

**Untersuchungen zur Sensitivität von
humanen Zellen mit unterschiedlichem
Gehalt an Shiga Toxin-Rezeptoren
gegenüber Shiga Toxin 2**

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

genehmigte
Dissertation

von
Dipl. Biotech. Wiebke Storck
aus Bielefeld

2012

Dekan: Prof. Dr. Jens Stoye

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Noll

2. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Müthing

INHALTSVERZEICHNIS

VORBEMERKUNGEN	IV
DANKSAGUNG	V
VERÖFFENTLICHUNGEN	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Glykosphingolipide.....	2
1.1.1 Aufbau und Struktur	2
1.1.2 Biosynthese	4
1.1.3 Membranorganisation und biologische Funktionen	5
1.2 Shiga Toxine	7
1.3 Pankreaskarzinomzelllinien	9
1.4 Massenspektrometrie	12
1.4.1 IR-MALDI-o-TOF MS	13
1.4.2 nanoESI-Q-TOF MS	15
1.4.3 TOF-SIMS.....	17
2. ZIELSETZUNG.....	20
3. MATERIAL UND METHODEN.....	22
3.1 Chemikalien	22
3.2 Pankreaskarzinomzelllinien	22
3.3 Zellkultivierung	25
3.3.1 Kultivierungsbedingungen	25
3.3.2 Passagierung von Zellen.....	26
3.3.3 Zellkonzentrationsbestimmung	27
3.3.4 Kryokonservierung von Zellen.....	27
3.3.5 Zytotoxizitäts-Assay.....	28
3.4 Nachweis von Glykosyltransferasen mittels Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion	29
3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	30
3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	31
3.4.3 Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion.....	31
3.4.4 Agarosegelelektrophorese	34
3.4.5 DNA-Kontaminationskontrolle	35
3.5 Shiga Toxin 2, GSL- und Phospholipid-Referenzen	36
3.5.1 Shiga Toxin 2	36
3.5.2 GSL- und Phospholipid-Referenzmischungen.....	36

3.6 Glykosphingolipidextraktion	38
3.6.1 Reinigung von Glasgefäßen	38
3.6.2 Lipidextraktion aus Zellkulturen	38
3.6.3 Alkalische Hydrolyse und Dialyse	39
3.6.4 Anionenaustauschchromatographie.....	39
3.7 Glykosphingolipidanalytik.....	40
3.7.1 Hochleistungsdünnschichtchromatographie.....	40
3.7.2 Orcinolfärbung	41
3.7.3 Overlay-Assay	41
3.7.4 Phospholipidnachweis.....	45
3.7.5 Densitometrische Quantifizierung und Dokumentation.....	46
3.8 Statistische Auswertung.....	47
3.9 Massenspektrometrische Verfahren.....	48
3.9.1 IR-MALDI-o-TOF Massenspektrometrie	48
3.9.2 nanoESI-Q-TOF Massenspektrometrie	49
3.9.3 Sekundärionen Massenspektrometrie.....	52
4. ERGEBNISSE.....	54
4.1 Sensitivität von Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Shiga Toxin 2.....	54
4.2 Nachweis der Expression der Glykosyltransferasen α 1,4-GalT und β 1,3-GalNAcT sowie der Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer in Pankreaskarzinomzelllinien	62
4.2.1 Expression der Glykokosyltransferasen α 1,4-GalT und β 1,3-GalNAcT	62
4.2.2 Orcinolfärbung der neutralen GSL aus humanen Pankreaskarzinomzelllinien.....	67
4.2.3 Immundetektion von Gb3Cer und Gb4Cer aus humanen Pankreaskarzinomzelllinien.....	70
4.3 Statistische Auswertung.....	83
4.4 Strukturelle Charakterisierung der Stx-Rezeptoren aus humanen Pankreaskarzinomzelllinien	85
4.4.1 Identifizierung von Globotriaosyl- und Globotetraosylceramid mittels IR-MALDI-o-TOF MS	85
4.4.2 Strukturaufklärung von Globotriaosyl- und Globotetraosylceramid mittels nanoESI-Q-TOF MS	94
4.5 Phospholipidbestimmung aus Gesamtlipidextrakten humaner Pankreaskarzinomzelllinien	101
4.6 Untersuchung der Phosphatidylcholin- und Sphingomyelinverteilung mittels TOF-SIMS	103

5. DISKUSSION.....	106
5.1 Sensitivitäten humaner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Stx2	106
5.2 Stx-Rezeptoren und Glykosyltransferasen in humanen Pankreaskarzinom- zelllinien.....	107
5.2.1 Gb3Cer-Gehalt und Expression der α 1,4-Galaktosyltransferase	107
5.2.2 Gb4Cer-Gehalt und Expression der β 1,3-N-Acetylgalaktosaminyl- transferase.....	108
5.2.3 Funktionalität von verschiedenen Gb3Cer- und Gb4Cer-Lipoformen .	110
5.3 Statistische Analyse	113
5.4 Shiga Toxine als potentielltes Tumor-Therapeutika.....	114
5.5 TOF-SIMS imaging und lipid rafts.....	116
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	118
7. LITERATURVERZEICHNIS	121
8. ANHANG	131
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	131
8.2 Chemikalien und Reagenzien	136
8.3 Geräte.....	139

VORBEMERKUNGEN

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine externe Doktorarbeit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld. Sie wurde im Zeitraum vom 01. März 2009 bis zum 31. Oktober 2012 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. T. Noll und Herrn Prof. Dr. J. Müthing am Institut für Hygiene (Leitung: Herr Prof. Dr. Dr. h. c. H. Karch) der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster angefertigt. Die Finanzierung der Arbeit erfolgte durch die Deutsche Krebshilfe (DKH, Projekt 108502), das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung Münster (IZKF, Projekt Müth2/028/10) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Projekt MU845/4-2).

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich vielmals bei den Menschen bedanken, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Helge Karch dafür, dass ich die Experimente in seinen Laboratorien des Instituts für Hygiene der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster durchführen durfte.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Johannes Müthing (Institut für Hygiene der WWU Münster) gebührt in vielerlei Hinsicht mein besonderer Dank. Ich danke ihm vielmals für die Vergabe dieses fesselnden Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und seinen fachlichen Rat bei der Erstellung von Veröffentlichungen. Auch für die Bereitstellung der für die immunochemischen Analysen benötigten Arbeitsmaterialien bin ich ihm dankbar.

Herrn Prof. Dr. Thomas Noll danke ich für die Betreuung seitens der Universität Bielefeld und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg Haier (Zentrum der Onkologie des Universitätsklinikums Münster) für die Bereitstellung der Pankreaskarzinomzelllinien.

Bei Frau PD Dr. Martina Bielaszewska (Institut für Hygiene der WWU Münster) möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir das aufgereinigte Shiga Toxin 2 zur Verfügung gestellt hat.

Frau Dr. Iris Meisen (Institut für Hygiene der WWU Münster) gilt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der massenspektrometrischen Analysen sowie für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke Herrn PD Dr. Klaus Dreisewerd (Institut für Hygiene der WWU Münster) für die Bereitstellung des IR-MALDI-o-TOF Massenspektrometers und Herrn Dr. Michael Mormann (Institut für Hygiene der WWU Münster) für die Möglichkeit, das nanoESI-Q-TOF Massenspektrometer nutzen zu dürfen.

Bei Frau Kathrin Gianmoena möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Zytotoxizitäts-Assays und der RT-PCR bedanken.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Arlinghaus (Physikalisches Institut der WWU Münster), Herrn Dipl. Phys. Felix Draude und Herrn Dipl. Phys. Martin Körsgen danke ich für die Einführung in die TOF-SIMS. Außerdem danke ich Herrn Dipl. Phys. Felix Draude für die Durchführung der TOF-SIMS-Messungen und für das Korrekturlesen der entsprechenden Abschnitte dieser Arbeit.

