei der Behandlung mit ML-I als auch mit rViscumin konnte eine Färbung nachgewiesen werden. Rein visuell lassen sich kaum Unterschiede in der Färbung bei den einzelnen Zelllinien ausmachen.

Um die Hinweise auf das Vorhandensein des ML-I- bzw. rViscumin-Rezeptors CD75s bei Pankreaskarzinomzelllinien durch den Nachweis mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und die Wirksamkeit der Lektine auf die Zelllinien, sollte in weiterführenden Experimenten im Tiermodell weiter untersucht werden. Sollte eine derzeit laufende klinische Phase II-Studie bezüglich der Wirksamkeit von rViscumin beim metastasierenden Kolo-

rektalkarzinom erfolgreich sein (www.cytavis.com), so rückt eine Adjuvanttherapie von Pankreaskarzinomen mit rViscumin immer mehr ins Zentrum des Interesses.

5.6 Automatisierte Mehrfachchromatographie von langkettigen neutralen GSL

Das GSL nLc4Cer ist die Vorläuferstruktur von CD75s- und iso-CD75s-GSL. Dabei wird durch eine spezifische Sialyltransferase die Sialinsäure Neu5Ac terminal in α 2-6-Konfiguration für CD75s oder in α 2-3-Konfiguration für iso-CD75s an die Galaktose des endständigen Disaccharids Gal β 4GlcNAc gebunden. Das nLc4Cer kann aber auch durch eine Fukosyltransferase modifiziert werden. Über subterminale Bindung einer Fucose an das Disaccharid entsteht die Lewis^X-Struktur Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc, die auch als CD15 bezeichnet wird. Aufgrund der engen Verwandtschaft durch die gemeinsame Vorläuferstruktur nLc4Cer mit den tumorassoziierten CD75s- und iso-CD75s-Gangliosiden sollen CD15-GSL ebenfalls auf ihre GSL-Expression untersucht werden. Erste Experimente mit herkömmlicher DC ergaben, dass die CD15-Struktur vornehmlich auf langkettigen GSL zu finden ist. Da die herkömmliche DC aber ungeeignet für eine Trennung von langkettigen GSL ist, musste eine Methode etabliert werden, die die Trennung von langkettigen GSL mit CD15-Epitop ermöglicht.

5.6.1 DC und Immundetektion

Nachfolgend werden die Ergebnisse der automatisierten Mehrfachchromatographie (AMD, engl. *Automated Multiple Development*) von langkettigen CD15-GSL präsentiert. Zum Vergleich eines Einfachlaufs in einem herkömmlichen DC-Tank und der automatisierten Mehrfachchromatographie mit dem AMD2-Gerät wurden 40 μ g-Aliquots einer Mischung aus neutralen GSL von humanen Granulozyten jeweils mehrfach auf eine DC-Platte aufgetragen und entwickelt. Anschließend wurde ein Streifen mit getrennten GSL von den Glasplatten abgetrennt und mit Orcinol gefärbt, um alle GSL dieser Mischung sichtbar zu machen. Ein jeweiliger Parallelstreifen wurde dem Overlay-Assay zugeführt, wobei als Primärantikörper ein Maus IgM Anti-CD15-AK (Klon:80H5) diente und als Sekundärantikörper ein AP-gekoppelter Ziege Anti-Maus IgG & IgM-AK eingesetzt wurde. Nachfolgende Abbildung 5.25 stellt die beiden Chromatographie- und Nachweisarten im direkten Vergleich dar.

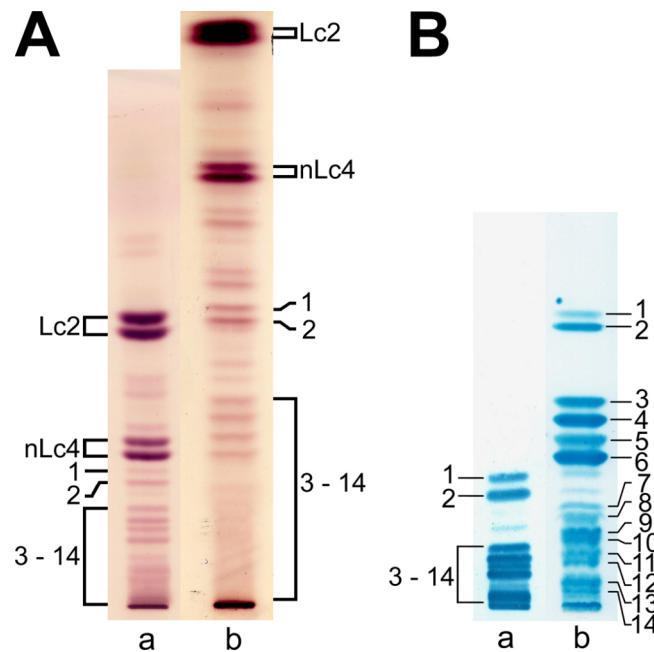


Abbildung 5.25: Vergleich einer herkömmlichen DC und der AMD. (A) Orcinfärbungen neutraler GSL aus humanen Granulozyten mittels herkömmlicher DC (a) und drei aufeinander folgende Entwicklungen mittels AMD (b) getrennt. (B) Korrespondierender Overlay-Assay mit einem Maus Anti-CD15-AK nach herkömmlichen Einfachchromatographie (a) gegenüber drei aufeinander folgenden Läufen mit dem AMD2-System (b). 40 μ g neutrale GSL wurden pro Bahn aufgetragen.

In Teil A der Abbildung 5.25 ist die Orcinfärbung von neutralen GSL aus humanen Granulozyten im direkten Vergleich nach Einfach- und Dreifachchromatographie dargestellt. Die in Bahn a aufgeführte Einfachchromatographie ist im Laufmittel für neutrale GSL C/M/W (120/70/17, v/v/v) durchgeführt worden. Bei der automatisierten Mehrfachchromatographie wurde das Laufmittel automatisch in der im Gerät integrierten Mischkammer angesetzt und in die Entwicklungskammer eingefüllt. Die Laufmittelzusammensetzung wurde dabei entspricht dem der Einfachchromatographie programmiert. Nach der ersten Trennung erfolgte ein Trocknungsschritt von 10 Minuten unter Vakuum, bevor eine weitere Chromatographie automatisch durchgeführt wurde. Insgesamt wurde das AMD auf drei Läufe mit intermediären Trocknungszeiten von 10 Minuten programmiert. Teil B der Abbildung 5.25 zeigt den Overlay-Assay, der mit einem Maus Anti-CD15-AK, der die CD15-Strukturen, die in dem GSL-Gemisch aus humanen Granulozyten enthalten sind, detektiert. Um welche Strukturen es sich bei den immungefärbten Banden im Einzelnen handelt, wird mittels IR-MALDI-o-TOF Massenspektrometrie analysiert (siehe Kapitel 5.6.2).

5.6.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von langkettigen GSL

Die mittels AMD getrennten und immundetektierten GSL wurden zur strukturellen Charakterisierung massenspektrometrisch analysiert. Dazu wurde die direkte DC-IR-MALDI-o-TOF MS Methode im Positivionenmodus benutzt. Nach Entfernung des Plexigum-Fixativs durch mehrmaliges Tauchen in Chloroform wurde Glycerin als Flüssigmatrix auf die immungefärbten Banden getropft. In den folgenden Abbildungen 5.26 bis 5.32 sind die Hauptkomponenten der jeweiligen Banden gezeigt. Zu Orientierungszwecken wird die jeweils gemessene Bande durch einen Pfeil markiert. Die Nummerierung der Massenspektren korrespondiert mit den Nummern des AMD-DC-Immunnachweises in Abbildung 5.25 B, Bahn b.

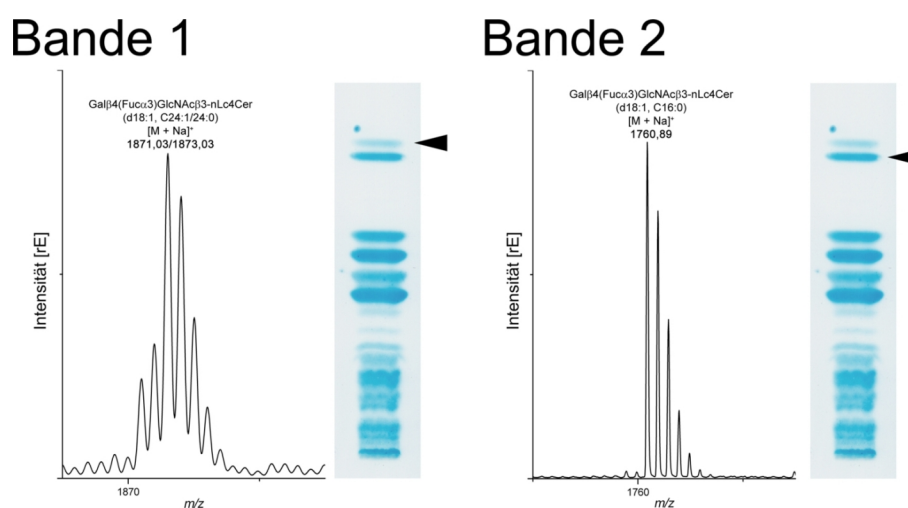


Abbildung 5.26: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von CD15-GSL: Banden 1 und 2.

Die mittels AMD aufgetrennten CD15-GSL wurden direkt von der DC-Platte desorbiert. Detektierte Molekülonen, theoretische m/z -Werte sowie Strukturvorschläge für die detektierten CD15-GSL sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

In der immungefärbten Bande 1 lassen sich CD15-Spezies mit nLc6Cer-Grundstruktur, C24:1/24:0-Fettsäure und m/z 1871,01 bzw. 1873,02 detektieren. In Bande 2 lassen sich CD15-GSL mit nLc6-Grundstruktur, C16-Fettsäure bei einem m/z von 1760,89 nachweisen. Das typische Doppelbandenmuster wird allein durch den Unterschied in der Kettenlänge der Fettsäure gebildet.

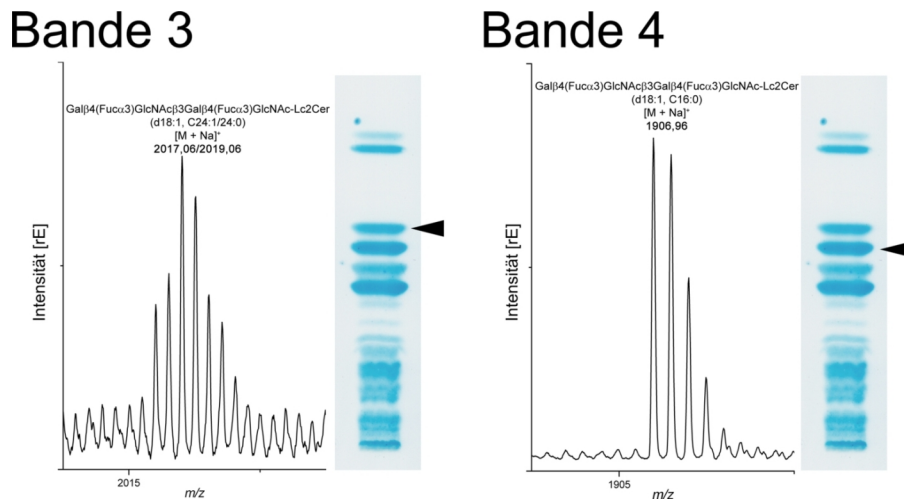


Abbildung 5.27: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von CD15-GSL: Banden 3 und 4.

Die mittels AMD aufgetrennten CD15-GSL wurden direkt von der DC-Platte desorbiert. Detektierte Molekülonen, theoretische m/z -Werte sowie Strukturvorschläge für die detektierten CD15-GSL sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

Bande 3 und 4 enthalten die gleichen Strukturen wie Bande 1 und 2, allerdings sind die Molekülonen um eine zusätzliche Fukose modifiziert, wodurch es zu einer Massenverschiebung von 146 kommt. Die interne Fukose führt zu Molekülen der Struktur $\text{Gal}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc}\beta 3\text{Gal}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 3)\text{GlcNAc-Lc2Cer}$ mit C24:0/24:1-Fettsäure bei m/z 2017,06 bzw. 2019,06 (Bande 3) und mit C16:0-Fettsäure bei m/z 1906,96 (Bande 4).

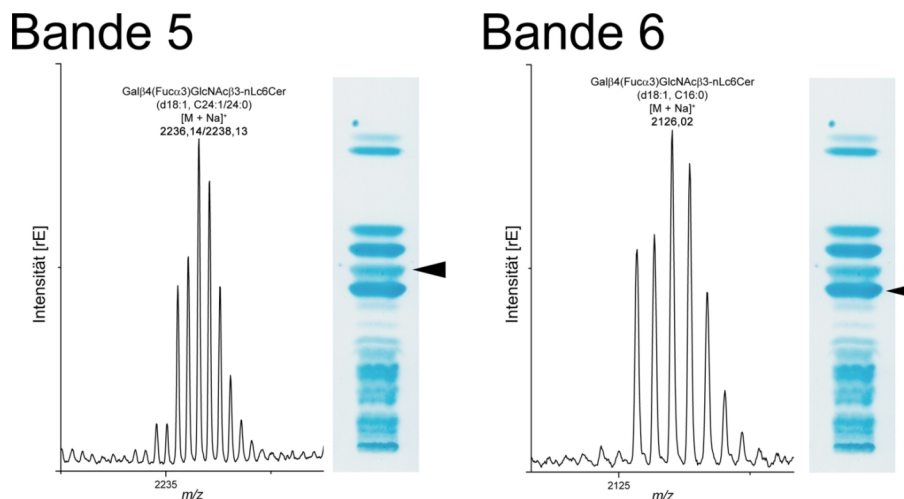


Abbildung 5.28: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von CD15-GSL: Banden 5 und 6.

Die mittels AMD aufgetrennten CD15-GSL wurden direkt von der DC-Platte desorbiert. Detektierte Molekülonen, theoretische m/z -Werte sowie Strukturvorschläge für die detektierten CD15-GSL sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

Hinter Bande 5 und 6 verbirgt sich eine ähnliche Struktur wie bei Bande 1 und 2, allerdings sind die Moleküle um eine Gal β 4GlcNAc-Disaccharideinheit verlängert, wodurch sich die m/z -Werte auf 2236,13 bzw. 2238,13 (d18:1, C24:1/C24:0) und 2126,06 (d18:1, C16:0) erhöhen.

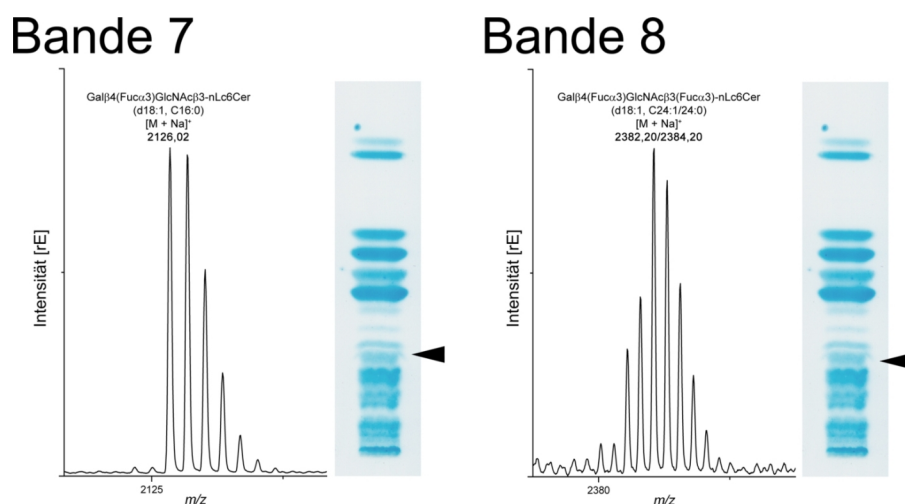


Abbildung 5.29: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von CD15-GSL: Banden 7 und 8.

Die mittels AMD aufgetrennten CD15-GSL wurden direkt von der DC-Platte desorbiert. Detektierte Molekülionen, theoretische m/z -Werte sowie Strukturvorschläge für die detektierten CD15-GSL sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

Die experimentell ermittelten Hauptkomponente scheint es sich ebenfalls um ein CD15-GSL mit nLc8Cer Grundstruktur zu handeln. Allerdings weist die Laufhöhe auf ein anderes GSL hin, welches sich aber nicht ionisieren liess bzw. in das gemessene Molekül zerfiel. In Bande 8 hingegen konnte ein GSL mit nLc8Cer-Basisstruktur, subterminaler Fukose und einer weiteren internen Fukosylierung und einer C24:1/24:0-Fettsäure bei m/z 2382,19 bzw. 2384,20 nachgewiesen werden.