Für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Lukas, Jens und Alex. Ich danke Jule und Prasath für die Motivation während der gemeinsamen Schreibphase.

Allen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Hygiene, im Besonderen Lisa, Viktor, Jens und Josefine, danke ich für die einmalige Arbeitsatmosphäre und die fantastische Zeit, die ich auch weit über den kollegialen Rahmen hinaus mit euch verbracht habe.

Meine Bielefelder-Mädels und Münsteraner-Capoeiristas dürfen natürlich nicht vergessen werden. Ich danke euch allen für eure bedingungslose Unterstützung und die Freude und Leichtigkeit, die ihr in mein Leben bringt.

Meine immerwährende Dankbarkeit gebührt meiner Familie. Erst durch euren unentwegten Rückhalt und euren Zuspruch konnte ich dies alles erreichen.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen

Storck W, Meisen I, Gianmoena K, Pläger I, Kouzel IU, Bielaszewska M, Haier J, Mormann M, Humpf H-U, Karch H and Müthing J
Shiga toxin glycosphingolipid receptor expression and toxin susceptibility of human pancreatic ductal adenocarcinomas of differing origin and differentiation
Biol Chem. 2012 Aug;393(8):785-99

Meuth SG, Göbel K, Kanyshkova T, Ehling P, Ritter MA, Schwindt W, Bielaszewska M, Lebiez P, Coulon P, Herrmann AM, Storck W, Müthing J, Pavenstädt H, Kuhlmann T, Karch H, Peters G, Budde T, Wiendl H and Pape HC
Thalamic Involvement in Patients with Neurologic Impairment due to Shiga toxin 2
Ann Neurol. (in press)

Kouzel IU, Pohlentz G, Storck W, Hoffmann P, Bielaszewska M, Bauwens A, Cichon C, Schmidt MA, Mormann M, Karch H and Müthing J
Association of Shiga toxin glycosphingolipid receptors with membrane microdomains of toxin-sensitive lymphoid and myeloid cells
J Lipid Res. (in revision)

Storck W, Spieker F, Stöppler S, Haier J and Müthing J
Impact of mistletoe lectin on CD75s ganglioside-positive and -negative human pancreatic adenocarcinoma cell lines in nude mice
(in preparation)

Draude F, Pelster A, Körsgen M, Storck W, Arlinghaus HF and Müthing J
Improvement in ion imaging of TOF-SIMS
(in preparation)

Vorträge

Storck W, Distler U, Haier J, Dreisewerd K, Friedrich AW, Karch H and Müthing J
Shiga toxin receptor Gb3Cer in human pancreatic cancer
61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 20.-23.09.2009 in Göttingen

Kongressbeiträge

Storck W, Distler U, Haier J, Dreisewerd K, Friedrich AW, Karch H and Müthing J
Shiga toxin receptor Gb3Cer in human pancreatic cancer
61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 20.-23.09.2009 in Göttingen

Storck W, Hoffmann P, Haier J, Mormann M, Karch H and Müthing J
A mass spectrometry study on the expression of Shiga toxin receptors in human pancreatic cancer cell lines
62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 28.-31.03.2010 in Hannover

Storck W, Hoffmann P, Brandt N, Haier J, Mormann M, Karch H und Müthing J
Expression von Shiga Toxin-Rezeptoren in humanen Karzinomzelllinien der Bauchspeicheldrüse
3. EHEC-Workshop, 16.-18.06.2010 in Wildbad Kreuth

Storck W, Gianmoena K, Meisen I, Haier J, Mormann M, Humpf H-U, Karch H and Müthing J
Unravelling the lipofrom heterogeneity of the Shiga toxin receptor Gb3Cer in human pancreatic cancer cell lines by means of nanoESI-Q-TOF MS
21. Joint Glycobiology Meeting, 7.-9.11.2010 in Ghent

Kouzel IU, Betz J, Bielaszewska M, Storck W, Friedrich AW, Karch H and Müthing J
Structural characterization and subcellular distribution of Shiga toxin receptors in leukocyte-derived cell lines
21. Joint Glycobiology Meeting, 7.-9.11.2010 in Ghent

Storck W, Gianmoena K, Meisen I, Haier J, Mormann M, Humpf H-U, Dreisewerd K, Karch H and Müthing J
IR-MALDI-o-TOF and nanoESI-Q-TOF MS as tools for the investigation of Shiga toxin receptor Gb3Cer in human pancreatic carcinoma cell lines
44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 27.02.-2.03.2011 in Dortmund

Kouzel IU, Betz J, Bielaszewska M, Storck W, Cichon C, Schmidt MA, Karch H and Müthing J
Glycosphingolipid Shiga toxin receptors in lymphoid and myeloid cell lines: subcellular receptor distribution and expression profiles of glycosyltransferases related to their biosynthesis pathway
63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 25.-28.09.2011 in Essen

Storck W, Meisen I, Gianmoena K, Mormann M, Humpf H-U, Haier J, Karch H and Müthing J

Shiga toxin-sensitive pancreatic cancer cells: glycosphingolipid receptors as potential targets for tumor therapy?

8. Fabisch-Symposium: 3. Targeted Tumor Therapies, 21.- 23.03.2012 in Berlin

Kouzel IU, Betz J, Bielaszewska M, Storck W, Cichon C, Schmidt MA, Karch H and Müthing J

Subcellular distribution of Shiga toxin receptors and expression profiles of related glycosyltransferases in lymphoid and myeloid cell lines

8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2012), 6.-9.05.2012 in Amsterdam

Kouzel IU, Betz J, Bielaszewska M, Storck W, Cichon C, Schmidt MA, Karch H and Müthing J

Shiga toxin receptors in leukocyte-derived cell lines: subcellular distribution of globoseries neutral glycosphingolipids and expression analysis of related glycosyltransferases

21st International Symposium on Glycoconjugates (Glyco21), 21.-26.08.2011 in Wien

Draude F, Galla S, Pelster A, Körsgen M, Tentschert J, Jungnickel H, Luch A, Leffers L, Schwerdtle T, Storck W, Müthing J and Arlinghaus HF

TOF-SIMS and laser-SNMSiImaging of lipids and trace elements in various cells with sub-micrometer resolution

SIMS Europe 2012, 9.-11.09.2012 in Münster

1. EINLEITUNG

Shiga Toxine (Stx) gehören zur Familie der AB₅-Toxine und besitzen hohe Zytotoxizität durch ihre Fähigkeit, nach Aufnahme in die Zelle die Ribosomen zu inaktivieren und damit Zellen letal zu schädigen. Stx-produzierende *Escherichia coli* (STEC), die blutige Durchfälle, hämorrhagische Kolitis und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen, werden als enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) bezeichnet. Das HUS ist die schwerste Form einer EHEC-Infektion, die zu Nierenversagen, Hirnschädigungen und schlimmstenfalls zum Tod führen kann. Die Schädigung der Nieren und des Gehirns ist auf die präferentielle Zerstörung renaler und cerebraler Endothelzellen zurückzuführen. Das Holotoxin bindet über das B-Pentamer mit hoher Affinität an das neutrale Glykosphingolipid (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und mit niedriger Affinität an Globotetraosylceramid (Gb4Cer), während die A-Untereinheit als *N*-Glykosidase fungiert und die eigentliche zytotoxische Wirkung ausübt.

Die Massenspektrometrie stellt die am besten geeignete Methode zur strukturellen Charakterisierung von GSL dar. Mittels IR-MALDI-o-TOF MS können GSL einfach und schnell nachgewiesen und dann mittels nanoESI-Q-TOF MS durch CID-Experimente verifiziert werden. Stx-Rezeptoren finden sich im menschlichen Organismus vorrangig auf den die Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen der Niere und des Gehirns, was das Krankheitsbild des HUS erklärt. Gb3Cer und Gb4Cer wurden aber auch in erhöhten Mengen bei zahlreichen humanen Tumoren, wie z. B. Pankreaskarzinomen, nachgewiesen, weshalb Stx eventuell zukünftig für Tumorthérapien eingesetzt werden könnten. Außerdem könnten im Falle der Expression von Stx-Rezeptoren humane Pankreaskarzinomzelllinien als Modellsysteme dazu dienen, Zusammenhänge zwischen der Rezeptor-Expression und der zytotoxischen Wirkung von Stx auf humane Zellen aufzuklären zu helfen.

1.1 Glykosphingolipide

1.1.1 Aufbau und Struktur

Als Bestandteile von biologischen Membranen tierischer Zellen sind Glykosphingolipide (GSL) vorwiegend auf der äußeren Seite der Plasmamembran lokalisiert, liegen aber auch in Membranen verschiedener anderer Zellorganellen vor (Hakomori, 1990). Als Zelloberflächenmoleküle nehmen sie eine funktionale Rolle bei Adhäsionsprozessen, bei der Zell-Zell-Erkennung und bei Signaltransduktionsprozessen ein (Hakomori, 2000).

GSL bestehen aus einem hydrophilen Oligosaccharid und einer hydrophoben Lipidkomponente, dem Ceramid, und erhalten so ihren amphipathischen Charakter. Das Ceramid ist aus einem Aminoalkohol und einer Fettsäure zusammengesetzt, die über eine Amidbindung zwischen der Aminogruppe am C2-Atom des Aminoalkohols und der Carboxylgruppe der Fettsäure miteinander verknüpft sind (Abbildung 1). Sowohl der Aminoalkohol als auch die Fettsäure zeigen Variationen hinsichtlich der Länge ihrer Kohlenwasserstoffketten und der Anzahl der Doppelbindungen, so dass eine hohe Diversität an Ceramiden existiert. Von Säugerzellen werden vorwiegend das Sphingosin (2-Amino-4-octadecen-1,3-diol) mit 18 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung zwischen dem C4- und dem C5-Atom (d18:1) und Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C14 und C26 synthetisiert. Der proximale Zucker des Oligosaccharids, bei Säugerzellen üblicherweise Glukose, ist glykosidisch an die primäre Hydroxylgruppe des Ceramids gebunden (Fraser-Reid, 2001). Der Ceramidteil des GSL hat unter anderem Einfluss auf die Präsentation des Oligosaccharids auf der Zellmembran (Pascher, 1976) und folglich auch auf die Antigenität, Immunogenität (Yoshino *et al.*, 1982; Kannagi *et al.*, 1983) und Rezeptorfunktion von GSL (Boyd *et al.*, 1994; Kiarash *et al.*, 1994).

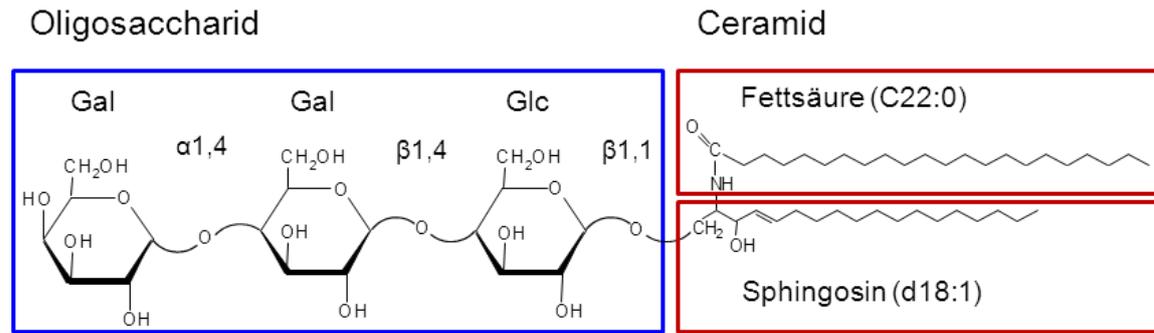


Abbildung 1: Aufbau und Struktur der GSL am Beispiel von Globotriaosylceramid (d18:1, C22:0).

GSL sind aus einem hydrophilen Oligosaccharid und einem hydrophoben Ceramid, bestehend aus einem Aminoalkohol (Sphingosin) und einer Fettsäure, zusammengesetzt.

Anhand ihrer Oligosaccharidstruktur erfolgt die Einteilung der GSL in drei Hauptklassen: neutrale GSL, negativ geladene Sialinsäure-haltige GSL (Ganglioside) und negativ geladene Sulfat-haltige GSL (Sulfatide). Die Saccharide, die am häufigsten in GSL auftreten, sind die neutralen Monosaccharide Glukose (Glc), Galaktose (Gal), *N*-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc), *N*-Acetyl-Galaktosamin (GalNAc) und Fukose (Fuc). Ganglioside enthalten zusätzlich mindestens eine Sialinsäure, meistens 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) und 5-*N*-Glykoly-Neuraminsäure (Neu5Gc), wobei in humanem Gewebe ausschließlich Neu5Ac vorkommt. Neben der unterschiedlichen Sequenz verschiedener Monosaccharide erhöhen das Vorliegen der Zucker in α - oder β -Konfiguration am anomeren C-Atom, und die Art der Verknüpfung der Monosaccharide (z. B. 1,3 oder 1,4) die Oligosaccharid-Vielfalt.

Die meisten neutralen GSL können, basierend auf der Sequenz und Verknüpfung ihrer Saccharide, einer der vier Strukturfamilien Globo- (Gb), Ganglio- (Gg), Lakto- (Lc) und Neolakto- (nLc) Serie zugeordnet werden. Als gemeinsame Grundstruktur dient das Laktosylceramid (LacCer, Lc2Cer). Die Nomenklatur folgt dabei den Richtlinien der *International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry* (IUPAC-IUB, *Joint Commission on Biochemical Nomenclature*) (Chester, 1998). In Abbildung 2 sind die Grundstrukturen von GSL der vier verschiedenen Serien aufgeführt.

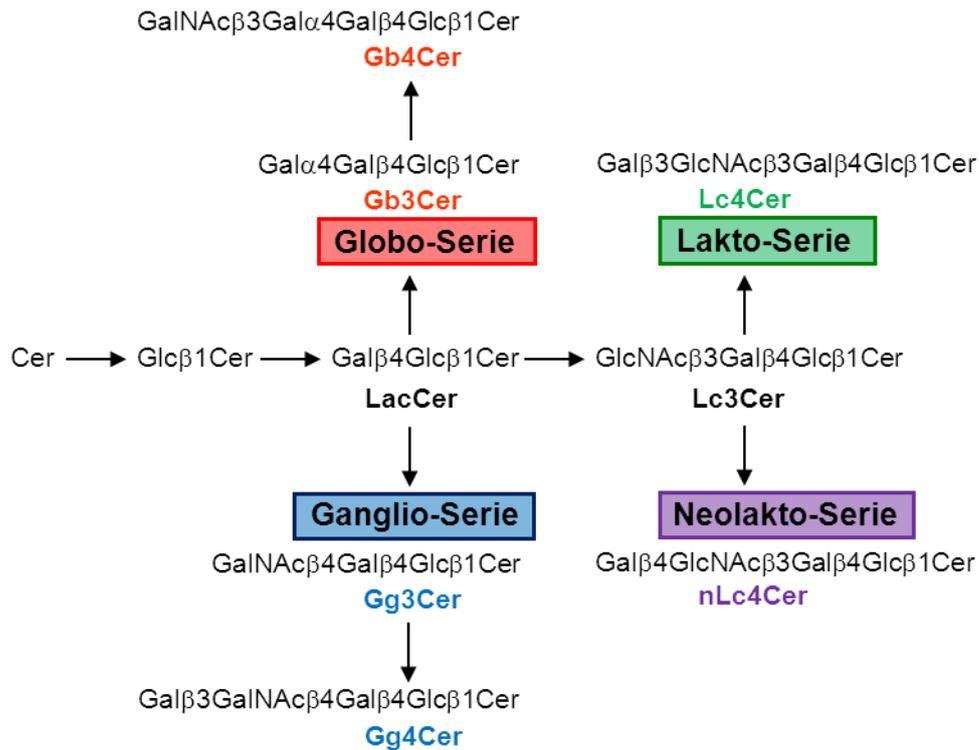


Abbildung 2: Biosynthese neutraler GSL der Globo-, Ganglio-, Lakto- und Neolakto-Serie sowie deren Bezeichnungen nach der IUPAC-IUB (modifiziert nach Meisen *et al.*, 2011).