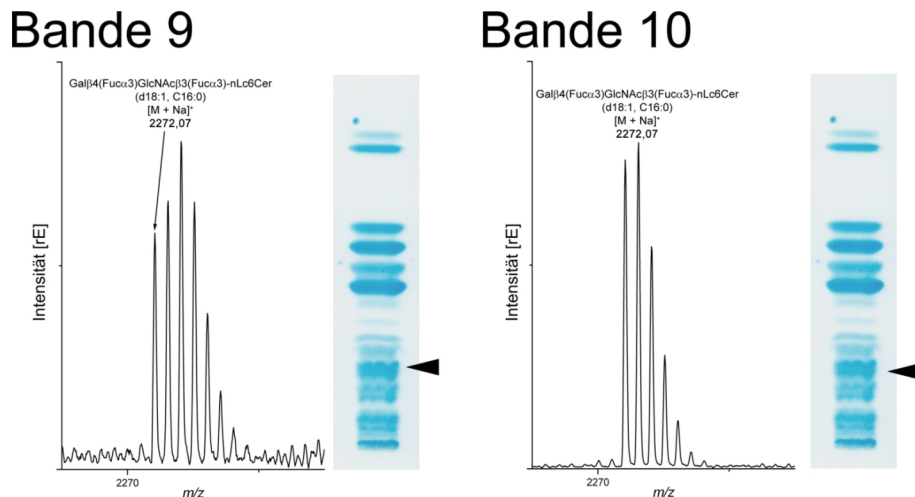


Abbildung 5.30: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von CD15-GSL: Banden 9 und 10.

Die mittels AMD aufgetrennten CD15-GSL wurden direkt von der DC-Platte desorbiert. Detektierte Molekülonen, theoretische m/z -Werte sowie Strukturvorschläge für die detektierten CD15-GSL sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

In Bande 9 und 10 konnten Molekülionen mit nLc8Cer-Grundstruktur und zwei Fukosen mit C16:0-Fettsäure bei m/z 2272,07 nachgewiesen werden. Aufgrund des Laufverhaltens sollten sich die detektierten Molekülspezies auch in ihrem m/z -Wert unterscheiden. Wiederum scheint bei der Ionisierung der beiden immundetektierten Banden bei einem ein Teil des ursprünglichen Moleküls durch Fragmentierung verloren zu gegangen zu sein.

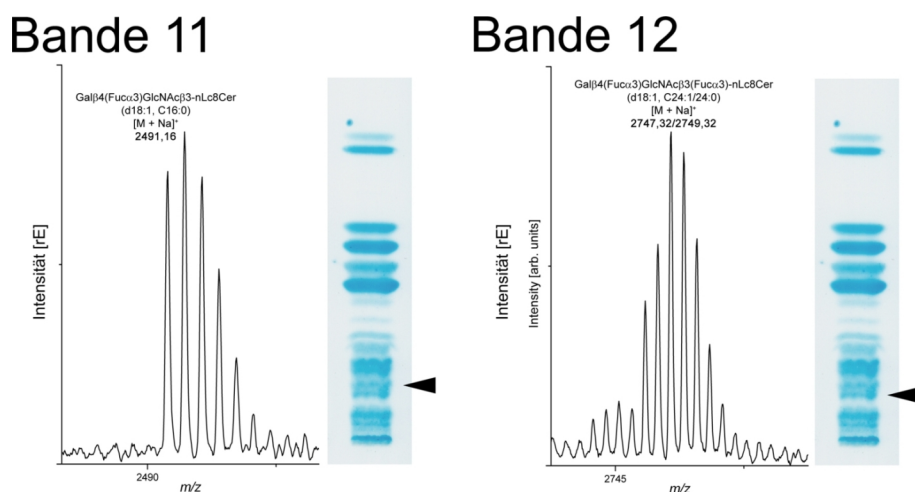


Abbildung 5.31: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von CD15-GSL: Banden 11 und 12.

Die mittels AMD aufgetrennten CD15-GSL wurden direkt von der DC-Platte desorbiert. Detektierte Molekülionen, theoretische m/z -Werte sowie Strukturvorschläge für die detektierten CD15-GSL sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

In Bande 11 konnte eine nLc10Cer mit einer subterminalen Fukose und C16:0-Fettsäure bei m/z 2491,16 nachgewiesen werden. Die gleiche Struktur allerdings mit einer weiteren internen Fukosylierung und C24:1/24:0-Fettsäure bei m/z 2747,32 bzw. 2749,32 konnte in Bande 12 detektiert werden.

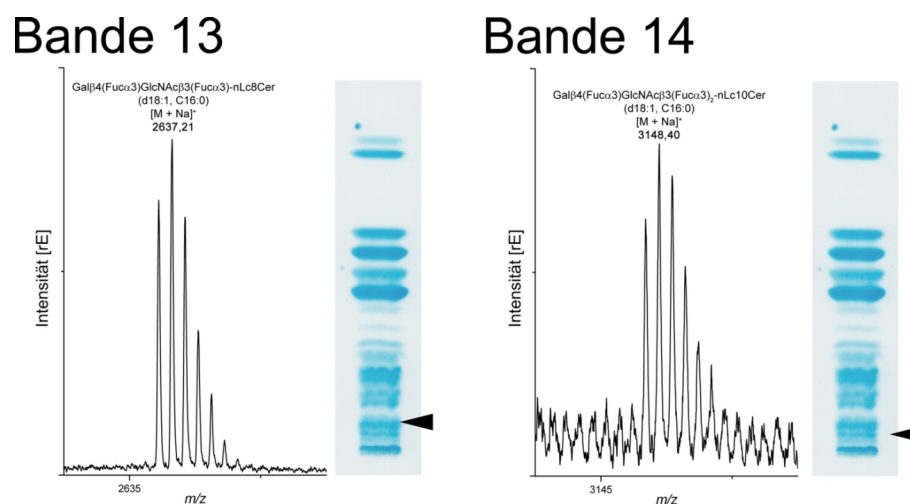


Abbildung 5.32: (+)IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von CD15-GSL: Banden 13 und 14.

Die mittels AMD aufgetrennten CD15-GSL wurden direkt von der DC-Platte desorbiert. Detektierte Moleküle, theoretische m/z -Werte sowie Strukturvorschläge für die detektierten CD15-GSL sind in Tabelle 5.13 aufgeführt.

In Bande 13 konnte als Hauptkomponente ein nLc10Cer mit zwei Fukosen und C16:0-Fettsäure bei m/z 2637,21 ermittelt werden. In Bande 14 wurden schließlich die größten Molekülspezies mit nLc12Cer-Grundstruktur, drei Fukosen und C16:0-Fettsäure bei m/z 3148,40 detektiert werden.

In nachfolgender Tabelle 5.13 sind alle detektierten Molekülspezies aufgelistet. Neben den in den Abbildungen ?? bis ?? gezeigten Hauptkomponenten wurden noch weitere Fragmentationen auch anderer Kationisierung, wie doppelt mit Natrium kationisierte Moleküle, gefunden. In Bande 9 wurden darüberhinaus auch Ionen bei m/z 2126,04 detektiert, was der Hauptkomponente entspricht, allerdings ohne die zusätzliche Fukose. Auf eine Darstellung dieser und anderer Massenspektren wurde aber verzichtet, da es sich an dieser Stelle nicht um eine Analyse des „post-source decay“ handelt, sondern um die Detektierbarkeit von mit automatisierter Mehrfachchromatographie aufgetrennten langkettigen hochpolaren CD15-GSL-Spezies.

Neben den in Tabelle 5.13 aufgelisteten Molekülspezies der detektierten CD15-GSL wurden innerhalb einer Bande zum einen Fragmente der eigentlichen Hauptstruktur und zum anderen noch weitere Ionenspezies mit unterschiedlicher Kationisierung gefunden. So wurden beispielsweise in Bande 9 mit der Hauptstruktur $\text{Le}^{\text{X}}/\text{CD15}(\text{nLc8} + \text{Fukose}; \text{d18:1}, \text{C16:0})$ mit m/z 2272,10 weitere Ionen mit m/z 2294,06, was dem gleichen Molekül entspricht, allerdings als doppelt mit Natrium kationisiertes Molekül. Weiterhin wurden weitere Ionen mit m/z 2126,04 was ebenfalls dem $\text{Le}^{\text{X}}/\text{CD15}$ -GSL mit nLc8 Grundstruktur entspricht, allerdings ohne zusätzlicher Fukose.

Tabelle 5.13: (+)IR-MALDI-o-TOF m/z -Werte von mittels AMD aufgetrennten und Akdetektierten CD15-GSL. Die mittels AMD aufgetrennten CD15-GSL wurden direkt auf der DC-Platte mit IR-MALDI-o-TOF MS im Positivionenmodus gemessen. Alle aufgeführten Ionenspezies waren einfach mit Natrium kationisiert.

Bande	m/z theoretisch	m/z experimentell	Strukturvorschlag
1	1871,04	1871,01	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc-nLc4Cer (d18:1, C24:1)
1	1873,05	1873,02	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc-nLc4Cer (d18:1, C24:0)
2	1760,93	1760,89	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc-nLc4Cer (d18:1, C16:0)
3	2017,10	2017,06	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc β 3Gal β 4(Fuca3)-nLc2Cer (d18:1, C24:1)
3	2019,11	2019,06	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc β 3Gal β 4(Fuca3)-nLc2Cer (d18:1, C24:0)
4	1906,99	1906,96	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc β 3Gal β 4(Fuca3)-nLc2Cer (d18:1, C16:0)
5	2236,17	2236,13	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc-nLc6Cer (d18:1, C24:1)
5	2238,19	2238,13	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc-nLc6Cer (d18:1, C24:0)
6, 7	2126,06	2126,04	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc-nLc6Cer (d18:1, C16:0)
8	2382,23	2382,19	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3)-nLc6Cer (d18:1, C24:1)
8	2384,24	2384,20	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3)-nLc6Cer (d18:1, C24:0)
9, 10	2272,12	2272,07	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3)-nLc6Cer (d18:1, C16:0)
10	2300,15	2300,09	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3)-nLc6Cer (d18:1, C18:0)
11	2491,18	2491,16	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc-nLc8Cer (d18:1, C16:0)
12	2747,36	2747,32	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3)-nLc8Cer (d18:1, C24:1)
12	2749,38	2749,32	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3)-nLc8Cer (d18:1, C24:0)
13	2637,25	2637,21	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3)-nLc8Cer (d18:1, C16:0)
14	3002,38	3002,35	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc-nLc10Cer (d18:1, C16:0)
14	3148,44	3148,40	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3)-nLc10Cer (d18:1, C16:0)
14	3294,50	3294,47	Gal β 4(Fuca3)GlcNAc(Fuca3) ₂ -nLc10Cer (d18:1, C16:0)

6 Diskussion

6.1 Tumorassoziierte GSL: Zielstrukturen für Adjuvanttherapien

Viscumin wurde lange Zeit für ein Galaktose-spezifisches Lektin gehalten [Hajtó u. a. (1989), Bantel u. a. (1999), Hajtó u. a. (2003a), Hajtó u. a. (2003b)]. Allerdings konnten Müthing u. a. im Jahr 2002 zeigen, dass Viscumin preferentiell an α 2-6 sialylierte GSL der Neolaktoserie bindet [Müthing u. a. (2002)]. Sowohl das Lektin Viscumin als auch das rekombinante Pendant rViscumin binden mit hoher Spezifität an Ganglioside mit CD75s-Epitop (Neu5Ac α 2-3Gal β 4GlcNAc-R) [Müthing u. a. (2004)]. Die Erstbeschreibung dieser Struktur geht auf Wiegandt aus dem Jahre 1973 zurück.

Um als mögliches Therapeutikum in Betracht zu kommen, muss der Rezeptor CD75s auf Tumorzellen stärker exprimiert sein als in gesundem Vergleichsgewebe. Es muss also eine Tumorassoziation vorliegen. Dabei ist aber stets zu beachten, dass tumorspezifische GSL nicht existieren, sondern kleinste Mengen des GSLs auch auf anderen Zellen oder in anderen Geweben vorhanden sein können. Allerdings scheint die Organisation der GSL innerhalb der Zellmembran eine Rolle zu spielen, weshalb gegen tumorassoziierte GSL gerichtete Antikörper spezifisch mit den Tumorzellen und nicht den gesunden Zellen reagieren [Hakomori (1998)].

Nach Bindung des Viscumins an eine Zelle, können je nach Zelltyp verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Monozyten beispielsweise reagieren auf das Viscumin mit einer erhöhten Sekretion des Tumor Nekrose Faktor- α , Interleukin-I und Interleukin 6 [Hajtó u. a. (1990)]. Weiterin wurde berichtet, dass Viscumin in niedrigen Konzentrationen für eine Aktivierung von humanen neutrophilen Granulozyten sorgt, also einen immunstimulatorischen Effekt hat [Savoie u. a. (2000)]. Eine Erhöhung der Lymphozytenkonzentration, vor allem bei T- und T-Helfer-Zellen sowie NK (Natürlich Killerzellen), konnte ebenfalls beobachtet werden [Beuth u. a. (1992)]. In höheren Konzentrationen führt das Lektin aber auch bei diesen Zellen zur Apoptose. Lektine oder Toxine würden sich somit bei einer vorhandenen Tumorassoziation von GSL im Rahmen einer adjuvanten Tumorthherapie nutzen lassen. Aber auch diverse monoklonale Antikörper, die GSL als Targetstruktur haben, werden in der Tumorthherapie verwendet. Der gegen das Gangliosid GD2 gerichtete Antikörper 14G2a induziert bei Neuroblastomzellen die Apoptose und erhöht die Toxizität von Chemotherapeutika [Kowalczyk u. a. (2009)]. Auch für den Antikörper 14F7, der ebenfalls gegen GD2

gerichtet ist, wurde ein apoptotischer Effekt aufgrund des durch den AK verursachten Verlusts der Membranintegrität nachgewiesen [Roque-Navarro u. a. (2008)]. Der monoklonale AK 5F5 ist gegen das Disialosylglobopentaosylceramid, das als tumorassoziiert bei renalen Zellkarzinomen beschrieben wurde, gerichtet [Ito u. a. (2001)]. Neben der Apoptose-induzierenden Wirkung können Anti-GSL-Antikörper aber auch als Katalysatoren für Chemotherapeutika wirken, indem sie die Toxizität des Chemotherapeutikums verstärken, wie es für den monoklonalen Antikörper 14G2a berichtet wurde [Kowalczyk u. a. (2009)]. Eine weitere Möglichkeit, tumorassoziierte GSL im Bereich der Immuntherapie zu nutzen, ist eine Impfung mit GSL, wodurch das Immunsystem selbstständig Antikörper gegen einen Tumor, der dieses entsprechende tumorassoziierte GSL exprimiert, produzieren könnte [Ragupathi (1996)]. Jedoch muss bedacht werden, dass auch tumorassoziierte GSL natürlich vorkommende GSL sind und somit auch bei erhöhtem Auftreten so gut wie keine Immunantwort auslösen. Um eine Immunantwort zu erzielen, muss oft auf künstliche Antigene zurückgegriffen werden, die das tumorassoziierte GSL imitieren und eine Reaktion des Immunsystems auslösen [Slovin u. a. (2005), Krug u. a. (2004)]. Eine andere Möglichkeit wäre das Einbringen von spezifischen Epitopen in die Krebszelle, die dann wiederum eine Immunantwort auslösen. So wurde berichtet, dass Tumorzellen mit einem spezifischen Epitop über den Vektor eines Adenovirus transfiziert werden können und die Expression des Epitops dann schließlich zur Immunantwort führt [Galili (2005)].

6.1.1 Expressionsanalyse von CD75s, iso-CD75s und nLc4Cer in humanen Nierenkarzinomen

Die Analyse der 20 Nierenkarzinomgewebeproben auf CD75s-Ganglioside ergab, dass in 30% der Fälle ($n = 6$) eine schwache bis starke Erhöhung des Gangliosids CD75s-1 im Tumorgewebe gegenüber gesundem Vergleichsgewebe vorlag. Die restlichen 70% zeigten so gut wie keine Expression des Gangliosids im Normal- oder Tumorgewebe. Dass sich die Expression von CD75s-1-Gangliosiden signifikant unterscheidet, konnte mittels Vorzeichentest bestätigt werden ($P = 0,025$). Auch wenn der prozentuale Anteil der Gewebeproben, die eine Überexpression des CD75s-1-Gangliosids zeigen mit 30% gering erscheint, so macht die ausschließliche Präsenz des CD75s-1-Gangliosids auf Tumorzellen die CD75s-1-Struktur zu einem tumorassoziierten GSL.