1.1.2 Biosynthese

Die Biosynthese der GSL beginnt auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) durch die Synthese des Ceramids aus Acyl-CoA und Sphingosin. Während des intrazellulären Transports vom ER zum Golgi-Apparat werden komplexe GSL gebildet, indem spezifische Glykosyltransferasen Monosaccharide sequenziell auf das Ceramid bzw. den endständigen Zucker der wachsenden Zuckerkette übertragen. Abschließend werden die GSL Vesikel-vermittelt an die Zelloberfläche transportiert (Sandhoff & Kolter, 2003).

Abbildung 3 zeigt die Biosynthese von neutralen GSL der Globo-Serie. Nach Bindung von Glukose an das Ceramid (Glukosylceramid, GlcCer) erfolgt die Synthese von Laktosylceramid (LacCer, Lc2Cer) durch die $\beta 1,4$ -Galaktosyltransferase ($\beta 1,4$ -GalT). Die Verlängerung des Oligosaccharids zu Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und

Globotetraosylceramid (Gb4Cer) wird durch die Transferasen α 1,4-Galaktosyltransferase (α 1,4-GalT) bzw. β 1,3-*N*-Acetylgalaktosaminyltransferase (β 1,3-GalNAcT) katalysiert.

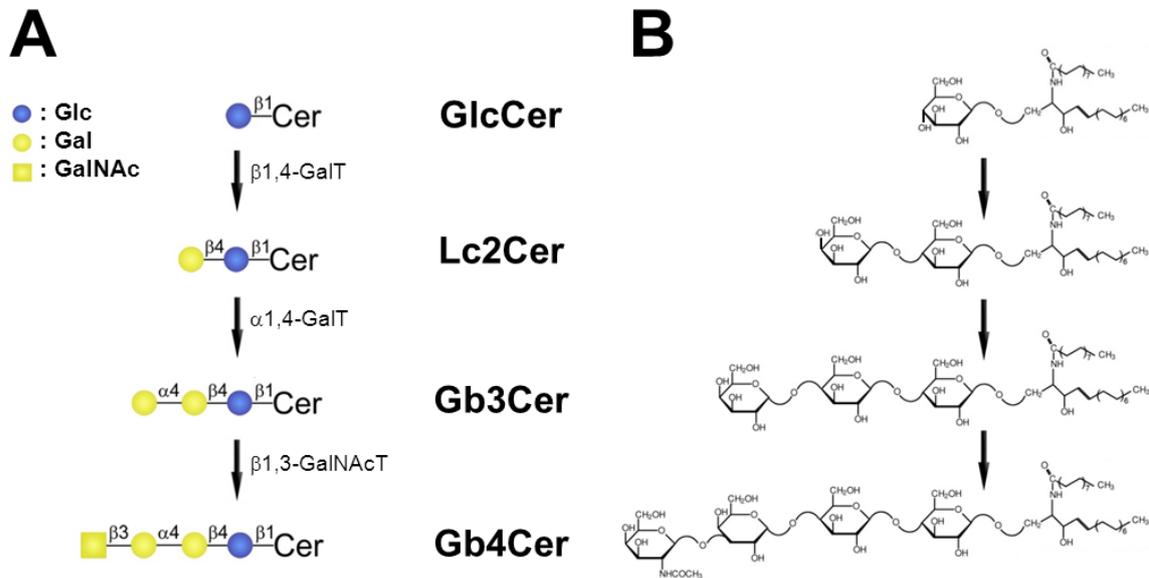


Abbildung 3: Biosynthese von neutralen GSL der Globo-Serie und zugehörige Strukturen. (A) Die Glykosyltransferase β 1,4-Galaktosyltransferase (β 1,4-GalT) überträgt eine Galaktose (Gal) auf Glukosylceramid (GlcCer), wodurch Laktosylceramid (Lc2Cer) entsteht. Lc2Cer wird durch die Aktivität der α 1,4-Galaktosyltransferase (α 1,4-GalT) um eine weitere Gal verlängert, so dass Globotriaosylceramid (Gb3Cer) gebildet wird. Gb3Cer wird dann weiter durch die β 1,3-*N*-Acetylgalaktosaminyltransferase (β 1,3-GalNAcT) mit einem *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc) verlängert, wodurch Globotetraosylceramid (Gb4Cer) gebildet wird. (B) Strukturen von neutralen GSL der Globo-Serie in der Haworth-Projektion mit konstantem Sphingosin (d18:1) und C16:0-Fettsäure (modifiziert nach Müthing *et al.*, 2012).

1.1.3 Membranorganisation und biologische Funktionen

Biologische Membranen sind aus einer Phospholipiddoppelschicht aufgebaut, die eine Abgrenzung zwischen dem intra- und extrazellulären Raum bildet. Die Organisation von GSL in der Zellmembran erfolgt in sogenannten Mikrodomänen, den *lipid rafts* (engl. für „Lipidflöße“), die sich durch eine Anreicherung von GSL, Cholesterol, Sphingolipiden, Sphingomyelin und GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-verankerten

sowie Transmembranproteinen auszeichnen (Simons & Sampaio, 2011). Das Cholesterol dient dabei der Auffüllung von Zwischenräumen zwischen den Acylresten der Lipidbestandteile. GSL sind in der Lage, sowohl mit Proteinen als auch mit anderen Glykanen in Wechselwirkung zu treten. Über die *cis*-Interaktion, der Wechselwirkung innerhalb einer Membran, werden die Mikrodomänen, bestehend aus GSL, Lipiden und Proteinen, ausgebildet. Die *trans*-Interaktion, die Wechselwirkung von GSL mit Proteinen oder Glykanen einer „gegenüber liegenden“ Membran, vermittelt die Zell-Zell-Erkennung, Zelladhäsion und Signaltransduktion (Hakomori, 2000). Die GSL-Exposition in *lipid rafts* wird dabei als Voraussetzung für eine hohe Bindungsaktivität zwischen dem Oligosaccharid des GSL und seinem Liganden angesehen (Lundquist & Toone, 2002).

Aufgrund ihrer Lokalisation in der äußeren Hälfte der Plasmamembran stellen GSL „ideale“ Rezeptorstrukturen für Pathogene dar und spielen damit bei Infektionsprozessen eine entscheidende Rolle (Lochnit *et al.*, 2001). Beispielsweise nutzen Inflenzaviren Ganglioside als Rezeptoren (Müthing *et al.*, 1993; Suzuki, 1994; Miller-Podraza *et al.*, 2000). Auch die Adhäsion von Bakterien an Wirtsepithelzellen wird häufig über GSL-Rezeptoren vermittelt und ermöglicht so die Kolonisation und Infektion des Wirtes (Karlsson, 1989). So können beispielsweise verschiedene Stämme von *Escherichia coli* (Roberts *et al.*, 1994; Stroud *et al.*, 1998) und *Helicobacter pylori* (Godaly *et al.*, 1998; Antão *et al.*, 2009) über GSL mit Wirtszellen interagieren. Zahlreiche bakterielle Toxine binden beispielsweise ebenfalls an GSL und werden anschließend über Rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert. So erkennt z. B. das vakuolisierende Zytotoxin VacA aus *Helicobacter pylori* die humanen gastrischen GSL Galaktosylceramid, Galabiosylceramid (Roche *et al.*, 2007), während das Botulinum Neurotoxin über Ganglioside der Gg1b-Serie, am effektivsten über GT1b (IV³Neu5Ac,II³(Neu5Ac)₂-Gg4Cer), (Yowler & Schengrund, 2004) und das Cholera Toxin über das Gangliosid GM1 (II³Neu5Ac-Gg4Cer) an humane Epithelzellen adhärirt (Fantini *et al.*, 2000). Weiterhin ist bekannt, dass das neutrale GSL Gb3Cer den Rezeptor für das Shiga Toxin darstellt (Lochnit *et al.*, 2001; Müthing *et al.*, 2009 und zitierte Referenzen).

1.2 Shiga Toxine

Das Shiga Toxin (Stx) wurde erstmalig für den Erreger der Bakterienruhr, *Shigella dysenteriae*, beschrieben. In der 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde jedoch gezeigt, dass dieses Toxin auch von einigen Stämmen enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) produziert wird (Konowalchuk *et al.*, 1977; O'Brien *et al.*, 1983) und deren bedeutendsten Virulenzfaktor darstellt. Stx-produzierende *E. coli*-Stämme (STEC) werden meist über kontaminierte Lebensmittel oder infizierte Tiere, die als Reservoir der STEC dienen, aufgenommen und können beim Wirt Diarrhö, hämorrhagische Kolitis sowie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auslösen (Karmali, 1989; Karch *et al.*, 2005). Schwere Verläufe einer STEC-Infektion können ferner mit neurologischen Symptomen einhergehen (Nathanson *et al.*, 2010). Stx werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, Stx1 und Stx2. Während das *stx*-Gen bei *S. dysenteriae* im Genom lokalisiert ist, werden die Gene für Stx1 und Stx2 bei STEC über zwei unterschiedliche Phagen kodiert, die in dem Genom inseriert vorliegen (O'Brien *et al.*, 1984; Strockbine *et al.*, 1986). Innerhalb beider Hauptgruppen werden zudem verschiedene Subtypen klassifiziert (Johannes & Römer, 2010 und zitierte Referenzen; Scheutz *et al.*, 2012). Stx1a, Stx2a und weitere Subtypen weisen eine unterschiedliche Assoziation zum Schweregrad der Erkrankung auf. So wird Stx2a generell häufiger mit dem HUS assoziiert als Stx1a (Boerlin *et al.*, 1999). Bei dem gravierenden EHEC-Ausbruch im Mai 2011 in Deutschland handelte es sich beispielsweise um den *E. coli* Serotyp O104:H4, der das *stx2a*-Gen trägt (Frank *et al.*, 2011; Bielaszewska *et al.*, 2011). Neben den ungewöhnlich häufigen Krankheitsfällen mit HUS wurden auch bei sehr vielen Patienten neurologische Beeinträchtigungen diagnostiziert. In Hannover wurden 42 Patienten mit dem HUS behandelt, die alle auch neurologische Symptome zeigten (Weissenborn *et al.*, 2012). Während bei der Schädigung der Nieren hauptsächlich die hohe Expression des Stx-Rezeptors Gb3Cer in glomerulären Endothelzellen als Ursache gilt (Obrig, 2010), ist die Kausalität für die neurologischen Symptome weitestgehend unbekannt. In einer aktuellen Veröffentlichung wird jedoch davon ausgegangen, dass das Stx2a aus EHEC O104:H4 spezifisch den Thalamus durch Depolarisierung der Neuronen schädigt (Meuth *et al.*, in press). Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde im Tiermodell gezeigt, dass in dieser Gehirnregion eine erhöhte Rezeptordichte vorliegt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nur weibliche und keine männlichen Ratten die neurologischen

Beschwerden entwickelten, was mit den Beobachtungen während des EHEC-Ausbruches 2011, dass mit 68 % überdurchschnittlich viele Frauen betroffen waren (Frank *et al.*, 2011), zumindest teilweise übereinstimmt.

In Abbildung 4 ist der Aufbau des Stx sowohl schematisch als auch in der Ribbon-Darstellung gezeigt. Stx gehören zu den bakteriellen AB₅-Toxinen und bestehen aus einer enzymatisch aktiven, 32,2 kDa großen A-Untereinheit sowie einem Pentamer aus fünf identischen, 7,7 kDa großen B-Untereinheiten (siehe Abbildung 4A und B). Über das B-Pentamer bindet das Holotoxin mit hoher Affinität an seinen Rezeptor, das GSL Gb3Cer (siehe Abbildung 2) (Müthing *et al.*, 2009 und zitierte Referenzen). Jedes B-Monomer besitzt drei potentielle Bindungsstellen für den Gb3Cer-Rezeptor (siehe Abbildung 4C), so dass die B-Untereinheit mit bis zu 15 Gb3Cer-Molekülen interagieren kann (Ling *et al.*, 1998). Allerdings weisen die Bindungsstellen unterschiedlich starke Interaktionen mit dem Rezeptor auf, wobei die Bindestelle 2 am stärksten mit dem Gb3Cer in Wechselwirkung treten kann (Bast *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2004). Nach Bindung und Internalisierung durch Endozytose wird das Toxin retrograd über das *trans*-Golgi-Netzwerk in das ER transportiert, wo die membrangebundene Protease Furin die A-Untereinheit in ein ~ 27,5 kDa großes A₁- und ein ~ 4,5 kDa großes A₂-Fragment spaltet (siehe Abbildung 4B (Vergrößerung)). Bei dem freigesetzten A₁-Fragment handelt es sich um eine *N*-Glykosidase, die spezifisch das Adenin A4324 der 28s-rRNA in der 60S-Untereinheit der Ribosomen entfernt (Garred *et al.*, 1995; Lea *et al.*, 1999; Kurmanova *et al.*, 2007), weshalb die Stx zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (RIPs, engl.: *ribosome-inactivating proteins*) gezählt werden. Dies hat zur Folge, dass die Proteinbiosynthese irreversibel inhibiert wird (Thompson *et al.*, 1976; Brown *et al.*, 1980), und dass Apoptoseprozesse ausgelöst werden (Tesh, 2010; Bauwens *et al.*, 2010).

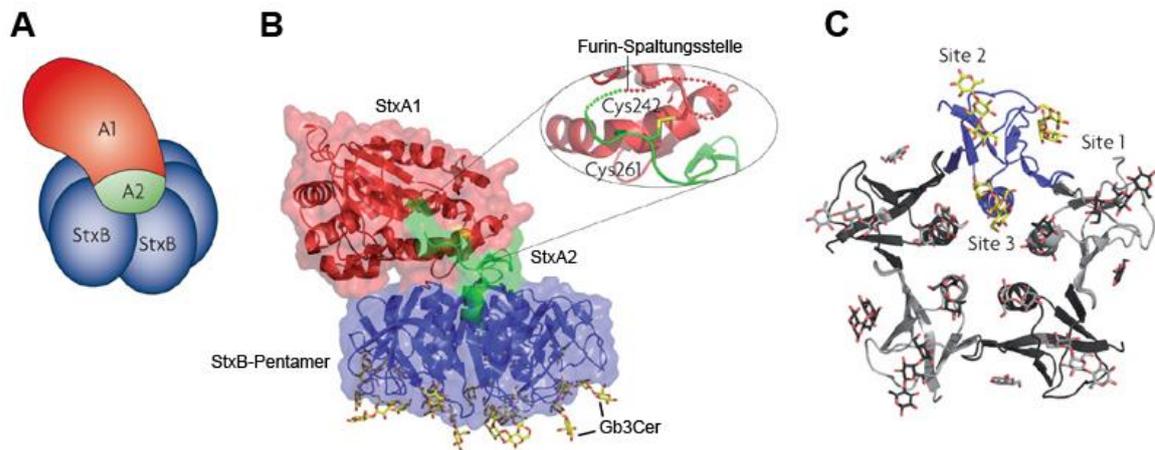


Abbildung 4: Aufbau und Struktur von Shiga Toxinen (Stx). (A) Schematische Darstellung des Holotoxins, welches aus einer A-Untereinheit (UE) (StxA) und fünf identischen B-UE (StxB) aufgebaut ist. Die A-UE wird proteolytisch in ein A1- und ein A2-Fragment gespalten. (B) Ribbondarstellung des Holotoxins mit Bindung des Rezeptors Gb3Cer (gelb). Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Furin-Spaltungsstelle zwischen Arg251 und Met252 in der A-UE und die Disulfidbrücke zwischen Cys242 und Cys361, welche das A1- und das A2-Fragment verbindet. (C) Ribbondarstellung des B-Pentamers mit den drei Bindestellen (Site 1, Site 2 und Site 3) pro B-UE für den Stx-Rezeptor Gb3Cer (gelb) (modifiziert nach Johannes & Römer, 2010).