Die isomere Struktur des ML-I-Rezeptors iso-CD75s wurde ebenfalls auf seine Expression in den 20 Nierenkarzinomgeweben untersucht. Es konnte in 25% der Fälle ($n = 5$) eine moderate Überexpression des iso-CD75s-1-Gangliosids in den Tumorgeweben gegenüber den Normalgeweben verzeichnet werden. Bei allen anderen Proben wurde eine gleiche bzw.

sogar verminderte Expression detektiert. Dennoch zeigte sich nach statistischer Analyse mittels Vorzeichentest, dass die Expression des iso-CD75s-1-Gangliosides hoch signifikant verschieden ist ($P = 0,000$).

Auch die gemeinsame Vorläuferstruktur nLc4Cer der isomeren Strukturen CD75s-1 und iso-CD75s-1 wurde auf seine Expression hin untersucht, um einen möglichen Zusammenhang aufzudecken. Dabei wurde in 50% der Fälle ($n = 10$) eine moderate bis stark erhöhte Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Normalgewebe nachgewiesen. Die statistische Analyse mittels Vorzeichentest ergab allerdings keinen signifikanten Zusammenhang bei Vergleich der Expressionen in Tumor- und Normalgeweben. Allerdings konnte mittels Korrelationstest nach Kendall ein signifikanter Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von nLc4Cer und CD75s-1 im Tumorgewebe festgestellt werden ($P = 0,05$, $\tau = 0,469$). Dieser Zusammenhang lässt sich beim Vergleich der Expression von nLc4Cer und iso-CD75s-1 nicht finden. Somit scheint eine Erhöhung der Expression von CD75s-1-Gangliosiden durch eine erhöhte Expression der Vorläuferstruktur nLc4Cer bedingt zu sein.

Die erhöhte Expression von CD75s-1- und auch iso-CD75s-1-Gangliosiden könnte daher mit einer erhöhten Expression der spezifischen Sialyltransferasen, die für den Transfer von Neu5Ac auf Glykoproteine und GSL in $\alpha 2-6$ - oder $\alpha 2-3$ -Konfiguration verantwortlich sein, einhergehen. Dieser molekularbiologische Ansatz wurde bereits in zahlreichen Studien von Dall'Olio u. a. durchgeführt. Zwischen dem mRNA-Level der Sialyltransferasen, ihrer Enzymaktivität auf Proteinebene und dem tatsächlichen Gehalt an Sialylglykokonjugaten konnte allerdings kein quantitativer Zusammenhang gefunden werden [Dall'Olio (2000), Dall'Olio u. Chiricolo (2001), Dall'Olio u. a. (2004)]. Eine Regulation der sialylierten Oligosaccharide auf Proteom- oder Metabolomebene ist daher wahrscheinlicher. In Vorarbeiten [Diplomarbeit Marcel Hülsewig (2005)] konnte im Falle von Nierenkarzinomen ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Expression der β -Galaktosid $\alpha 2-6$ -Sialyltransferase-I (ST6Gal-I), die die terminale Sialylierung von Gal $\beta 1-4$ GlcNAc-R des CD75s-Epitopes bei GSL und Glykoproteinen katalysiert [Dall'Olio (2000)], gefunden werden. Eine Aussage über die tatsächliche Expression des ML-I-Rezeptors CD75s und ob einem Nierenkarzinompatienten zu einer Therapie mit ML-I bzw. rViscumin geraten werden kann, kann mittels RT-PCR (engl. *Reversed Transcription Polymerase Chain Reaction*, Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) nicht getroffen werden.

Die drei GSL CD75s-1, iso-CD75s-1 und nLc4Cer sollten weiterhin massenspektrometrisch charakterisiert werden. Mittlerweile sind mehrerer Möglichkeiten bekannt, die Massenspektrometrie mit der Dünnschichtchromatographie zu koppeln. Zu Beginn wurden für die

Kopplung der DC mit MALDI MS UV-Laser eingesetzt, was aber aufgrund der geringen Ablation des UV-Lasers von der unregelmäßigen Oberfläche der Kieselgelschicht zu der Notwendigkeit führte, die GSL aus dem Kieselgel der DC-Platte auf eine Membran zu blotten [Guittard u. a. (1999)]. Die Unregelmäßigkeiten der Kieselgelbeschichtung führten weiterhin bei Gebrauch eines axial angebrachten Massenanalysators, wie z.B. einem a-TOF, zu einer schlechten Auflösung, die auch mittels „delayed extraction“ nicht kompensiert werden konnte. Um dies zu umgehen, musste die Massenanalyse vom Ionisierungsprozeß entkoppelt werden. Eine Variante stellt die Fouriertransform-Ionencyclotronresonanz (FT-ICR) Massenspektrometrie dar [Ivleva u. a. (2004)]. Dabei erzeugt ein supraleitender Magnet ein homogenes elektrisches Feld, in dem die Ionen gefangen werden. Der hohe Platzbedarf des Geräts und die hohen Unterhaltskosten machen diese Möglichkeit der Entkopplung des Ionisierungsprozesses von der Massenanalyse für viele Arbeitsgruppen allerdings unerschwinglich. Eine einfachere und kostengünstigere Variante ist die Benutzung eines o-TOF Massenspektrometers, bei dem das Flugrohr in orthogonaler Richtung angebracht ist [Loboda u. a. (2003)].

Bei der Kopplung der DC mit der ESI MS traten ebenfalls einige Probleme auf. Bei der indirekten Kopplung mussten die GSL erst aus dem Kieselgel extrahiert werden, was zum einen recht zeitaufwendig ist und eventuell mit Materialverlust einhergeht [Meisen u.a. (2004, 2005) , , Nakamura u. a. (2006)]. Des Weiteren wurden aber Versuche unternommen, die DC direkt mit der ESI MS zu koppeln. So existiert die Möglichkeit der „Desorptions Elektrospray Ionisation“ (DESI), wie sie von der Arbeitsgruppe Cook erstmalig 2004 beschrieben wurde [Takáts u. a. (2004)]. Außerdem wurde im Jahre 2004 von Luftmann u.a. ein Interface beschrieben, mit dem es möglich ist, die GSL aus der Platte zu extrahieren und durch direkte Kopplung an ein HPLC-fähiges Massenspektrometer zu charakterisieren [Luftmann (2004)].

Allerdings besteht neben der von Luftmann u.a. beschriebenen direkten Kopplung der DC mit ESI MS auch die Möglichkeit die DC direkt mit der MALDI MS zu koppeln. Dabei werden die GSL direkt auf der DC-Platte mittels eines IR-Lasers ionisiert [Dreisewerd u. a. (2005), Rohlfig u. a. (2007), Distler u. a. (2008a)]. Die direkte Kopplung umgeht die zeitaufwendige Aufarbeitung und den Probenverlust der indirekten Kopplung. Lediglich das Fixativ muss vor der massenspektrometrischen Analyse durch einfaches Eintauchen der Platte in Chloroform entfernt werden. Der IR-Laser hat gegenüber dem UV-Laser eine sehr viel höhere Eindringtiefe, weshalb mehr GSL zur gleichen Zeit ionisiert werden können. Ebenso hat die unebene Kieselgelschicht keinen Einfluss auf den Ionisierungsprozess bzw. auf die Massenauflösung aus. Der Gebrauch eines o-TOFs erhöht zudem die Massenauflösung und Empfindlichkeit. Somit konnten der Viscumin-Rezeptor CD75s, seine

isomere Struktur iso-CD75s und die gemeinsame Vorläuferstruktur nLc4Cer in Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben durch die Kopplung der DC-Immundetektion mit IR-MALDI-o-TOF MS eindeutig charakterisiert werden.

Es muss allerdings bedacht werden, dass Tumorgewebe durch Makrophagen und Monozyten infiltriert sein können. Es ist bekannt, dass diese ebenfalls, wenn auch nur in geringen Mengen, CD75s exprimieren und somit zu einer Veränderung des GSL-Musters beitragen können [Macher u. a. (1982), Ecsedy u. a. (1998)]. Andere Experimente mit monozytären Zelllinien und Lymphozyten zeigten ebenfalls eine Reaktion dieser Immunzellen auf das ML-I [Hajtó u. a. (1990), Beuth u. a. (1992)], wodurch bestätigt wurde, dass Mono- und Lymphozyten den ML-I-Rezeptor tragen. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit mittels Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft werden, ob die detektierten GSL aus eingewanderten Leukozyten und/oder Monozyten stammen könnten. Die Patientenprobe 15, stellvertretend für alle anderen untersuchten CD75s-positiven Proben, zeigte nur eine geringe Anzahl von Immunzellen im Tumor- und auch im Normalgewebe. Darüberhinaus konnte im Tumorgewebe eine hohe Expression von CD75s-Gangliosiden nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen der GSL-Expressionsanalyse übereinstimmt. Der Viscuminrezeptor CD75s ist somit im Fall von Nierenkarzinomen ohne Zweifel ein tumorassoziiertes Gangliosid.

Aber nicht nur in Nierenkarzinomen gilt das CD75s-Epitop als tumorassoziiert. Bereits in den frühen 1980ern wurden Karzinome diversen Ursprungs auf ihre CD75s-Expression untersucht [Nilsson u. a. (1985)]. Dabei zeigten vor allem kolorektale und Lungenkarzinome eine erhöhte Expression an CD75s im Vergleich zu gesundem Gewebe. Weitere Stichproben von Tumoren der Leber, des Kolons, des Magens und des Pankreas ergaben ebenfalls eine Überexpression des Viscuminrezeptors, wobei das Pankreaskarzinom die stärkste Überexpression zeigte [Müthing u. a. (2005)]. Distler u. a. konnten vor kurzem anhand von 38 Pankreaskarzinomproben und korrespondierenden gesunden Vergleichsgeweben eine Überexpression von CD75s-1-Gangliosiden in 42% der Tumoren nachweisen. Auch das isomere iso-CD75s-1-Gangliosid stellte sich mit 66% Überexpression als tumorassoziiert heraus. Diese Überexpression korrelierte zudem signifikant mit der malignen Transformation [Distler u. a. (2008b)]. Somit scheint sich das CD75s-Epitop als ein typisches Merkmal für Tumoren herauszustellen und legt eine Adjuvanttherapie mit Viscumin für viele Krebsarten nahe.

Die Expressionsanalyse der CD75s-1-Ganglioside hat also gezeigt, dass für diesen GSL-Typ eine Tumorassoziation vorliegt und sich somit ML-I bzw. rViscumin im Rahmen einer Individualtherapie von Nierenkarzinomen anbieten. Klinische Phase-I Studien haben er-

geben, dass Patienten, die mit ML-I bzw. rViscumin behandelt wurden, bis auf wenige Ausnahmen, kaum Anzeichen von Beschwerden hatten und insgesamt von der Therapie profitierten [Schöffski u. a. (2004), Gardin (2009)]. Die gute Verträglichkeit spricht demnach ebenfalls für den Einsatz von ML-I und rViscumin als Tumoradjuvant.

Der ML-I-Rezeptor CD75s könnte weiterhin als Merkmal für eine Prognose für den Patienten eingesetzt werden. Mittels statistischer Analyse wurde festgestellt, dass schlecht- bzw. undifferenzierte Tumoren einen signifikanten Unterschied zu mäßig und gut differenzierten Tumoren bezüglich ihrer CD75s-Expression zeigten ($P = 0,033$). Wenn ein Tumor eine schlechte Differenzierung aufweist, so ergibt das meist auch für den Patienten eine ungünstige Prognose. Durch *in vivo*-Experimente konnte der Einfluss von α 2-6-sialylierten Glykokonjugaten auf die Tumordifferenzierung nachgewiesen werden, die zudem mit einem schlechten Phänotypen korrelierten [Hedlund u. a. (2008)]. Weiterhin scheint die Fähigkeit zur Metastasierung über das Lymphsystem oder die Blutbahn durch Expression von sialylierten Antigenen der Tumoren gegeben zu sein [Ichikawa u. a. (2000)]. Dadurch ist es auch möglich, dass es durch verbleibende Tumorzellen nach Resektion und Folgetherapien zu Rückfällen kommen kann. Ob auch der ML-I-Rezeptor zu dieser Kategorie von sialylierten Antigenen gerechnet werden kann, sollte in weiterführenden Arbeiten geklärt werden.

6.1.2 Expressionsanalyse von Gb3Cer und Gb4Cer in humanen Nierenkarzinomen

Die Arbeiten von Distler u.a. aus dem Jahre 2009 beweisen, dass es sich bei dem Shiga Toxin-Rezeptor Gb3Cer im Fall von Kolon- und Pankreaskarzinomen um ein tumorassoziiertes GSL handelt. Dies traf in 81,3% der untersuchten Kolon- und 60,9% der Pankreastumoren zu. Auch die Daten von Falguières u.a. aus dem Jahre 2008 ergaben, dass Gb3Cer bei Kolorektalkarzinomen und Lebermetastasen eine hochsignifikante Überexpression zeigte. Ob Gb3Cer bei Nierenkarzinomen als tumorassoziierte Struktur angesehen werden kann, soll an dieser Stelle diskutiert werden.

In dem Fall, dass Gb3Cer eine tumorassoziierte Struktur darstellt, könnte zumindest in Erwägung gezogen werden, eine adjuvante Therapie mit Stx durchzuführen. Ebenfalls könnte die an Gb3Cer bindende B-Untereinheit oder Derivate derselbigen als Transportvehikel genutzt werden, um Gb3Cer-exprimierende Strukturen im Körper zu lokalisieren [Falguières u. a. (2008)]. Die hohe Bindespezifität an ihren zellulären Rezeptor, das Überwinden von physiologischen Barrieren und die hohe Resistenz gegenüber dem intra- und extrazellulären Abbau, machen die B-Untereinheit des Stx zu einem vielversprechenden „*Tumor-Targeting*“-Vektor [Johannes u. Decaudin (2005), Janssen u. a. (2006)].

Bei Stx1 handelt es sich um ein AB₅-Toxin mit rRNA-N-Glykosidaseaktivität, vergleichbar

mit der des Viscumins [Stirpe u. Battelli (2006)]. Das Toxin bindet an *lipid-raft* assoziierte GSL, wird über Endozytose aufgenommen und retrograd zum Golgi-Netzwerk und ER transportiert. Nach Spaltung der A-Untereinheit erfolgt die Translokation des enzymatisch aktiven A₁-Fragments ins Zytosol, wo es durch Inaktivierung der Ribosomen die Proteinbiosynthese hemmt, was schließlich zur Apoptose führt [Schweppe u. a. (2008)]. Stx wird neben *Shigella dysenteriae* auch von enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) produziert. Eine Infektion mit EHEC, bspw. über die Nahrung, kann zu Diarröh, blutiger Diarröh und im schlimmsten Fall zum Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS) führen [Müthing u. a. (2009)]. Trotz der bekannten zellschädigenden Wirkung von Stx gegenüber renaler und zerebraler Endothelzellen könnte eine systemische Applikation, die wahrscheinlich mit einigen Risiken behaftet ist, möglich sein [Distler u. a. (2009)].

Die Analysen der Gb3Cer-Expression in 20 Nierenkarzinomen und korrespondierenden gesunden Vergleichsgeweben ergaben, dass der Stx-Rezeptor im Tumorgewebe im Vergleich zu den Kontrollgeweben um 75% reduziert ist. Auch das Elongationsprodukt Gb4Cer, der „*low-affinity*“-Ligand des Stx, liegt sogar in 85% der Fälle in verminderter Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum korrespondierenden Vergleichsgewebe vor. Die Expressionsanalyse von Gb3Cer mit Stx-vermittelter Immundetektion ergab eine Reduzierung des GSL im Tumorgewebe.

Zusätzlich wurden massenspektrometrische Untersuchungen zum strukturellen Nachweis von Stx-Rezeptoren vorgenommen. Im Fall von Gb3Cer, bei dem es sich um das Haupt-GSL der Niere handelt und das in hoher Konzentration vorkommt, wurde die nach Meisen u.a. im Jahre 2005 etablierte Methode mit nanoESI Q-TOF MS eingesetzt. Nach Entfernung des Plexigum-Fixativs wurden die mit dem polyklonalen Huhn Anti-Gb3Cer-Antikörper immungefärbten Banden von der DC-Platte abgekratzt, die GSL extrahiert und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Gb3Cer konnte mittels MS1- und MS2-Experimenten eindeutig mit d18:1-Sphingosin und variierenden Kettenlängen der Fettsäure zwischen C16:0 und C24:0/24:1 identifiziert werden. Es ist beschrieben worden, dass die Länge der Fettsäuren bzw. ihre Beschaffenheit einen Einfluss auf das Bindungsverhalten von Stx hat. Gb3Cer-Spezies mit extrem kurz-kettigen Fettsäuren (C12 und C14) weisen eine geringere Affinität gegenüber Stx auf, während C16- bis C24-Fettsäuren zu einer starken Bindung führen [Kiarash u. a. (1994)]. Weiterhin spielen ungesättigte Fettsäuren auch eine Rolle bei der Affinität des Rezeptors zum Stx. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren führen zu einer erhöhten Bindungsstärke. Auf den intrazellulären retrograden Transport des Stx hat die Länge der Fettsäuren ebenfalls einen Einfluss [Sandvig u. a. (1994)].

Auf eine Fettsäureanalyse der Gb3Cer-Spezies ist im Fall von Nierenkarzinomen und gesunden Vergleichsgeweben allerdings bisher verzichtet worden, nachdem sich der Stx-Rezeptor

als nicht-tumorassoziiert herausstellte. Allerdings wiesen manche Normalgewebeproben eine dritte Bande unterhalb der typischen C16- und C24-Fettsäurebanden auf, in der sich häufig hydroxylierte Fettsäurespezies befinden, wie dies bspw. für Pankreaskarzinome gezeigt wurde [Distler u. a. (2009)].

6.1.3 CD75s-Expressionsanalyse in Pankreaskarzinomzelllinien

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Viscumin und sein rekombinant hergestelltes Pendant rViscumin im Zellkultur- und Tiermodell einen Anti-Tumor Effekt aufwies. Bei Injektion des Lektins direkt in den Tumor konnte bei einem Xenograftmodell gezeigt werden, dass Viscumin im Vergleich zu anderen Tumoradjuvantien den höchsten Anti-Tumor Effekt hatte [Rostock u. a. (2005)]. Dabei wurde dieser Effekt vor Transplantation der Tumorzellen durch Inhibierung des Tumorwachstums, als auch bei direkter Injektion in den Tumor beobachtet. Auch bei einem anderen Nacktmausmodell konnte eine Reduzierung des Tumorwachstums und verringerte Metastasierung festgestellt werden [Thies u. a. (2008)]. Dabei wurden Karzinomzellen der humanen Melanomzelllinie MV3 in immundefiziente Nacktmäuse injiziert und diese gleichzeitig mit Viscumin behandelt. Bei den mit dem Lektin behandelten Mäusen wurde eine Größenabnahme der Primärtumoren und eine Verringerung der Lungenmetastasen festgestellt. Weiterhin wurde eine erhöhte Anzahl an Tumor-infiltrierenden dendritischen Zellen nachgewiesen, was darüber hinaus auch ein Nachweis für den immunmodulatorischen Effekt des Lektins ist. In einem weiteren Modell konnte der Anti-Tumor-Effekt für das rekombinante Viscumin belegt werden. Dabei wurde bei Ratten chemisch Blasenkarzinome ausgelöst und diese mit rViscumin behandelt. Wie sich nach Analyse der Tumoren herausstellte, zeigten die behandelten Tiere eine Verminderung der Karzinogenese bei Blasenkarzinomen [Elsässer-Beile u. a. (2000)]. Bei Ehrlich-Tumorzellen, die in Mäuse transplantiert wurden, konnte der zytotoxische Effekt des Viscumins ebenfalls beobachtet werden [Cebović u. a. (2008)]. Allerdings wurde bei dieser Studie die Hypothese aufgestellt, dass die Wirkung auf Induktion von oxidativem Stress zurückzuführen ist.

Bei verschiedenen Zelllinien konnte der zytotoxische Effekt des Viscumins nachgewiesen werden. Durch diese Studien konnte bestätigt werden, dass Viscumin sowohl eine Apoptose-induzierenden Effekt auf Tumorzellen als auch eine immunmodulatorische Wirkung andererseits hat. Bei Tumorzellen wiesen erste Beobachtungen auf Schädigungen der Zellmembran hin. Aber auch eine potentierende Wirkung von TNF- α auf Tumorzellen durch das Lektin wurde beobachtet [Pryme u. a. (2006)]. So konnte gezeigt werden, dass Viscumin durch Caspase-Induktion das Zytoskelet in der Leukämiezelllinie PLB-985

zerstört [Lavastre u. a. (2007)]. Die immunmodulatorische Wirkung auf Zellen des Immunsystems wurde für humane dendritische Zellen gezeigt, wobei das Viscumin die Reifung und Aktivierung der dendritischen Zellen stimuliert. Auch die erhöhte Ausschüttung von Interleukinen und TNF- α wurde durch diese Experimente bestätigt [Elluru u. a. (2008)]. Zudem konnte der zytotoxische Effekt des Viscumins auf „*Multidrug*“-resistente humane Kolonkarzinomzelllinien beobachtet werden [Valentiner u. a. (2002)]. Die Konzentration des eingesetzten Lektins spielt allerdings eine entscheidende Rolle. Erste zytotoxische Effekte konnten bereits im Picogrammereich für die humane Erythroleukämiezelllinie K562 und für die murine Thymomzelllinie EL-4 nachgewiesen werden [Urech u. a. (1995), Janssen u. a. (1993)]. Bei einer Inkubation über 24 h mit $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ Viscumin stellten sich ebenfalls ein zytostatischer und auch zytotoxischer Effekt ein [Hajtó u. a. (1990)]. Die Studie ergab weiterhin, dass kürzere Inkubationszeiten nur mit einer Anhebung der Konzentration des Lektins kompensiert werden können, um die gleichen Ergebnisse zu erzielen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Viscumin das Wachstum von verschiedenen Zelllinien *in vitro* hemmt, was auf die Induktion der Apoptose zurückzuführen ist [Janssen u. a. (1993), Büssing u. a. (1996)]. Bei humanen Zelllinien lymphozytären Ursprungs konnte nach Inkubation für 24 h bei Konzentration von 1 ng bis $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ eine dosisabhängige Induktion der Apoptose durch Viscumin beobachtet werden [Hostanska u. a. (1996)]. In dieser Studie zeigten monozytische Leukämiezellen und Thymozyten ab einer Konzentration von $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ apoptotische Merkmale. Eine Inkubation über 24 h mit $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Lektin führten letztendlich zur Nekrose der Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden sieben Pankreaskarzinomzelllinien bezüglich ihrer Reaktion auf Viscumin bzw. sein rekombinant hergestelltes Pendant rViscumin untersucht. Dazu wurde der Proliferationsassay mit WST-1-Reagenz verwendet. Es wurden Verdünnungsreihen in den Grenzen von $0,01 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bis $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ angelegt, um zu bestimmen, bei welcher Konzentration die zytotoxische Wirkung der Lektine auf die Pankreaskarzinomzellen eintritt. Weiterhin konnten die LD_{50} -Werte für jede Zelllinie ermittelt werden. Vier der Pankreaskarzinomzelllinien stammten aus Primärtumoren des Pankreas, zwei aus Metastasen der Leber und eine aus einer Aszitesmetastase jeweils unterschiedlicher Graduierung. Als erstes ließ sich feststellen, dass alle Zelllinien auf das Viscumin bzw. rViscumin mit einem Abfall der Viabilität reagierten. Die Primörtumorzelllinie Capan-2 reagiert bereits bei einer Viscuminkonzentration von $0,001 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, während die anderen Zelllinien bei dieser geringen Konzentration noch keinerlei Reaktion zeigten. Ab $0,1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ wirkten die Lektine dann auch toxisch auf die Primärtumorzelllinie Pa-Tu-8902 und die einer Metastase entstammender Zelllinie Pa-Tu-8988T. Ausser HPAF-II (Aszitesmetastase) und Panc-1 (Primärtumor) zeigten ab einer Lektinkonzentration von $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ alle

anderen Zelllinien einen Abfall der Viabilität auf einen Wert unter 40%. Bei der höchsten Konzentration von $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ zeigte sich dann aber bei allen Zelllinien die zytotoxische Wirkung des Viscumins. Obwohl Capan-2 ab einer Konzentration von $0,001 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf das Viscumin reagiert, liegt der LD_{50} -Wert der Zelllinie mit $0,7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ höher als jener der Zelllinien Pa-Tu-8902 und Pa-Tu-8988T mit $0,3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Eine weitere Zelllinie, die einen geringeren LD_{50} -Wert als Capan-2 aufweist, ist die Primärtumorzelllinie MIA PaCa-2 mit einem Wert von $0,4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Für die drei übrigen Zelllinien konnten LD_{50} -Werte von $3,9 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ für Pa-Tu-8988S, $4,6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ für Panc-1 und $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ für HPAF-II ermittelt werden. Es konnte zwar kein Zusammenhang der LD_{50} -Werte und dem Ursprung der Zelllinien beobachtet werden, allerdings konnte bei Pankreaskarzinomzelllinien mit schlechtem (Pa-Tu-8902, MIA PaCa-2) und undifferenziertem (MIA PaCa-2) Differenzierungsgrad einen geringeren LD_{50} -Wert nachgewiesen werden.

Bei der Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinien mit rViscumin konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Auch hier reagierten Pa-Tu-8902 und Pa-Tu-8988T reagieren am empfindlichsten auf den zytotoxischen Effekt des rViscumins bei einer Lektinkonzentration von $0,1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Bei einer um eine Zehnerpotenz erhöhten Konzentration wiesen diese beiden Zelllinien dann nur noch eine Viabilität von ca. 20% auf. Aber auch Capan-2, MIA PaCa-2, Pa-Tu-8988S reagieren ab einer Konzentration von $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ sehr stark auf das zytotoxische Lektin mit einem Abfall der Viabilität. Bei noch höheren Konzentrationen zeigten schließlich alle sieben Zelllinien eine minimale Überlebensrate mit einer verbleibenden Viabilität von unter 20%. HPAF-II erwies sich in diesem Kontext als „Schlusslicht“. Erst ab $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ zeigte sich die Zelllinie sensitiv gegenüber rViscumin. Bei der höchsten Lektinkonzentration von $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ergab sich immer noch eine Viabilität von knapp 40%.

Zusammenfassen lässt sich festhalten, dass alle Zelllinien einen zytotoxischen Effekt durch Viscumin bzw. rViscumin erfahren, auch wenn dieser unterschiedlich ausfällt.

Der Viscuminrezeptor CD75s wurde anschließend mittels Lektin-vermittelter Immunfluoreszenz auf zellulärer Ebene nachgewiesen. Bei allen sieben Pankreaskarzinomzelllinien konnte die Bindung von Viscumin bzw. r-Viscumin an die Zielzellen gezeigt werden. Allerdings gibt es einen deutlichen Unterschied zwischen den Zelllinien. Während bei Capan-2 scheinbar fast alle Zellen CD75s exprimieren, lassen sich bei Panc-1 nur vereinzelte, dafür aber sehr deutlich gefärbte Zellen finden, die den Rezeptor besitzen. HPAF-II zeigt eine Expression von CD75s vor allem im dichtgepackten Zellverbund, während Pa-Tu-8988T eine hohe Expression auch im lockeren Zellverbund aufweist.

Die Ergebnisse aus den Proliferationsassays und der Immunfluoreszenz belegen eindeutig, dass die sieben untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien den CD75s-Rezeptor exprimieren,

wenn auch unterschiedlich stark. Gegenstand von weiteren Arbeiten wäre es nun, das Glykolipidom der einzelnen Zelllinien zu analysieren, um Aussagen bezüglich einer Korrelation der Zytotoxizität von Viscumin und der Expression von CD75s-Strukturen machen zu können. Des Weiteren stehen die Zelllinien nun für Nacktmausmodelle zur Diskussion, um die Zytotoxizität der Lektine Viscumin und rViscumin auf Pankreaskarzinome *in vivo* zu überprüfen.

6.2 Automatisierte Mehrfachchromatographie von langkettigen GSL-Spezies

Lewis-Strukturen werden in der Literatur oft in Zusammenhang mit Tumoren und Metastasierung genannt. So wurde bei Kolorektalkarzinomen eine erhöhte Expression der sialyl-Lewis^X-Struktur (Neu5Ac α 2-3Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc-R), die auf Glykoproteinen und GSL in vielen Varianten existiert, auf Tumoren nachgewiesen sowie eine erhöhte Expression der isomeren Struktur sialyl-Lewis^a mit einer schlechten Prognose für die Patienten in Verbindung gebracht [Akamine u. a. (2004)]. Desweiteren wurde eine Überexpression von sialyl-Lewis^a und sialyl-Lewis^b in Mammakarzinomen als Marker für eine wahrscheinliche Metastasierung nachgewiesen [Steplewska-Mazur u. a. (2000)].

Das Trisaccharidepitop Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc-R wird als Lewis^X bezeichnet. Neutrale GSL der Neolaktoserie, die dieses Epitop besitzen, werden entsprechend als Lewis^X- oder auch CD15-GSL bezeichnet. Eine Verlängerung der Grundstruktur um weitere Gal β 4GlcNAc-Disaccharideinheiten und weitere mögliche interne Fukosylierungen ergeben hoch polare CD15-GSL mit Grundstrukturen von nLc6Cer bis nLc12Cer. Diese lassen sich mit der herkömmlichen DC aber nicht voneinander trennen. Daher wurde eine Methode etabliert, um diese hochpolaren langkettigen GSL zu trennen und sie im Anschluß nach Immundetektion massenspektrometrisch zu charakterisieren.

Die automatisierte Mehrfachchromatographie (AMD, engl. *Automated Multiple Development*) in Verbindung mit einem Antikörper-vermittelten Nachweis und der IR-MALDI-o-TOF MS ergab eine Vielzahl an CD15-positiven Strukturen in einer GSL-Mischung aus humanen Granulozyten. Die GSL wurden in einem Dreifachlauf im Laufmittel für neutrale GSL getrennt. CD15-GSL mit „normaler“ Kettenlänge mit nLc6Cer und einer weiteren Fukose konnten zwei- bis dreimal besser voneinander getrennt werden. Die langkettigen GSL mit nLc10Cer-Grundstruktur und länger wurden überhaupt erst nach der Mehrfachchromatographie zugänglich. Mittels Overlay-Assay konnten 14 distinkte Banden unterschieden werden, die im Anschluß massenspektrometrisch charakterisiert

wurden. Dabei konnte eine Vielzahl an CD15-Strukturen detektiert werden. Neben einfach fukosylierten konnten auch mehrfach fukosylierte CD15-GSL nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AMD in Kombination mit IR-MALDI-o-TOF eine hervorragende Möglichkeit bietet, langkettige tumorassoziierte GSL zu trennen und zu charakterisieren. Die Methode könnte bei der Analyse von Serumproben eingesetzt werden. Serum enthält aufgrund von „shedding“-Prozessen Bestandteile von Zellmembranen und somit auch von Tumorzellen. Eine große Anzahl von Serumproben wird derzeit auf ihren Gehalt an verschiedenen GSL, u.a. auch CD15s-Ganglioside diverser Kettenlängen, untersucht [Souady u.a. (In Vorbereitung)]. Dabei könnte auch die etablierte Methode der AMD-DC-IR-MALDI-o-TOF MS auf die jeweiligen GSL-Spezies angepasst werden, um eine strukturelle Charakterisierung von neutralen GSL und Gangliosiden aus Serum zu ermöglichen.

7 Zusammenfassung

7.1 Zusammenfassung

Lektine und Toxine

Zahlreiche pflanzliche Lektine und bakterielle Toxine nutzen Glykosphingolipide (GSL) als Rezeptoren, um an Zellen zu adhären und diese zu infiltrieren. Viscumin ist ein Beispiel für ein pflanzliches Lektin mit hoher Bindeaffinität an Ganglioside mit CD75s-Epitop. Das Shiga Toxin ist ein bakterielles Toxin, das an neutrale GSL der Globoserie, und zwar an Gb3Cer und dessen Elongationsprodukt Gb4Cer bindet. Obwohl die Strukturen und der Ursprung der Toxine unterschiedlich sind, besitzen sie einen identischen Wirkmechanismus. Beide Toxine werden von Zellen internalisiert, retrograd zum ER transportiert und führen durch Inhibierung der Proteinbiosynthese an den Ribosomen letztendlich zum Zelltod. Sollten diese Toxin-Rezeptoren auf Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen erhöht exprimiert werden und somit tumorassoziiert sein, wären sie geeignete Targets für adjuvante Therapien mit pflanzlichen Lektinen oder bakteriellen Toxinen.

Tumorassoziierte Glykosphingolipide in Nierenkarzinomen

Die GSL aus 20 Nierenkarzinomen und korrespondierenden gesunden Vergleichsgeweben wurden extrahiert und auf die Expression des Viscuminrezeptors CD75s untersucht. Dazu wurden die Lipidhextrakte mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die GSL mittels Immundetektion nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass in 65% des untersuchten Probenmaterials eine Erhöhung des Viscuminrezeptors in den Tumorgeweben im Vergleich zu den gesunden Geweben vorlag. Daraufhin wurde auch die isomere Struktur des Rezeptors, das iso-CD75s, analysiert, wobei sich ebenfalls eine Erhöhung und zwar in 50% der Fälle ergab. Die Vorläuferstruktur der beiden Ganglioside, das nLc4Cer, zeigte in 60% aller Fälle eine erhöhte Expression, so dass von einer Tumorassoziation gesprochen werden kann. Alle Strukturen wurden massenspektrometrisch mit IR-MALDI-o-TOF eindeutig identifiziert und charakterisiert.