1.3 Pankreaskarzinomzelllinien

Das Pankreas ist ein 12-15 cm langes und 2,5 cm dickes Organ, das im Retroperitonealraum des oberen Abdomens lokalisiert ist. Makroskopisch werden Pankreaskopf, Pankreaskörper und Pankreasschwanz unterschieden. Das Pankreas agiert simultan als endokrine und exokrine Drüse. Die endokrine Funktion besteht hauptsächlich in der Regulation der Glukose-Homöostase durch die Hormone Insulin und Glucagon, die in den Inselzellen produziert und direkt in die Blutbahn sezerniert werden. Die Inselzellen befinden sich vorrangig im Pankreaskörper und –schwanz und nehmen nur 1-2 % des Gewichts des Pankreas‘ ein. Ungefähr 98-99 % des Pankreas‘ bildet das seröse, exokrin fungierende Drüsengewebe, welches das Pankreassekret produziert. Das Pankreassekret wird von den Azinuszellen freigesetzt und über das Pankreasgangsystem und die Duodenumpapillen in das Duodenum sezerniert. Es enthält Verdauungsenzyme wie die

α -Amylase, Trypsin, Proteasen, Desoxyribo- und Ribonukleasen sowie Lipasen, welche für den Abbau der in der Nahrung enthaltenen, verwertbaren Nährstoffe verantwortlich sind (Weitz, 1998; Campbell *et al.*, 2003). Abbildung 5 zeigt schematisch den Aufbau des Pankreas.

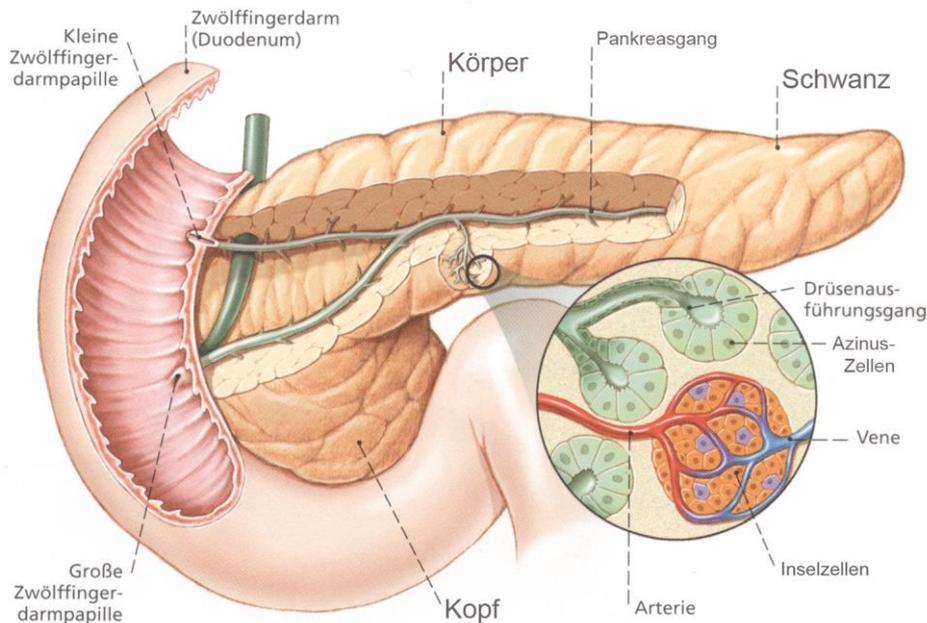


Abbildung 5: Anatomie des Pankreas. Das Pankreas wird in Kopf, Körper und Schwanz unterteilt. Exokrin fungierende Azinuszellen sezernieren das Verdauungssekret über den Pankreasgang und die kleine und große Duodenumpapille in das Duodenum. Endokrin fungierende Zellen der Langerhans Inseln geben blutzuckerregulierende Hormone direkt in die Blutbahn ab (modifiziert nach Weitz, 1998).

Durch die sukzessive Akkumulation von Genmutationen können Neoplasien in den verschiedenen Pankreasgeweben entstehen (Hruban *et al.*, 2000; Vogelstein & Kinzler, 2004; zitiert nach Hidalgo, 2010). Abhängig von ihrer Herkunft aus dem exokrinen oder endokrinen Pankreas werden Tumore mit duktalem, azinärem, endokrinem und nicht zuzuordnendem Ursprung beobachtet. Unter den malignen Pankreastumoren kommen endokrine Tumoren mit 3 % der Fälle relativ selten vor. Auch Karzinome azinären Ursprungs mit ~ 10 % der Pankreasneoplasien haben einen vergleichsweise seltenen Charakter, wohingegen das duktales Adenokarzinom des exokrinen Drüsengewebes mit

~ 80 % aller Fälle als die mit Abstand häufigste Form auftritt (Vincent *et al.*, 2011). Maligne Tumore sind in der Lage in das umliegende Gewebe einzudringen und so, durch Infiltration des Blutkreislaufes und/oder des Lymphsystems, Metastasen in anderen Körperregionen auszubilden (Schmitz, 2009; Plattner & Hentschel, 2011). Dabei werden hauptsächlich Metastasen in Leber und Peritoneum sowie Lymphknoten gebildet (Kelsen *et al.*, 1997).

Als Modellsysteme können Zelllinien des humanen Pankreaskarzinoms herangezogen werden. Diese stammen aus dem Tumorgewebe und werden unter geeigneten Kultivierungsbedingungen etabliert (Schmitz, 2009). Aufgrund der fehlenden oder stark verminderten Proliferationshemmung sind Zelllinien über viele Passagen hinweg stabil. Zelllinien können direkt aus einem Primärtumor oder aus Metastasen des Pankreaskarzinoms etabliert werden. Es wurde gezeigt, dass in 62 % bzw. 78 % der Pankreaskarzinompatienten ein im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöhter Gb3Cer-Gehalt vorliegt und die Pankreaskarzinomzelllinien DanG, MIA PaCa-2 und BxPC-3 ebenfalls Gb3Cer enthalten (Distler *et al.*, 2009; Maak *et al.*, 2011). Da also davon ausgegangen werden kann, dass Pankreaskarzinomzelllinien den Stx-Rezeptor Gb3Cer enthalten, stellen diese potentielle Modellsysteme für eine umfassendere Untersuchung der Relation zwischen dem Rezeptor-Gehalt und der Stx-vermittelten Zytotoxizität dar. Eine Reihe von 16 humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurde ausführlich von Mees *et al.* im Tiermodell auf deren Differenzierung, die Größe der durch die Zelllinien gebildeten Tumoren sowie das Potential der Zelllinien, umliegendes Gewebe zu infiltrieren und Metastasen auszubilden, getestet (2009, 2011). Nach dem Einbringen der jeweiligen Zelllinien in ein Spendertier und drei- bis vierwöchigem Tumorwachstum wurde ein Stück des Subkutan-Tumors in das Pankreas eines Empfängertiers implantiert. Die Tumorgöße sowie das Infiltrations- und Metastasierungspotential der Zelllinien wurde nach zwölf Wochen durch die Bestimmung des Tumolvolumens bzw. der Bildung von Nah- und Fernmetastasen charakterisiert.

Aufgrund der divergierenden Genome von Tumorzellen kann die Expression von beispielsweise Glykoproteinen, Glykolipiden und anderen, an Zell-Zell-Interaktionen oder Signaltransduktionswegen beteiligten Rezeptoren im Vergleich zu gesundem Gewebe verändert sein. Somit stellt die Nutzung von Zelloberflächenstrukturen auf den Tumorzellen, die im Vergleich zu gesunden Zellen oftmals ein verändertes

Expressionsmuster zeigen, eine mögliche Strategie für die Tumorbehandlung dar. Häufig sind diese Strukturen in Tumorgewebe in höherem Maße vorhanden als in dem korrespondierenden gesunden Gewebe; sie liegen „Tumor-assoziiert“ vor. In diesem Fall kann ein solcher Rezeptor als Zielstruktur für onkologische Therapien wie den Einsatz von monoklonalen Antikörpern, zytotoxischen Lektinen oder Toxinen dienen. Dabei erlangt das Konzept der Individualtherapie eine immer größere Bedeutung, da das Rezeptorexpressionsmuster bei Patienten mit der gleichen Tumorart variiert. Unter anderem wurde von einem abweichenden Expressionsmuster von Gb3Cer in Tumorgewebe berichtet. Daher wird der Einsatz von Stx bzw. eines auf der StxB-Domäne basierenden Therapeutikums für eine adjuvante Tumorbehandlung in Erwägung gezogen.

1.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine sehr sensitive Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht im Wesentlichen aus drei Hauptkomponenten: der Ionenquelle, in der die Probenmoleküle ionisiert und in die Gasphase überführt werden, dem Massenanalysator, der die erzeugten Analytionen hinsichtlich des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) auftrennt, und dem Detektor, der auftreffende Ionen registriert und in ein Signal umwandelt. Aus den gewonnenen Daten kann dann ein Massenspektrum generiert werden, in dem die relativen Häufigkeiten der Analytionen gegen deren m/z -Werte aufgetragen sind.

Je nach analytischer Fragestellung können verschiedene Ionisierungsverfahren Anwendung finden, die über individuelle Vorteile hinsichtlich der räumlichen Auflösung, Sensitivität und Probenpräparation verfügen.

1.4.1 IR-MALDI-o-TOF MS

Bei der IR-MALDI-o-TOF MS (Infrarot-Matrix-unterstützte Laser Desorptions/Ionisations-orthogonal-Flugzeit Massenspektrometrie, engl.: *infrared-matrix-assisted laser desorption/ionization-orthogonal-time-of-flight mass spectrometry*) wird die Erzeugung der Analytionen durch einen kurzen Laserimpuls eingeleitet. Der exakte Ionisierungsprozess ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Dabei sind die Eigenschaften der Matrix für den Ionisierungsprozess von entscheidender Bedeutung. Die Matrix muss eine starke Absorptivität für die eingesetzte Laserwellenlänge besitzen (Dreisewerd, 2003). Der Er:YAG- (Erbium-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) Infrarot-Laser besitzt eine Wellenlänge von $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$, bei der beispielsweise Amino- und Hydroxylgruppen angeregt werden (Lottspeich *et al.*, 2006), so dass sich besonders Flüssigmatrixen wie Glycerin eignen (Hillenkamp & Karas, 2007). Zu dem Analyt wird ein hoher molarer Überschuss einer Matrix gegeben, sodass der Analyt in der Matrix eingebettet wird. Im Feinvakuum der Ionenquelle wird die Probe einem intensiven Laserimpuls von einigen Nanosekunden bis zu 200 ns ausgesetzt, wobei die Laserenergie auf die Matrixmoleküle übertragen wird. Dabei wird ein Teil der Energie auf die Analytmoleküle weitergegeben, wonach diese ionisiert werden. Durch die eingebrachte Energie wird ein Teil des Probenfestkörpers explosiv freigesetzt, wobei sowohl Matrix- als auch Analytmoleküle in die Gasphase überführt werden. Bei geeigneter Laserenergie wird eine schonende, fragmentierungsarme Ionisierung gewährleistet, die intakte Molekülionen von thermisch labilen Makromolekülen hervorbringt (Lottspeich *et al.*, 2006). Der Aufbau eines MALDI-o-TOF-Instruments ist in Abbildung 6 dargestellt.

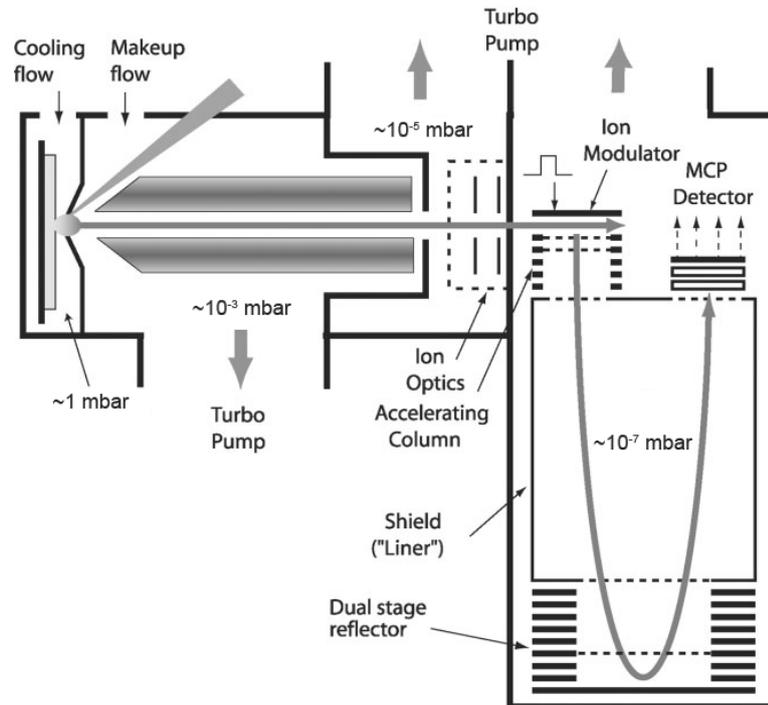


Abbildung 6: Aufbau eines Massenspektrometers mit MALDI-Ionenquelle und orthogonalem Flugzeit-Massenanalysator (modifiziert nach Loboda *et al.*, 2003).

Die MALDI MS mit einem IR-Laser eignet sich besonders zur direkten Kopplung mit der Dünnschichtchromatographie, da hier hohe Eindringtiefen in das Kieselgel der Dünnschichtchromatographie-Platten erreicht werden können und somit die Ausbeute an Analytmolekülen erhöht wird (Dreisewerd *et al.*, 2005; Rohlfing *et al.*, 2007; Distler *et al.*, 2008).

Als Analysator wird ein Flugzeit-Massenanalysator, auch TOF (engl.: *time-of-flight*) genannt, eingesetzt. Die Analytionen durchlaufen nach dem Verlassen der Ionenquelle eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem m/z -Verhältnis aufgetrennt werden. Aufgrund der Proportionalität

$$t \propto \sqrt{\frac{m}{q}}$$

mit t = Flugzeit
 m = Masse
 q = Ladung

für die Zeit, die ein Ion für das Durchlaufen der Driftstrecke benötigt, kann aus der Zeitmessung auf die Masse der Ionen rückgeschlossen werden. Mit diesem Verfahren lassen sich alle Ionen einer Polarität in einem prinzipiell beliebig großen Massenbereich parallel detektieren und bei genügend großer Anzahl an Messzyklen zu einem Massenspektrum aufsummieren.