Die 20 GSL-Extrakte der Nierenkarzinomgewebe und der korrespondierenden, gesunden Vergleichsgewebe wurden darüber hinaus auch auf die Expression der Shiga Toxin-

Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer untersucht. Die Arbeiten ergaben im Vergleich zum Viscumin-Rezeptor den umgekehrten Fall, da in 75% der Fälle eine verminderte Expression an Gb3Cer im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe vorlag. Das Elongationsprodukt Gb4Cer wurde sogar bei 85% der Tumoren in verminderter Expression nachgewiesen. Auch diese GSL wurden massenspektrometrisch mit nanoESI Q-TOF eindeutig identifiziert und charakterisiert.

Tumorassoziierte Glykosphingolipide in Pankreaskarzinomzelllinien

Als nächstes wurde ein Zellkulturmodell etabliert, um die Antitumor-Wirksamkeit von Viscumin und seinem rekombinanten Pendant rViscumín zu analysieren. Dazu wurde eine Kollektion von sehr gut charakterisierten Pankreaskarzinomzelllinien ausgesucht, die ein möglichst breites Spektrum an klinischen Parametern, wie Ursprung (Primärtumor oder Metastasen) oder unterschiedlichen Differenzierungsgrad, abdecken. Letztendlich wurden sieben Pankreaskarzinomzelllinien ausgewählt, welche die genannten Voraussetzungen erfüllten. Mittels Zytotoxizitätsassays wurde die Sensitivität der Zellen gegenüber Viscumin und rViscumín bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die meisten der sieben analysierten Zelllinien ab einer Konzentration von $0,1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf das Viscumin bzw. rViscumín sensitiv reagierten. Bei höheren Konzentrationen zeigten beide Lektine eine zytotoxische Wirkung bei allen Zelllinien und ihre Viabilität fiel teilweise auf unter 20% des Kontrollwertes. Aufgrund der Sensitivität gegenüber Viscumin und rViscumín müssen CD75s-Rezeptoren auf den verschiedenen Zelllinien präsent sein. Durch Lektin-vermittelte Immunfluoreszenzmikroskopie konnte diese Annahme bestätigt werden, da bei allen Zelllinien eine Bindung der Lektine an die Zellen nachgewiesen werden konnte. Allerdings zeigten die Zelllinien eine unterschiedlich starke Fluoreszenzfärbung. Daher ist die anstehende strukturelle Charakterisierung der Viscuminrezeptoren bei jeder einzelnen Zelllinie von höchster Priorität und bietet wichtige Ansatzpunkte für künftige Forschungsarbeiten. Weiterhin sollten die Pankreaskarzinomzelllinien in zukünftigen Arbeiten mittels Zytotoxizitätsassay auf ihre Stx-Sensitivität und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie auf die eventuell vorhandenen Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer und bei positivem Befund deren Strukturen strukturell charakterisiert werden.

Trennung langkettiger, tumorassoziiertes GSL

Für verschiedene Tumoren, u.a. auch Pankreaskarzinome, sind in der Literatur Le^x/CD15-GSL als tumorassoziierte GSL beschrieben worden. Die Basisstruktur ist dabei nLc6Cer

mit Gal β 4GlcNAc-Terminus, an den subterminal am GlcNAc eine Fukose gebunden ist. Allerdings ist das Zuckergrundgerüst häufig um ein oder mehrere Gal β 4GlcNAc-Disaccharideinheiten verlängert. Durch diese Elongation des hydrophilen Anteils werden die GSL so polar, dass eine Trennung mittels herkömmlicher DC nicht mehr möglich ist. Mit Hilfe der automatisierten Mehrfachchromatographie (AMD, engl. *Automated Multiple Development*) konnten diese langkettigen, hochpolaren CD15-GSL voneinander getrennt werden. Nach erfolgter Immundetektion waren distinkte Banden zu erkennen und die Strukturen konnten mit Hilfe der IR-MALDI-o-TOF Massenspektrometrie identifiziert und charakterisiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass GSL mit CD75s- und iso-CD75s-Struktur sowie deren Vorläuferstruktur nLc4Cer im Falle von Nierenkarzinomen vielversprechende Targetstrukturen für Adjuvanttherapien sowohl mit dem nativen Viscumin als auch mit dem gentechnisch hergestellten rViscumin darstellen. Anzumerken bleibt, dass die Ergebnisse der GSL-Expressionsanalysen bei Nierenkarzinomen zeigen, dass bei gleichem Tumortyp individuelle GSL-Muster nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Therapie mit Viscumin nicht für alle Patienten gleichermaßen in Frage kommen kann. Daher besteht die Notwendigkeit, GSL-basierte Therapiekonzepte auf jeden einzelnen Patienten individuell anzupassen, damit eine solche Individualtherapie erfolgreich sein kann. Das konnte für die Shiga Toxin-Rezeptoren gezeigt werden. Beide Toxin-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer eignen sich im Falle von Nierenkarzinomen nur bedingt als Zielstruktur für eine Therapie mit diesem bakteriellen Toxin.

Im Zellkulturmodell mit ausgewählten Pankreaskarzinomzelllinien konnte eine Bindung sowie der zytotoxische Effekt des Viscumins und rViscumins auf die Zellen nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Zelllinien bei verschiedenen Lektinkonzentrationen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Viscumin bzw. rViscumin. Das ist ein Anhaltspunkt dafür, dass im Falle einer Viscumintherapie, die optimale Dosis für jeden Patienten individuell eingestellt werden muss.

8 Literaturverzeichnis

- [Adler u. a. 2007] ADLER, G ; SEUFFERLEIN, T ; BISCHOFF, S C. ; BRAMBS, H J. ; FEUERBACH, S ; GRABENBAUER, G ; HAHN, S ; HEINEMANN, V ; HOHENBERGER, W ; LANGREHR, J M. ; LUTZ, M P. ; MICKE, O ; NEUHAUS, H ; NEUHAUS, P ; OETTL, H ; SCHLAG, P M. ; SCHMID, R ; SCHMIEGEL, W ; SCHLOTTMANN, K ; WERNER, J ; WIEDENMANN, B ; KOPP, I: S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer"2007. In: *Z Gastroenterol* 45 (2007), Jun, Nr. 6, S. 487–523
- [Agapov u. a. 1999] AGAPOV, I I. ; TONEVITSKY, A G. ; MOYSENOVICH, M M. ; MALUCHENKO, N V. ; WEYHENMEYER, R ; KIRPICHNIKOV, M P.: Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. In: *FEBS Lett* 452 (1999), Jun, Nr. 3, S. 211–214
- [Akamine u. a. 2004] AKAMINE, S ; NAKAGOE, T ; SAWAI, T ; TSUJI, T ; TANAKA, K ; HIDAKA, S ; SHIBASAKI, S ; NANASHIMA, A ; YAMAGUCHI, H ; NAGAYASU, T ; YASUTAKE, T: Differences in prognosis of colorectal cancer patients based on the expression of sialyl Lewis^x, sialyl Lewis^x and sialyl Tn antigens in serum and tumor tissue. In: *Anticancer Res* 24 (2004), Jul-Aug, Nr. 4, S. 2541–2546
- [Alken 2004] ALKEN, C-E ; RÜBBEN, H (Hrsg.) ; SCHULZE, H (Hrsg.) ; SÖKELAND, J (Hrsg.): *Urologie*. 13. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2004
- [Bantel u. a. 1999] BANTEL, H ; ENGELS, I H. ; VOELTER, W ; SCHULZE-OSTHOFF, K ; WESSELBORG, S: Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. In: *Cancer Res* 59 (1999), May, Nr. 9, S. 2083–2090
- [Barbieri u. a. 1993] BARBIERI, L ; BATTELLI, M G. ; STIRPE, F: Ribosome-inactivating proteins from plants. In: *Biochim Biophys Acta* 1154 (1993), Dec, Nr. 3-4, S. 237–282
- [Beuth 1997] BEUTH, J: Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I. In: *Anticancer Drugs* 8 Suppl 1 (1997), Apr, S. 53–55
- [Beuth u. a. 1992] BEUTH, J ; KO, H L. ; GABIUS, H J. ; BURRICHTER, H ; OETTE, K ; PULVERER, G: Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers

- in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. In: *Clin Invest* 70 (1992), Aug, Nr. 8, S. 658–661
- [Beuth u. a. 1994] BEUTH, J ; KO, H L. ; TUNGGAL, L ; BUSS, G ; JELJASZEWICZ, J ; STEUER, M K. ; PULVERER, G: Immunoactive action of mistletoe lectin-1 in relation to dose. In: *Arzneimittelforschung* 44 (1994), Nov, Nr. 11, S. 1255–1258
- [Bocci 1993] BOCCI, V: Mistletoe (*viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. In: *J Biol Regul Homeost Agents* 7 (1993), Jan-Mar, Nr. 1, S. 1–6
- [Böcker u. a. 2004] BÖCKER, W (Hrsg.) ; DENK, H (Hrsg.) ; HEITZ, P U. (Hrsg.): *Repetitorium Pathologie*. 1. München : Urban & Fischer Verlag, 2004
- [Bono u. Lovisolo 1997] BONO, A V. ; LOVISOLO, J A.: Renal cell carcinoma–diagnosis and treatment: state of the art. In: *Eur Urol* 31 Suppl 1 (1997), S. 47–55
- [Boyd u. Shapleigh 1954] BOYD, W C. ; SHAPLEIGH, E: Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). In: *Blood* 9 (1954), Dec, Nr. 12, S. 1194–1198
- [Brandley u. a. 1990] BRANDLEY, B K. ; SWIEDLER, S J. ; ROBBINS, P W.: Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. In: *Cell* 63 (1990), Nov, Nr. 5, S. 861–863
- [Büssing u. a. 1996] BÜSSING, A ; SUZART, K ; BERGMANN, J ; PFÜLLER, U ; SCHIETZEL, M ; SCHWEIZER, K: Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. In: *Cancer Lett* 99 (1996), Jan, Nr. 1, S. 59–72
- [Cebović u. a. 2008] CEBOVIĆ, T ; SPASIĆ, S ; POPOVIĆ, M: Cytotoxic effects of the *Viscum album* L. extract on Ehrlich tumour cells in vivo. In: *Phytother Res* 20 (2008), Aug, Nr. 8, S. 1097–103
- [Chen u. a. 1995] CHEN, F ; KISHIDA, T ; DUH, F M. ; RENBAUM, P ; ORCUTT, M L. ; SCHMIDT, L ; ZBAR, B: Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. In: *Cancer Res* 55 (1995), Nov, Nr. 21, S. 4804–4807
- [Chester 1998] CHESTER, M A.: IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids–recommendations 1997. In: *Eur J Biochem* 257 (1998), Oct, Nr. 2, S. 293–298

-
- [Colombo-Benkmann u. Senninger 2005] COLOMBO-BENKMANN, M (Hrsg.) ; SENNINGER, N (Hrsg.): *Chirurgie von Leber, Gallenwegen und Pankreas*. Berlin : Lehmanns Media - LOB.de, 2005
- [Dall'Olio 2000] DALL'OLIO, F: The sialyl- α 2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. In: *Glycoconj J* 17 (2000), Oct, Nr. 10, S. 669–676
- [Dall'Olio u. Chiricolo 2001] DALL'OLIO, F ; CHIRICOLO, M: Sialyltransferases in cancer. In: *Glycoconj J* 18 (2001), Nov-Dec, Nr. 11-12, S. 841–850
- [Dall'Olio u. a. 2004] DALL'OLIO, F ; CHIRICOLO, M ; D'ERRICO, A ; GRUPPIONI, E ; ALTIMARI, A ; FIORENTINO, M ; GRIGIONI, W F.: Expression of β -galactoside α 2,6 sialyltransferase and of α 2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis. In: *Glycobiology* 14 (2004), Jan, Nr. 1, S. 39–49
- [Danaei u. a. 2005] DANA EI, G ; VANDER HOORN, S ; LOPEZ, A D. ; MURRAY, C J. ; EZZATI, M ; COMPARATIVE RISK ASSESSMENT COLLABORATING GROUP (CANCERS): Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. In: *Lancet* 366 (2005), Nov, Nr. 9499, S. 1784–1793
- [Dickler u. a. 1999] DICKLER, M N. ; RAGUPATHI, G ; LIU, N X. ; MUSSELLI, C ; MARTINO, D J. ; MILLER, V A. ; KRIS, M G. ; BREZICKA, F T. ; LIVINGSTON, P O. ; GRANT, S C.: Immunogenicity of a fucosyl-GM1-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine in patients with small cell lung cancer. In: *Clin Cancer Res* 5 (1999), Oct, Nr. 10, S. 2773–2779
- [Distler u. a. 2008a] DISTLER, U ; HÜLSEWIG, M ; SOUADY, J ; DREISEWERD, K ; HAIER, J ; SENNINGER, N ; FRIEDRICH, A W. ; KARCH, H ; HILLENKAMP, F ; BERKENKAMP, S ; PETER-KATALINIĆ, J ; MÜTHING, J: 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. In: *Anal Chem* 80 (2008), Mar, Nr. 6, S. 1835–1846
- [Distler u. a. 2008b] DISTLER, U ; SOUADY, J ; HÜLSEWIG, M ; DRMIĆ-HOFMAN, I ; HAIER, J ; DENZ, A ; GRÜTZMANN, R ; PILARSKY, C ; SENNINGER, N ; DREISEWERD, K ; BERKENKAMP, S ; SCHMIDT, M A. ; PETER-KATALINIĆ, J ; MÜTHING, J: Tumor-associated CD75s- and iso-CD75s-gangliosides are potential targets for adjuvant therapy in pancreatic cancer. In: *Mol Cancer Ther* 7 (2008), Aug, Nr. 8, S. 2464–2475

- [Distler u. a. 2009] DISTLER, U ; SOUADY, J ; HÜLSEWIG, M ; DRMIĆ-HOFMAN, I ; HAIER, J ; FRIEDRICH, A W. ; KARCH, H ; SENNINGER, N ; DREISEWERD, K ; BERKENKAMP, S ; SCHMIDT, M A. ; PETER-KATALINIĆ, J ; MÜTHING, J: Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. In: *PLoS ONE* 4 (2009), Nr. 8
- [Domon u. Costello 1988] DOMON, B ; COSTELLO, C E.: Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. In: *Biochemistry* 27 (1988), Mar, Nr. 5, S. 1534–1543
- [Dreisewerd u. a. 2005] DREISEWERD, K ; MÜTHING, J ; ROHLFING, A ; MEISEN, I ; VUKELIĆ, Z ; PETER-KATALINIĆ, J ; HILLENKAMP, F ; BERKENKAMP, S: 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. In: *Anal Chem* 77 (2005), Jul, Nr. 13, S. 4098–4107
- [van Echten u. Sandhoff 1993] ECHTEN, G van ; SANDHOFF, K: Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and Regulation. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Mar, Nr. 8, S. 5341–5344
- [Ecsedy u. a. 1998] ECSEDY, J A. ; YOHE, H C. ; BERGERON, A J. ; SEYFRIED, T N.: Tumor-infiltrating macrophages influence the glycosphingolipid composition of murine brain tumors. In: *J Lipid Res* 39 (1998), Nov, Nr. 11, S. 2218–2227
- [Elluru u. a. 2008] ELLURU, S R. ; HUYEN, J P. ; DELIGNAT, S ; KAZATCHKINE, M D. ; FRIBOULET, A ; KAVERI, S V. ; BAYRY, J: Induction of maturation and activation of human dendritic cells: a mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* as complimentary therapy in cancer. In: *BMC Cancer* 8 (2008), S. 161–161
- [Elsässer u. a. 1992] ELSÄSSER, H P. ; LEHR, U ; AGRICOLA, B ; KERN, H F.: Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. In: *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 61 (1992), Nr. 5, S. 295–306
- [Elsässer u. a. 1993] ELSÄSSER, H P. ; LEHR, U ; AGRICOLA, B ; KERN, H F.: Structural analysis of a new highly metastatic cell line PaTu 8902 from a primary human pancreatic adenocarcinoma. In: *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64 (1993), Nr. 4, S. 201–207

- [Elsässer-Beile u. a. 2000] ELSÄSSER-BEILE, U ; GUTZEIT, O ; BAUER, S ; KATZENWADEL, A ; SCHULTZE-SEEMANN, W ; WETTERAUER, U: Systemic and local immunomodulatory effects of intravesical BCG therapy in patients with superficial urinary bladder carcinomas. In: *J Urol* 163 (2000), Jan, Nr. 1, S. 296–299
- [Endo u. Tsurugi 1987] ENDO, Y ; TSURUGI, K: RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. In: *J Biol Chem* 262 (1987), Jun, Nr. 17, S. 8128–8130
- [Endo u. a. 1988] ENDO, Y ; TSURUGI, K ; FRANZ, H: The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. In: *FEBS Lett* 231 (1988), Apr, Nr. 2, S. 378–380
- [Escudier 2007] ESCUDIER, B: Sorafenib in kidney cancer. In: *Ann Oncol* 18 Suppl 9 (2007), Jul, S. 90–93
- [Escudier u. a. 2007a] ESCUDIER, B ; EISEN, T ; STADLER, W M. ; SZCZYLIK, C ; OUDARD, S ; SIEBELS, M ; NEGRIER, S ; CHEVREAU, C ; SOLSKA, E ; DESAI, A A. ; ROLLAND, F ; DEMKOW, T ; HUTSON, T E. ; GORE, M ; FREEMAN, S ; SCHWARTZ, B ; SHAN, M ; SIMANTOV, R ; BUKOWSKI, R M.: Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. In: *N Engl J Med* 356 (2007), Jan, Nr. 2, S. 125–134
- [Escudier u. a. 2007b] ESCUDIER, B ; PLUZANSKA, A ; KORALEWSKI, P ; RAVAUD, A ; BRACARDA, S ; SZCZYLIK, C ; CHEVREAU, C ; FILIPEK, M ; MELICHAR, B ; BAJETTA, E ; GORBUNOVA, V ; BAY, J O. ; BODROGI, I ; JAGIELLO-GRUSZFELD, A ; MOORE, N: Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. In: *Lancet* 370 (2007), Dec, Nr. 9605, S. 2103–2111
- [Faivre u. a. 2006] FAIVRE, S ; KROEMER, G ; RAYMOND, E: Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. In: *Nat Rev Drug Discov* 5 (2006), Aug, Nr. 8, S. 671–688
- [Falconer u. a. 1988] FALCONER, J ; CHAN, E C. ; MADSEN, G ; THOMSON, M ; DAVIES, J ; SMITH, R: Secretion of β -endorphin into the maternal circulation by uteroplacental tissues in response to hypoglycaemic stress. In: *J Endocrinol* 118 (1988), Aug, Nr. 2, S. 5–8
- [Falguières u. a. 2008] FALGUIÈRES, T ; MAAK, M ; WEYHERN, C von ; SARR, M ; SASTRE, X ; POUPON, M F. ; ROBINE, S ; JOHANNES, L ; JANSSEN, K P.: Human colorectal

tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. In: *Mol Cancer Ther* 7 (2008), Aug, Nr. 8, S. 2498–2508

[Faller u. Schönke 2004] FALLER, A ; SCHÖNKE, M: *Der Körper des Menschen. Einführung in Bau und Funktion*. 14. Stuttgart : Thieme, 2004. – 826 S.

[Feizi u. a. 1979] FEIZI, T ; CHILDS, R A. ; WATANABE, K ; HAKOMORI, S I.: Three types of blood group I specificity among monoclonal anti-I autoantibodies revealed by analogues of a branched erythrocyte glycolipid. In: *J Exp Med* 149 (1979), Apr, Nr. 4, S. 975–980

[Fogh u. a. 1980] FOGH, J ; ORFEO, T ; TISO, J ; SHARKEY, F E. ; FOGH, J M. ; DANIELS, W P.: Twenty-three new human tumor lines established in nude mice. In: *Exp Cell Biol* 48 (1980), Nr. 3, S. 229–239

[Franz 1986] FRANZ, H: Mistletoe lectins and their A and B chains. In: *Oncology* 43 Suppl 1 (1986), S. 23–34

[Franz u. a. 1977] FRANZ, H ; HAUSTEIN, B ; LUTHER, P ; KUROPKA, U ; KINDT, A: Isolation and characterization of mistletoe extracts (*Viscum album L.*). I. Affinity chromatography of mistletoe extracts on immobilized plasma proteins. In: *Acta Biol Med Ger* 36 (1977), Nr. 1, S. 113–117

[Franz u. a. 1981] FRANZ, H ; ZISKA, P ; KINDT, A: Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album L.*). In: *Biochem J* 195 (1981), May, Nr. 2, S. 481–484

[Friedrich u. a. 2002] FRIEDRICH, A W. ; BIELASZEWSKA, M ; ZHANG, W L. ; PULZ, M ; KUCZIUS, T ; AMMON, A ; KARCH, H: Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. In: *J Infect Dis* 185 (2002), Jan, Nr. 1, S. 74–84

[Galili 2005] GALILI, U: The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. In: *Immunol Cell Biol* 83 (2005), Dec, Nr. 6, S. 674–686

[Gardin 2009] GARDIN, N E.: Immunological response to mistletoe (*Viscum album L.*) in cancer patients: a four-case series. In: *Phytother Res* 23 (2009), Mar, Nr. 3, S. 407–411

[Gatehouse u. a. 1995] GATEHOUSE, A M R. ; POWELL, K S. ; PEUMANS, W J. ; DAMME, E J M. ; GATEHOUSE, J ; PUSZTAI, A (Hrsg.) ; BARDOCZ, S (Hrsg.): *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. London : Taylor & Francis, 1995

- [Gerber u. a. 2002] GERBER, A ; KARCH, H ; ALLERBERGER, F ; VERWEYEN, H M. ; ZIMMERHACKL, L B.: Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. In: *J Infect Dis* 186 (2002), Aug, Nr. 4, S. 493–500
- [Ghaneh u. a. 2007] GHANEH, P ; COSTELLO, E ; NEOPTOLEMOS, J P.: Biology and management of pancreatic cancer. In: *Gut* 56 (2007), Aug, Nr. 8, S. 1134–1152
- [Godley u. Taylor 2001] GODLEY, P A. ; TAYLOR, M: Renal cell carcinoma. In: *Curr Opin Oncol* 13 (2001), May, Nr. 3, S. 199–203
- [Greene 2002] GREENE, F L.: The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. In: *Bull Am Coll Surg* 87 (2002), Jul, Nr. 7, S. 13–15
- [Guittard u. a. 1999] GUITTARD, J ; HRONOWSKI, X L. ; COSTELLO, C E.: Direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of glycosphingolipids on thin layer chromatographic plates and transfer membranes. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 13 (1999), Nr. 18, S. 1838–1849
- [Hajtó u. a. 2003a] HAJTÓ, T ; BERKI, T ; BOLDIZSÁR, F ; NÉMETH, P: Galactoside-specific plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I induces enhanced proliferation and apoptosis of murine thymocytes in vivo. In: *Immunol Lett* 86 (2003), Mar, Nr. 1, S. 23–27
- [Hajtó u. a. 2003b] HAJTÓ, T ; BERKI, T ; PÁLINKÁS, L ; BOLDIZSÁR, F ; NAGY, G ; NÉMETH, P: Galactoside-specific mistletoe lectin modulates dexamethasone-induced apoptosis and glucocorticoid receptor level in Balb/c thymocytes. In: *In Vivo* 17 (2003), Mar-Apr, Nr. 2, S. 163–167
- [Hajtó u. a. 1990] HAJTÓ, T ; HOSTANSKA, K ; FREI, K ; RORDORF, C ; GABIUS, H J.: Increased Secretion of Tumor Necrosis Factors α , Interleukin 1, and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells Exposed to β -Galactoside-specific Lectin from Clinically Applied Mistletoe Extract. In: *Cancer Res* 50 (1990), Jun, Nr. 11, S. 3322–3326
- [Hajtó u. a. 1989] HAJTÓ, T ; HOSTANSKA, K ; GABIUS, H J.: Modulatory Potency of the β -Galactoside-specific Lectin from Mistletoe Extract (Iscador) on the Host Defense System *In Vivo* in Rabbits and Patients. In: *Cancer Res* 49 (1989), Sep, Nr. 17, S. 4803–4808

- [Hakomori 1986] HAKOMORI, S: Glykosphingolipide. In: *Spektrum der Wissenschaft* 6 (1986), S. 90–100
- [Hakomori 1989] HAKOMORI, S: Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. In: *Adv Cancer Res* 52 (1989), S. 257–331
- [Hakomori 1990] HAKOMORI, S: Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. In: *J Biol Chem* 265 (1990), Nov, Nr. 31, S. 18713–18716
- [Hakomori 1998] HAKOMORI, S: Cancer-associated glycosphingolipid antigens: their structure, organization, and function. In: *Acta Anat (Basel)* 161 (1998), Nr. 1-4, S. 79–90
- [Hakomori 2002] HAKOMORI, S: The glycosynapse. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Jan, Nr. 1, S. 225–232
- [Hakomori 2004] HAKOMORI, S: Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. In: *Glycoconj J* 21 (2004), Nr. 3-4, S. 125–137
- [Harder u. Simons 1997] HARDER, T ; SIMONS, K: Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. In: *Curr Opin Cell Biol* 9 (1997), Aug, Nr. 4, S. 534–542
- [Hartley u. Lord 2004] HARTLEY, M R. ; LORD, J M.: Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. In: *Biochim Biophys Acta* 1701 (2004), Sep, Nr. 1-2, S. 1–14
- [Hedlund u. a. 2008] HEDLUND, M ; NG, E ; VARKI, A ; VARKI, N M.: α 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation *In vivo*. In: *Cancer Res* 68 (2008), Jan, Nr. 2, S. 388–394
- [Heiny u. Beuth 1994] HEINY, B M. ; BEUTH, J: Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces beta-endorphin release and immunopotential in breast cancer patients. In: *Anticancer Res* 14 (1994), May-Jun, Nr. 3B, S. 1339–1342
- [Hillenkamp u. Peter-Katalinić 2007] HILLENKAMP, F (Hrsg.) ; PETER-KATALINIĆ, J (Hrsg.): *MALDI MS*. 1. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007

- [Hostanska u. a. 1996] HOSTANSKA, K ; HAJTO, T ; WEBER, K ; FISCHER, J ; LENTZEN, H ; SÜTTERLIN, B ; SALLER, R: A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. In: *Nat Immun* 15 (1996), Nr. 6, S. 295–311
- [Hudes u. a. 2007] HUDES, G ; CARDUCCI, M ; TOMCZAK, P ; DUTCHER, J ; FIGLIN, R ; KAPOOR, A ; STAROSLAWSKA, E ; SOSMAN, J ; MCDERMOTT, D ; BODROGI, I ; KOVACEVIC, Z ; LESOVOY, V ; SCHMIDT-WOLF, I G. ; BARBARASH, O ; GOKMEN, E ; O'TOOLE, T ; LUSTGARTEN, S ; MOORE, L ; MOTZER, R J. ; GLOBAL ARCC TRIAL: Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. In: *N Engl J Med* 356 (2007), May, Nr. 22, S. 2271–2281
- [Huguet Soler u. a. 1996] HUGUET SOLER, M ; STOEVA, S ; SCHWAMBORN, C ; WILHELM, S ; STIEFEL, T ; VOELTER, W: Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I. In: *FEBS Lett* 399 (1996), Dec, Nr. 1-2, S. 153–157
- [Hülsewig 2005] HÜLSEWIG, M: *Molekulargenetische und strukturelle Charakterisierung von Tumor-assoziierten Glykosphingolipiden aus humanen Nierenkarzinomen und Patientenserien*, Technische Fakultä, Universität Bielefeld, Diplomarbeit, Dec 2005
- [Ichikawa u. a. 2000] ICHIKAWA, D ; KITAMURA, K ; TANI, N ; NISHIDA, S ; TSURUTOME, H ; HAKOMORI, S ; IKEDA, E ; MUTOH, F ; KURIOKA, H ; YAMAGISHI, H: Molecular detection of disseminated cancer cells in the peripheral blood and expression of sialylated antigens in colon cancers. In: *J Surg Oncol* 75 (2000), Oct, Nr. 2, S. 98–102
- [Ito u. a. 2001] ITO, A ; SAITO, S ; MASUKO, T ; OH-EDA, M ; MATSUURA, T ; SATOH, M ; NEJAD, F M. ; ENOMOTO, T ; ORIKASA, S ; HAKOMORI, S I.: Monoclonal antibody (5F3) defining renal cell carcinoma-associated antigen disialosyl globopentaosylceramide (V³NeuAcIV⁶NeuAcGb5), and distribution pattern of the antigen in tumor and normal tissues. In: *Glycoconj J* 18 (2001), Jun, Nr. 6, S. 475–485
- [Ivleva u. a. 2004] IVLEVA, V B. ; ELKIN, Y N. ; BUDNIK, B A. ; MOYER, S C. ; O'CONNOR, P B. ; COSTELLO, C E.: Coupling thin-layer chromatography with vibrational cooling matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry for the analysis of ganglioside mixtures. In: *Anal Chem* 76 (2004), Nov, Nr. 21, S. 6484–6491
- [Jacobson u. Dietrich 1999] JACOBSON, K ; DIETRICH, C: Looking at lipid rafts? In: *Trends Cell Biol* 9 (1999), Mar, Nr. 3, S. 87–91

- [Janssen u. a. 2006] JANSSEN, K P. ; VIGNJEVIC, D ; BOISGARD, R ; FALGUIÈRES, T ; BOUSQUET, G ; DECAUDIN, D ; DOLLÉ, F ; LOUARD, D ; TAVITIAN, B ; ROBINE, S ; JOHANNES, L: *In vivo* tumor targeting using a novel intestinal pathogen-based delivery approach. In: *Cancer Res* 66 (2006), Jul, Nr. 14, S. 7230–7236
- [Janssen u. a. 1993] JANSSEN, O ; SCHEFFLER, A ; KABELITZ, D: *In vitro* effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). In: *Arzneimittelforschung* 43 (1993), Nov, Nr. 11, S. 1221–1227
- [Jemal u. a. 2008] JEMAL, A ; SIEGEL, R ; WARD, E ; HAO, Y ; XU, J ; MURRAY, T ; THUN, M J.: Cancer statistics, 2008. In: *CA Cancer J Clin* 58 (2008), Mar-Apr, Nr. 2, S. 71–96
- [Jocham u. a. 2004] JOCHAM, D ; RICHTER, A ; HOFFMANN, L ; IWIG, K ; FAHLENKAMP, D ; ZAKRZEWSKI, G ; SCHMITT, E ; DANNENBERG, T ; LEHMACHER, W ; WIETERSHEIM, J von ; DOEHN, C: Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. In: *Lancet* 363 (2004), Feb, Nr. 9409, S. 594–599
- [Johannes u. Decaudin 2005] JOHANNES, L ; DECAUDIN, D: Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. In: *Gene Ther* 12 (2005), Sep, Nr. 18, S. 1360–1368
- [Johansson u. a. 2009] JOHANSSON, D ; KOSOVAC, E ; MOHARER, J ; LJUSLINDER, I ; BRÄNNSTRÖM, T ; JOHANSSON, A ; BEHNAM-MOTLAGH, P: Expression of verotoxin-1 receptor Gb3 in breast cancer tissue and verotoxin-1 signal transduction to apoptosis. In: *BMC Cancer* 9 (2009), S. 67–67
- [Jupille u. Perry 1976] JUPILLE, T H. ; PERRY, J A.: Programmed multiple development in thin-layer chromatography. In: *Science* 194 (1976), Oct, Nr. 4262, S. 288–293
- [Karch 2001] KARCH, H: The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)–associated hemolytic-uremic syndrome. In: *Semin Thromb Hemost* 27 (2001), Jun, Nr. 3, S. 207–213
- [Karch u. a. 2005] KARCH, H ; TARR, P I. ; BIELASZEWSKA, M: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. In: *Int J Med Microbiol* 295 (2005), Oct, Nr. 6-7, S. 405–418
- [Kiarash u. a. 1994] KIARASH, A ; BOYD, B ; LINGWOOD, C A.: Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially

- recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Apr, Nr. 15, S. 11138–11146
- [Kindler u. a. 2005] KINDLER, H L. ; FRIBERG, G ; SINGH, D A. ; LOCKER, G ; NATTAM, S ; KOZLOFF, M ; TABER, D A. ; KARRISON, T ; DACHMAN, A ; STADLER, W M. ; VOKES, E E.: Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. In: *J Clin Oncol* 23 (2005), Nov, Nr. 31, S. 8033–8040
- [Klenk 1942] KLENK, E: Gangliosides, a new group of sugar-containing brain lipids. In: *Hoppe-Seyler Z.* 273 (1942), S. 76–86
- [Kowalczyk u. a. 2009] KOWALCZYK, A ; GIL, M ; HORWACIK, I ; ODROWAZ, Z ; KOZBOR, D ; ROKITA, H: The GD2-specific 14G2a monoclonal antibody induces apoptosis and enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in IMR-32 human neuroblastoma cells. In: *Cancer Lett* 281 (2009), Aug, Nr. 2, S. 171–182
- [Krug u. a. 2004] KRUG, L M. ; RAGUPATHI, G ; HOOD, C ; KRIS, M G. ; MILLER, V A. ; ALLEN, J R. ; KEDING, S J. ; DANISHEFSKY, S J. ; GOMEZ, J ; TYSON, L ; PIZZO, B ; BAEZ, V ; LIVINGSTON, P O.: Vaccination of patients with small-cell lung cancer with synthetic fucosyl GM-1 conjugated to keyhole limpet hemocyanin. In: *Clin Cancer Res* 10 (2004), Sep, Nr. 18 Pt 1, S. 6094–6100
- [Ladisch u. a. 1995] LADISCH, S ; HASEGAWA, A ; LI, R ; KISO, M: Immunosuppressive activity of chemically synthesized gangliosides. In: *Biochemistry* 34 (1995), Jan, Nr. 4, S. 1197–1202
- [Lavastre u. a. 2007] LAVASTRE, V ; BINET, F ; MOISAN, E ; CHIASSON, S ; GIRARD, D: Viscum album agglutinin-I induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases. In: *Br J Haematol* 138 (2007), Aug, Nr. 4, S. 545–554
- [Ledeen u. Yu 1982] LEDEEN, R W. ; YU, R K.: Gangliosides: structure, isolation, and analysis. In: *Methods Enzymol* 83 (1982), S. 139–191
- [Lencer u. Tsai 2003] LENCER, W I. ; TSAI, B: The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. In: *Trends Biochem Sci* 28 (2003), Dec, Nr. 12, S. 639–645
- [Lieber u. a. 1975] LIEBER, M ; MAZZETTA, J ; NELSON-REES, W ; KAPLAN, M ; TODARO, G: Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. In: *Int J Cancer* 15 (1975), May, Nr. 5, S. 741–747

- [Ling u. a. 1998] LING, H ; BOODHOO, A ; HAZES, B ; CUMMINGS, M D. ; ARMSTRONG, G D. ; BRUNTON, J L. ; READ, R J.: Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. In: *Biochemistry* 37 (1998), Feb, Nr. 7, S. 1777–1788
- [Lingwood 1996] LINGWOOD, C A.: Role of verotoxin receptors in pathogenesis. In: *Trends Microbiol* 4 (1996), Apr, Nr. 4, S. 147–153
- [Loboda u. a. 2003] LOBODA, A V. ; ACKLOO, S ; CHERNUSHEVICH, I V.: A high-performance matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometer with collisional cooling. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 17 (2003), Nr. 22, S. 2508–2516
- [Lottspeich u. Engels 2006] LOTTSPPEICH, F ; ENGELS, J W.: *Bioanalytik*. 2. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2006
- [Luftmann 2004] LUFTMANN, H: A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer. In: *Anal Bioanal Chem* 378 (2004), Feb, Nr. 4, S. 964–968
- [Macher u. a. 1982] MACHER, B A. ; LEE, W M. ; WESTRICK, M A.: Glycosphingolipids of normal and leukemic human leukocytes. In: *Mol Cell Biochem* 47 (1982), Sep, Nr. 2, S. 81–95
- [Manski 2007] MANSKI, D: *Urologielehrbuch.de*. www.urologielehrbuch.de. Version: Dec 2007
- [Meisen u. a. 2005] MEISEN, I ; FRIEDRICH, A W. ; KARCH, H ; WITTING, U ; PETER-KATALINIĆ, J ; MÜTHING, J: 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. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005), Nr. 24, S. 3659–3665
- [Meisen u. a. 2003] MEISEN, I ; PETER-KATALINIĆ, J ; MÜTHING, J: Discrimination of neolacto-series gangliosides with α 2-3- and α 2-6-linked N-acetylneuraminic acid by nanoelectrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem quadrupole TOF MS. In: *Anal Chem* 75 (2003), Nov, Nr. 21, S. 5719–5725
- [Meisen u. a. 2004] MEISEN, I ; PETER-KATALINIĆ, J ; MÜTHING, J: Direct analysis of silica gel extracts from immunostained glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization

- quadrupole time-of-flight mass spectrometry. In: *Anal Chem* 76 (2004), Apr, Nr. 8, S. 2248–2255
- [Merritt u. Hol 1995] MERRITT, E A. ; HOL, W G.: AB5 toxins. In: *Curr Opin Struct Biol* 5 (1995), Apr, Nr. 2, S. 165–171
- [Merritt u. a. 1994] MERRITT, W D. ; DER-MINASSIAN, V ; REAMAN, G H.: Increased GD3 ganglioside in plasma of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. In: *Leukemia* 8 (1994), May, Nr. 5, S. 816–822
- [Metzgar u. a. 1982] METZGAR, R S. ; GAILLARD, M T. ; LEVINE, S J. ; TUCK, F L. ; BOSSEN, E H. ; BOROWITZ, M J.: Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. In: *Cancer Res* 42 (1982), Feb, Nr. 2, S. 601–608
- [Möckel u. a. 1997] MÖCKEL, B ; SCHWARZ, T ; ZINKE, H ; ECK, J ; LANGER, M ; LENTZEN, H: Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. In: *Arzneimittelforschung* 47 (1997), Oct, Nr. 10, S. 1145–1151
- [Motzer u. Bukowski 2006] MOTZER, R J. ; BUKOWSKI, R M.: Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. In: *J Clin Oncol* 24 (2006), Dec, Nr. 35, S. 5601–5608
- [Motzer u. a. 2007] MOTZER, R J. ; HUTSON, T E. ; TOMCZAK, P ; MICHAELSON, M D. ; BUKOWSKI, R M. ; RIXE, O ; OUDARD, S ; NEGRIER, S ; SZCZYLIK, C ; KIM, S T. ; CHEN, I ; BYCOTT, P W. ; BAUM, C M. ; FIGLIN, R A.: Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. In: *N Engl J Med* 356 (2007), Jan, Nr. 2, S. 115–124
- [Müthing 1996a] MÜTHING, J: High-resolution thin-layer chromatography of gangliosides. In: *J Chromatogr A* 720 (1996), Jan, Nr. 1-2, S. 3–25
- [Müthing 1996b] MÜTHING, J: Influenza A and Sendai viruses preferentially bind to fucosylated gangliosides with linear poly-N-acetyllactosaminyl chains from human granulocytes. In: *Carbohydr Res* 290 (1996), Sep, Nr. 2, S. 217–224
- [Müthing u. a. 2002] MÜTHING, J ; BURG, M ; MÖCKEL, B ; LANGER, M ; METELMANN-STRUPAT, W ; WERNER, A ; NEUMANN, U ; PETER-KATALINIĆ, J ; ECK, J: Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally α 2-6-sialylated neolacto-series gangliosides. In: *Glycobiology* 12 (2002), Aug, Nr. 8, S. 485–497

- [Müthing u. a. 1999] MÜTHING, J ; DUVAR, S ; HEITMANN, D ; HANISCH, F G. ; NEUMANN, U ; LOCHNIT, G ; GEYER, R ; PETER-KATALINIĆ, J: Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of *in vitro* propagated human umbilical vein endothelial cells. In: *Glycobiology* 9 (1999), May, Nr. 5, S. 459–468
- [Müthing u. a. 2004] MÜTHING, J ; MEISEN, I ; BULAU, P ; LANGER, M ; WITTHOHN, K ; LENTZEN, H ; NEUMANN, U ; PETER-KATALINIĆ, J: Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc residues. In: *Biochemistry* 43 (2004), Mar, Nr. 11, S. 2996–3007
- [Müthing u. a. 2005] MÜTHING, J ; MEISEN, I ; KNIEP, B ; HAIER, J ; SENNINGER, N ; NEUMANN, U ; LANGER, M ; WITTHOHN, K ; MILOSEVIĆ, J ; PETER-KATALINIĆ, J: Tumor-associated CD75s gangliosides and CD75s-bearing glycoproteins with Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc-residues are receptors for the anticancer drug rViscumin. In: *FASEB J* 19 (2005), Jan, Nr. 1, S. 103–105
- [Müthing u. a. 2009] MÜTHING, J ; SCHWEPPE, C H. ; KARCH, H ; FRIEDRICH, A W.: Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. In: *Thromb Haemost* 101 (2009), Feb, Nr. 2, S. 252–264
- [Nakamura u. a. 2006] NAKAMURA, K ; SUZUKI, Y ; GOTO-INOUE, N ; YOSHIDA-NORO, C ; SUZUKI, A: Structural characterization of neutral glycosphingolipids by thin-layer chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight MS/MS. In: *Anal Chem* 78 (2006), Aug, Nr. 16, S. 5736–5743
- [Negrier u. a. 2007] NEGRIER, S ; PEROL, D ; RAVAUD, A ; CHEVREAU, C ; BAY, J O. ; DELVA, R ; SEVIN, E ; CATY, A ; ESCUDIER, B: Medroxyprogesterone, interferon alfa-2a, interleukin 2, or combination of both cytokines in patients with metastatic renal carcinoma of intermediate prognosis: results of a randomized controlled trial. In: *Cancer* 110 (2007), Dec, Nr. 11, S. 2468–2477
- [Netter u. Renner 1983] NETTER, F H. ; RENNER, E: *Farbatlanten der Medizin, Bd. 2, Niere und Harnwege: Bd. 2. Bd. 2. 2.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1983
- [Nilsson u. a. 1985] NILSSON, O ; MÅNSSON, J E. ; LINDHOLM, L ; HOLMGREN, J ; SVENNERHOLM, L: Sialosyllactotetraosylceramide, a novel ganglioside antigen detected in human carcinomas by a monoclonal antibody. In: *FEBS Lett* 182 (1985), Mar, Nr. 2, S. 398–402

- [Nimrichter u. a. 2008] NIMRICHTER, L ; BURDICK, M M. ; AOKI, K ; LAROY, W ; FIERRO, M A. ; HUDSON, S A. ; VON SEGGERN, C E. ; COTTER, R J. ; BOCHNER, B S. ; TIEMEYER, M ; KONSTANTOPOULOS, K ; SCHNAAR, R L.: E-selectin receptors on human leukocytes. In: *Blood* 112 (2008), Nov, Nr. 9, S. 3744–3752
- [Niwa u. a. 2003] NIWA, H ; TONEVITSKY, A G. ; AGAPOV, I I. ; SAWARD, S ; PFÜLLER, U ; PALMER, R A.: Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose. In: *Eur J Biochem* 270 (2003), Jul, Nr. 13, S. 2739–2749
- [Olsnes u. a. 1982] OLSNES, S ; STIRPE, F ; SANDVIG, K ; PIHL, A: Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). In: *J Biol Chem* 257 (1982), Nov, Nr. 22, S. 13263–13270
- [Orth u. a. 2007] ORTH, D ; GRIF, K ; KHAN, A B. ; NAIM, A ; DIERICH, M P. ; WÜRZNER, R: The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin *in vitro* correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. In: *Diagn Microbiol Infect Dis* 59 (2007), Nov, Nr. 3, S. 235–242
- [Peter-Katalinić u. Egge 1990] PETER-KATALINIĆ, J ; EGGE, H: Desorption mass spectrometry of glycosphingolipids. In: *Methods Enzymol* 193 (1990), S. 713–733
- [Peumans u. a. 1996] PEUMANS, W J. ; VERHAERT, P ; PFÜLLER, U ; VAN DAMME, E J.: Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). In: *FEBS Lett* 396 (1996), Nov, Nr. 2-3, S. 261–265
- [Pevzner u. a. 2004] PEVZNER, I B. ; AGAPOV, I I. ; NIWA, H ; MALUCHENKO, N V. ; MOISENOVICH, M M. ; PFÜLLER, U ; TONEVITSKY, A G.: Differences in amino acid sequences of mistletoe lectin I and III B-subunits determining carbohydrate binding specificity. In: *Biochim Biophys Acta* 1675 (2004), Nov, Nr. 1-3, S. 155–164
- [Pryme u. a. 2006] PRYME, I F. ; BARDOCZ, S ; PUSZTAI, A ; EWEN, S W.: Suppression of growth of tumour cell lines *in vitro* and tumours *in vivo* by mistletoe lectins. In: *Histol Histopathol* 21 (2006), Mar, Nr. 3, S. 285–299
- [Ragupathi 1996] RAGUPATHI, G: Carbohydrate antigens as targets for active specific immunotherapy. In: *Cancer Immunol Immunother* 43 (1996), Nov, Nr. 3, S. 152–157
- [Rebel u. a. 1980] REBEL, G ; ROBERT, J ; MANDEL, P: Glycolipids and cell differentiation. In: *Adv Exp Med Biol* 125 (1980), S. 159–166

- [Reich u. Schibli 2006] REICH, E ; SCHIBLI, A: *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants*. 1. New York : Thieme Medical Publishers, Inc., 2006
- [Ribéreau-Gayon u. a. 1996] RIBÉREAU-GAYON, G ; DUMONT, S ; MÜLLER, C ; JUNG, M L. ; POINDRON, P ; ANTON, R: Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. In: *Cancer Lett* 109 (1996), Dec, Nr. 1-2, S. 33–38
- [Rivera u. a. 2007] RIVERA, M N. ; KIM, W J. ; WELLS, J ; DRISCOLL, D R. ; BRANNIGAN, B W. ; HAN, M ; KIM, J C. ; FEINBERG, A P. ; GERALD, W L. ; VARGAS, S O. ; CHIN, L ; IAFRATE, A J. ; BELL, D W. ; HABER, D A.: An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. In: *Science* 315 (2007), Feb, Nr. 5812, S. 642–645
- [RKI] <http://www.rki.de>
- [Rohlfing u. a. 2007] ROHLFING, A ; MÜTHING, J ; POHLENTZ, G ; DISTLER, U ; PETER-KATALINIĆ, J ; BERKENKAMP, S ; DREISEWERD, K: IR-MALDI-MS analysis of HPTLC-separated phospholipid mixtures directly from the TLC plate. In: *Anal Chem* 79 (2007), Aug, Nr. 15, S. 5793–5808
- [Roque-Navarro u. a. 2008] ROQUE-NAVARRO, L ; CHAKRABANDHU, K ; LEÓN, J de ; RODRÍGUEZ, S ; TOLEDO, C ; CARR, A ; ACOSTA, C M. ; HUEBER, A O. ; PÉREZ, R: Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. In: *Mol Cancer Ther* 7 (2008), Jul, Nr. 7, S. 2033–2041
- [Rostock u. a. 2005] ROSTOCK, M ; HUBER, R ; GREINER, T ; FRITZ, P ; SCHEER, R ; SCHUELER, J ; FIEBIG, H H.: Anticancer activity of a lectin-rich mistletoe extract injected intratumorally into human pancreatic cancer xenografts. In: *Anticancer Res* 25 (2005), May-Jun, Nr. 3B, S. 1969–1975
- [Sandhoff u. a. 2005] SANDHOFF, R ; GEYER, R ; JENNEMANN, R ; PARET, C ; KISS, E ; YAMASHITA, T ; GORGAS, K ; SIJMONSMA, T P. ; IWAMORI, M ; FINAZ, C ; PROIA, R L. ; WIEGANDT, H ; GRÖNE, H J.: Novel class of glycosphingolipids involved in male fertility. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Jul, Nr. 29, S. 27310–27318
- [Sandvig u. van Deurs 2002] SANDVIG, K ; DEURS, B van: Membrane traffic exploited by protein toxins. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 18 (2002), S. 1–24
- [Sandvig u. a. 1994] SANDVIG, K ; RYD, M ; GARRED, O ; SCHWEDA, E ; HOLM, P K. ; DEURS, B van: Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga

- toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. In: *J Cell Biol* 126 (1994), Jul, Nr. 1, S. 53–64
- [Savoie u. a. 2000] SAVOIE, A ; LAVASTRE, V ; PELLETIER, M ; HAJTÓ, T ; HOSTANSKA, K ; GIRARD, D: Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. In: *J Leukoc Biol* 68 (2000), Dec, Nr. 6, S. 845–853
- [Schöffski u. a. 2004] SCHÖFFSKI, P ; RIGGERT, S ; FUMOLEAU, P ; CAMPONE, M ; BOLTE, O ; MARREAUD, S ; LACOMBE, D ; BARON, B ; HEROLD, M ; ZWIERZINA, H ; WILHELM-OGUNBIYI, K ; LENTZEN, H ; TWELVES, C: 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. In: *Ann Oncol* 15 (2004), Dec, Nr. 12, S. 1816–1824
- [Schwartz u. Summers 1980] SCHWARTZ, G A. ; SUMMERS, A: Gangliotetraosylceramide is a T cell differentiation antigen associated with natural cell-mediated cytotoxicity. In: *J Immunol* 124 (1980), Apr, Nr. 4, S. 1691–1694
- [Schweppe u. a. 2008] SCHWEPPE, C H. ; BIELASZEWSKA, M ; POHLENTZ, G ; FRIEDRICH, A W. ; BÜNTEMEYER, H ; SCHMIDT, M A. ; KIM, K S. ; PETER-KATALINIĆ, J ; KARCH, H ; MÜTHING, J: Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: relationship of heterogeneity in Gb3Cer/CD77 receptor expression with differential Shiga toxin 1 cytotoxicity. In: *Glycoconj J* 25 (2008), May, Nr. 4, S. 291–304
- [Simons u. Ikonen 1997] SIMONS, K ; IKONEN, E: Functional rafts in cell membranes. In: *Nature* 387 (1997), Jun, Nr. 6633, S. 569–572
- [Singer u. Nicolson 1972] SINGER, S J. ; NICOLSON, G L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. In: *Science* 175 (1972), Feb, Nr. 23, S. 720–731
- [Slovin u. a. 2005] SLOVIN, S F. ; KEDING, S J. ; RAGUPATHI, G: Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. In: *Immunol Cell Biol* 83 (2005), Aug, Nr. 4, S. 418–428
- [Soler u. a. 1998] SOLER, M H. ; STOEVA, S ; VOELTER, W: Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I. In: *Biochem Biophys Res Commun* 246 (1998), May, Nr. 3, S. 596–601
- [Sorice u. a. 2004] SORICE, M ; LONGO, A ; GAROFALO, T ; MATTEI, V ; MISASI, R ; PAVAN, A: Role of GM3-enriched microdomains in signal transduction regulation in T lymphocytes. In: *Glycoconj J* 20 (2004), Nr. 1, S. 63–70

- [Stauder u. Kreuser 2002] STAUDER, H ; KREUSER, E D.: Mistletoe extracts standardised in terms of mistletoe lectins (ML I) in oncology: current state of clinical research. In: *Onkologie* 25 (2002), Aug, Nr. 4, S. 374–380
- [Stein u. a. 1998] STEIN, G ; HENN, W ; LAUE, H von ; BERG, P: Modulation of the cellular and humoral immune responses of tumor patients by mistletoe therapy. In: *Eur J Med Res* 3 (1998), Apr, Nr. 4, S. 194–202
- [Stein u. Berg 1997] STEIN, G M. ; BERG, P A.: Mistletoe extract-induced effects on immunocompetent cells: *in vitro* studies. In: *Anticancer Drugs* 8 Suppl 1 (1997), Apr, S. 39–42
- [Steplewska-Mazur u. a. 2000] STEPLEWSKA-MAZUR, K ; GABRIEL, A ; ZAJECKI, W ; WYLEZOL, M ; GLÜCK, M: Breast cancer progression and expression of blood group-related tumor-associated antigens. In: *Hybridoma* 19 (2000), Apr, Nr. 2, S. 129–133
- [Stirpe u. Battelli 2006] STIRPE, F ; BATELLI, M G.: Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. In: *Cell Mol Life Sci* 63 (2006), Aug, Nr. 16, S. 1850–1866
- [Stirpe u. a. 1980] STIRPE, F ; LEGG, R F. ; ONYON, L J. ; ZISKA, P ; FRANZ, H: Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). In: *Biochem J* 190 (1980), Sep, Nr. 3, S. 843–845
- [Stirpe u. a. 1982] STIRPE, F ; SANDVIG, K ; OLSNES, S ; PIHL, A: Action of viscummin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. In: *J Biol Chem* 257 (1982), Nov, Nr. 22, S. 13271–13277
- [Sultana u. a. 2008] SULTANA, A ; GHANEH, P ; CUNNINGHAM, D ; STARLING, N ; NEOPTOLEMOS, J P. ; SMITH, C T.: Gemcitabine based combination chemotherapy in advanced pancreatic cancer-indirect comparison. In: *BMC Cancer* 8 (2008), S. 192–192
- [Takáts u. a. 2004] TAKÁTS, Z ; WISEMAN, J M. ; GOLOGAN, B ; COOKS, R G.: Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. In: *Science* 306 (2004), Oct, Nr. 5695, S. 471–473
- [Thies u. a. 2008] THIES, A ; DAUTEL, P ; MEYER, A ; PFÜLLER, U ; SCHUMACHER, U: Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. In: *Br J Cancer* 98 (2008), Jan, Nr. 1, S. 106–112
- [Urech u. a. 1995] URECH, K ; SCHALLER, G ; ZISKA, P ; GIANNATTASIO, M: Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumor cells in culture. In: *Phytother Res* 9 (1995), S. 49–55

- [Valentiner u. a. 2002] VALENTINER, U ; PFÜLLER, U ; BAUM, C ; SCHUMACHER, U: The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines *in vitro*. In: *Toxicology* 171 (2002), Feb, Nr. 2-3, S. 187–199
- [Varki u. a. 1999] VARKI, A ; CHRISPEELS, M ; CUMMINGS, R ; ESKO, J ; FREEZE, H ; HART, G ; HINDSGAUL, O ; LOWE, J ; MANZI, A ; MARTH, J ; PAULSON, J C. ; HALBEEK, H van: *Essentials of Glycobiology*. 1. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999
- [Weinberg 2007] WEINBERG, R A.: *The Biology of CANCER*. 1. New York : Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007
- [WHO] <http://www.who.int>
- [Wiegandt 1973] WIEGANDT, H: Gangliosides of extraneural organs. In: *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 354 (1973), Sep, Nr. 9, S. 1049–1056
- [Yamakawa 1996] YAMAKAWA, T: A reflection on the early history of glycosphingolipids. In: *Glycoconj J* 13 (1996), Apr, Nr. 2, S. 123–126
- [Yowler u. Schöngrund 2004] YOWLER, B C. ; SCHÖNGRUND, C L.: Botulinum neurotoxin A changes conformation upon binding to ganglioside GT1b. In: *Biochemistry* 43 (2004), Aug, Nr. 30, S. 9725–9731
- [Yunis u. a. 1975] YUNIS, A A. ; ARIMURA, G K. ; HAINES, H G. ; RATZAN, R J. ; GROSS, M A.: Characteristics of rat carcinoma in culture. In: *Cancer Res* 35 (1975), Feb, Nr. 2, S. 337–345

9 Abbildungsverzeichnis

2.1	Ribbon-Darstellung des ML-I	18
2.2	Ribbon-Darstellung Stx	20
2.3	Die vier häufigsten GSL-Serien	22
2.4	Neu5Ac und Neu5Gc	23
2.5	AMD2	26
2.6	Schematische Abbildung der Niere	28
2.7	Schema: DC-IR-MALDI-o-TOF MS	37
4.1	IR-MALDI-o-TOF MS	48
5.1	DC-Overlay-Assay von CD75s-Gangliosiden in Nierenkarzinomen	60
5.2	DC-Overlay-Assay von iso-CD75s-Gangliosiden in Nierenkarzinomen	62
5.3	DC-Overlay-Assay von nLc4Cer in Nierenkarzinomen	65
5.4	DC-Overlay-Assay von Gb3Cer/CD77 in Nierenkarzinomen	68
5.5	DC-Overlay-Assay von Gb4Cer in Nierenkarzinomen	70
5.6	Stx-vermittelter DC-Overlay-Assay von GSL der Globoserie in Nierenkarzi- nomen	72
5.7	IR-MALDI-o-TOF MS von CD75s-1-Gangliosiden	76
5.8	IR-MALDI-o-TOF-MS von iso-CD75s-Gangliosiden	78
5.9	IR-MALDI-o-TOF-MS von nLc4Cer	80
5.10	nanoESI Q-TOF MS von Gb3Cer	81
5.11	nanoESI Q-TOF MS2 von Gb3Cer	83
5.12	Immunfluoreszenz NZK	85
5.13	Ganglioside Boxplots	87
5.14	Globoserie Boxplots	89
5.15	Viabilität unter Einfluss von ML-I	92
5.16	Viabilität unter Einfluss von rViscumin	93
5.17	Vergleich der WST-1-Assays	95
5.18	Immunfluoreszenz Capan-2	97
5.19	Immunfluoreszenz HPAF-II	98
5.20	Immunfluoreszenz MIA PaCa-2	99

5.21	Immunfluoreszenz Panc-1	100
5.22	Immunfluoreszenz Pa-Tu-8902	101
5.23	Immunfluoreszenz Pa-Tu-8988S	102
5.24	Immunfluoreszenz Pa-Tu-8988T	103
5.25	Vergleich herkömmliche DC und AMD	106
5.26	(+)IR-MALDI-o-TOF MS von CD15-GSL: Banden 1 und 2	107
5.27	(+)IR-MALDI-o-TOF MS von CD15-GSL: Banden 3 und 4	108
5.28	(+)IR-MALDI-o-TOF MS von CD15-GSL: Banden 5 und 6	108
5.29	(+)IR-MALDI-o-TOF MS von CD15-GSL: Banden 7 und 8	109
5.30	(+)IR-MALDI-o-TOF MS von CD15-GSL: Banden 9 und 10	110
5.31	(+)IR-MALDI-o-TOF MS von CD15-GSL: Banden 11 und 12	110
5.32	(+)IR-MALDI-o-TOF MS von CD15-GSL: Banden 13 und 14	111

10 Tabellenverzeichnis

2.1	Tetrahexosylceramide	23
2.2	TNM-Klassifizierung: Nierenkarzinome	31
2.3	Stadiengruppierung	32
2.4	Überlebensrate	32
2.5	Grading	33
4.2	AMD-Programm	42
4.3	Primärantikörper	45
4.4	Sekundärantikörper	45
4.5	Lektine und Toxine	46
4.6	Pankreaskarzinomzelllinien	51
4.7	Pathologische Daten der Nierengewebe	57
5.1	GSL-Expression von CD75s	61
5.2	GSL-Expression von iso-CD75s	63
5.3	GSL-Expression von nLc4Cer	66
5.4	AK-vermittelte Expression von Gb3Cer	69
5.5	Antikörper-vermittelte Expression von Gb4Cer	71
5.6	Stx-vermittelte Expressionsanalyse von Gb3Cer	73
5.7	IR-MALDI-o-TOF MS von CD75s-1-Gangliosiden	77
5.8	IR-MALDI-o-TOF MS von iso-CD75s-Gangliosiden	79
5.9	nanoESI Q-TOF MS von Gb3Cer	82
5.10	nanoESI Q-TOF MS2: Fragmentionen von Gb3Cer	84
5.11	LD ₅₀ -Werte ML-I	93
5.12	LD ₅₀ -Werte rViscumin	94
5.13	(+)IR-MALDI-o-TOF MS von CD15-GSL	113
11.1	Chemikalien	151
11.2	Verbrauchsmaterialien	152
11.3	Geräte	153
11.4	Software	154

11 Anhänge

11.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien:

Tabelle 11.1: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Strukturformel/ Synonym	Hersteller
Ammoniumacetat	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	BSA (Fraktion V, pH 7, lyophil.)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid	CaCl_2	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Chloroform (Trichlormethan)	CHCl_3	Merck KGaA, Darmstadt
DAPI	4'-6-Diamidin-2'-phenylindol-dichlorid	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
di-Natriumphosphat	Na_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Lonza, Verviers, Belgien
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Ethanol	EtOH	Apotheke, Universitätsklinikum Münster
FCS Gold	Fötale Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
Fischhautgelatine		Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Glycin		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glyzerin (Glycerol)		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

<i>n</i> -Hexan		Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Riedel-de Häen AG, Seelze
Kaliumhydroxid	KOH	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin BioWhittaker		Cambrex, Verviers, Belgien
Magnesiumchlorid hexahydrat	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	MeOH	Merck KGaA, Darmstadt
Mounting Medium		Dianova, Hamburg
Natriumazid	NaN ₃	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumchlorid	NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Orcin	3,5-Dihydroxytoluol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBS Biowhittaker		Lonza, Verviers, Belgien
Phosphopentoxid	P ₂ O ₅	Merck KGaA, Darmstadt
Plexigum	Polyisobutylmethacrylat	Röhm, Darmstadt
Salzsäure (Hydrogenchlorid)	HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	Riedel-de Häen AG, Seelze
Triton X-100		SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween 21		ICI Surfactants, Wilton, UK
Wasser (Milli-Q)	H ₂ O	Millipore, Billerica, MA, USA
Zinkchlorid	ZnCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 11.2: Liste der Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Borsilikat Glaskapillare	Hilgenberg, Masfeld
Dialyseschlauch (Size 5), Cut-off 12 - 16kDa	Medicell International, London, UK
HPTLC-Platten, Silikagel 60	Merck KGaA, Darmstadt
Wägebapier	neoLab, Heidelberg

11.2 Geräte:

Tabelle 11.3: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenwaage	PT 310	Sartorius, Göttingen
AxioCAM MRM		Zeiss, Jena
Autoklav	Varioklav	Thermo Scientific, Rohrbach
Chromatographiekammer		CAMAG, Muttenz, Schweiz
ER: YAG Laser Bioscope		BiOptics Laser Systems, Berlin
Flachbettscanner		Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager A.1	Zeiss, Jena
Fluoreszenzfilter	Set 17	Zeiss, Jena
Fluoreszenzfilter	Set 21HE	Zeiss, Jena
Heizblock, Dri-Block	DB-3	Techne, Staffordshire, UK
Heizplatte		Heidolph, Schwalbach
Homogenisator	Polytron PT 1200	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Homogenisatorspitze	PT-DA 1205/2	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Homogenisatorspitze	PT-DA 1207/2	Kinematica AG, Littau, Schweiz
HPTLC-Heizplatte	HPTLC Plate-HeaterIII	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Inkubator		Sanyo, Sakata, Japan
IR-MALDI-o-TOF MS		MDS Sciex, Concord, Kanada
Kolbenhubpipette		Eppendorf, Hamburg
Kryo-Einfriergerät	„Mr. Frosty“	Thermo Scientific, Rohrbach
Kryotank	Euro Cyl 230/4	Chart, Solingen
Lichtmikroskop	Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Membranpumpe		VWR International, West-Chester, USA
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Opsys MR	Dynex, Berlin
NanoESI Q-TOF MS		Micromass, Manchestre, UK
Nanospray Manipulator		Micromass, Manchester, UK
Neubauer Zählkammer		Laboroptik, Friedrichsdorf
Objektiv	N-Achroplan 100x	Zeiss, Jena
Objektiv	EC Plan-Neofluar 40x	Zeiss, Jena

pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin
Reinraumwerkbank	SterilGard Class II, Type A/B3	The Baker Company, Sanford, MA, USA
Rotationsverdampfer	Laborata 4001 efficient	Heidolph, Schwabach
Rotationsverdampfer	VV 2001	Heidolph, Schwabach
Schüttelgerät	Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Schüttelgerät	Vortex Genie 2	Bender & Hohlbein AG, Zürich, Schweiz
Trockenschrank		Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	5510	Branson, Dietzenbach
Wasseraufbereitungssystem	Synergy UV	Millipore Corporation, Billerica, USA
Wasserbad	SWB 25	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge	Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

11.3 Software:

Tabelle 11.4: Liste der verwendeten Software

Software	Hersteller
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MassLynx	Waters, Milford, MA, USA
MoverZ	Genomic Solutions, Ann Arbor, USA
Origin	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Revelation Quicklink	Dynex Technologies, Berlin
Tina 2.09D	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt

12 Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname:	Marcel Hülsewig
Geburtsdatum:	18. Januar 1978
Geburtsort:	Bielefeld
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Vater:	Adolf Hülsewig, Job-Vorbereiter
Mutter:	Doris Hülsewig, geb. Krüger, Altenpflegehelferin

Schulbildung

09/1984 - 07/1988	Grundschule Stiftsschule, Bielefeld
09/1988 - 06/1994	Max-Planck-Gymnasium, Bielefeld
08/1994 - 06/1995	McAllen Memorial Highschool, McAllen, TX, USA Abschluß: High School Diplom (h.c.)
09/1995 - 06/1997	Max-Planck-Gymnasium, Bielefeld Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

10/1997 - 10/1998	Franziskus-Hospital Bielefeld
-------------------	-------------------------------

Beruflicher Werdegang

- 11/1998 - 09/2000 Netzwerktechniker Sparkasse Bielefeld
- 10/2000 - 12/2005 Studium der molekularen Biotechnologie an der Universität Bielefeld
Thema der Diplomarbeit: Molekulargenetische und strukturelle Charakterisierung von Tumor-assoziierten Glykosphingolipiden in Nierenkarzinomen und Patientenseren
- 01/2005 - 12/2009 Externe Promotion der technischen Fakultät der Universität Bielefeld am Institut für medizinische Physik und Biophysik und am Institut für Hygiene der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Thema: Tumorassoziierte Glykosphingolipide in Nieren- und Pankreaskarzinomen: Zielstrukturen für Adjuvanttherapien mit Lektinen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe.
Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich
gemacht.

Dipl.-Biotech. Marcel Hülsewig