Problematisch sind jedoch bei axialen TOF-Massenspektrometern die unterschiedlichen Startgeschwindigkeiten der Analytioneen gleicher Masse, wodurch die Auflösung und die Massengenauigkeit bei der Detektion reduziert werden. Die Verbreiterung der Ionensignale kann mit Hilfe eines orthogonalen Flugzeit-Massenanalysators vermindert werden. Dabei erfolgt die Laserdesorption in einer Stickstoffatmosphäre bei $\sim 0,1$ bis 1 mbar. Der Stickstoff agiert als Stoßgas und ermöglicht neben einer Abbremsung auch eine Stabilisierung aufgrund von Kühlungseffekten (engl.: *collisional cooling*) der Analytmoleküle. In dem der Ionenquelle angeschlossenen Quadrupol werden die Analytioneen gesammelt und anschließend im orthogonal angebrachten TOF-Instrument entsprechend ihrer Masse-zu-Ladungsverhältnisse aufgetrennt. Mit Hilfe dieser Entkopplung von Ionisierung und Massenanalyse wird die Auflösung im Vergleich zu einem axial angebrachten Massenanalysator verbessert und die Massengenauigkeit erhöht (Loboda *et al.*, 2003).

1.4.2 nanoESI-Q-TOF MS

Als nanoESI-Q-TOF MS bezeichnet man die nanoElektrospray Ionisation-Quadrupol-Flugzeit Massenspektrometrie (engl.: *nanoelectrospray ionization quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*). In Abbildung 7 ist der Aufbau eines ESI-Q-TOF Massenspektrometers illustriert.

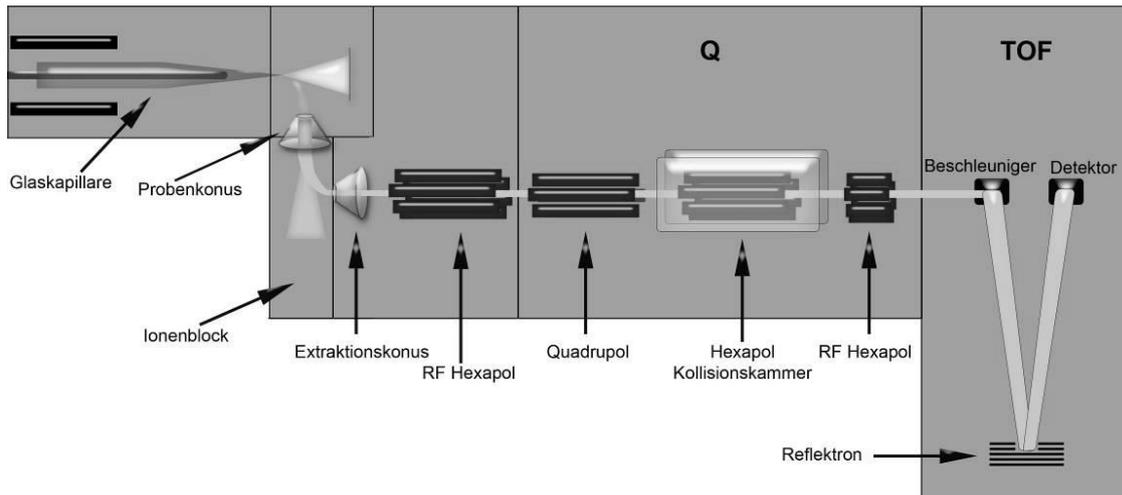


Abbildung 7: Aufbau eines ESI-Q-TOF Massenspektrometers.

Das schonende Ionisierungsverfahren gewährleistet den Transfer intakter Analytionen aus der Lösung in die Gasphase. Für die Desolvatisierung wird der gelöste Analyt in eine leitfähige Kapillare überführt. Zwischen der Elektrode in der Kapillare und einer Gegenelektrode im Massenspektrometer wird eine hohe Potentialdifferenz angelegt. Das entstehende elektrische Feld durchdringt die Analytlösung und trennt die Ionen. Im Positivionenmodus stellt eine Kathode die Gegenelektrode dar, wodurch Kationen an die Lösungsmitteloberfläche diffundieren und Anionen in der Analytlösung verbleiben. Positiv geladene Ionen werden weiter in Richtung der Kathode angezogen, und die Lösung bildet an der Kapillarspitze aufgrund der Oberflächenspannung des Solvents den sogenannten Taylor-Konus. Liegt eine ausreichend hohe Potentialdifferenz vor, ist der Konus stabil und emittiert einen kontinuierlichen filamentartigen Flüssigkeitsstrom. In weiterer Entfernung von der Anode zerfällt der Flüssigkeitsfilm der Analytlösung in winzige aneinander gereihe Tröpfchen. Aufgrund des kontinuierlichen Lösungsmittelverlustes durch Verdampfen des Solvents nimmt die Ladungsdichte in den Tröpfchen stetig zu und es kommt wiederholt zu Coulomb-Explosionen, so dass die Analytionen beim Transfer in das Massenspektrometer desolvatisieren. Der Ionisierungsprozess erfolgt bei Atmosphärendruck; die anschließende Massenanalyse findet jedoch im Hochvakuum statt. Ein spezielles *interface* gewährleistet den Übergang der Ionen in das Massenspektrometer.

Bei MS/MS-Analysen wird ein vorgeschalteter Quadrupol als Massenfilter verwendet. Er ist aus vier parallelen stabförmigen Metallelektroden aufgebaut. Am

Quadrupol wird sowohl eine elektrische Gleichspannung als auch eine Wechselspannung angelegt, wobei die Spannungen so gewählt werden können, dass nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis den Quadrupol passieren können. Ionen mit anderen m/z -Verhältnissen weisen aufgrund der elektrischen Felder eine instabile Flugbahn auf, kollidieren mit den Metallstäben und werden somit nicht detektiert.

Die den Quadrupol passierenden Analytionen gelangen in einen Hexapol, welcher als Kollisionskammer dient. Dieser Hexapol wird von einem inerten Gas wie beispielsweise Argon durchströmt. Ankommende Ionen aus dem Quadrupol kollidieren mit den Gasmolekülen und werden fragmentiert. Dieser Prozess wird als *collision-induced dissociation* (CID) bezeichnet. In einem nachgeschalteten Flugzeit-Analysator werden die Fragmentionen nach ihrem m/z -Verhältnis aufgetrennt. Das resultierende CID-Spektrum zeigt die Molekülmassen der gebildeten Fragmentionen. Somit können mittels CID-Experimenten Daten über die Struktur der im Übersichtsspektrum detektierten Moleküle erhalten werden (Lottspeich *et al.*, 2006).

1.4.3 TOF-SIMS

Die Analyse von biologischen Proben, wie z. B. Gewebeproben oder Zellkulturen, ist für das Verständnis von biochemischen Prozessen, der Zellbiologie und Krankheitsentstehung sowie deren Prävention und Behandlung von zentraler Bedeutung. Optische Verfahren können dabei nur bedingt exakte Strukturaufklärungen liefern, da sie oftmals einer speziellen Probenpräparation oder dem Markieren der zu untersuchenden Komponenten bedürfen (Vickerman, 2011; Fletcher *et al.*, 2011). Daher gerät das massenspektrometrische *imaging* von biologischem Material immer mehr in den Fokus der Forschung, da es eine markierungsfreie Methode für die Detektion von Biomolekülen ermöglicht. Ein geeignetes Verfahren ist die TOF-SIMS (Flugzeit-Sekundärionen Massenspektrometrie, engl.: *time-of-flight secondary ion mass spectrometry*) aufgrund der hohen lateralen Auflösung, der spezifischen Detektion und der hohen Sensitivität (Fletcher *et al.*, 2011). Dabei kann der Analyt nicht nur nachgewiesen, sondern auch dessen Lokalisation im subzellulären Bereich bestimmt werden (Vickerman, 2011). Abbildung 8 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines TOF-SIMS Gerätes.

Bei der TOF-SIMS werden die Proben mit einem gepulsten Primärionenstrahl hoher Energie (einige 10 keV) beschossen. Hierdurch wird in der Probe eine Stoßkaskade ausgelöst, in deren Folge es zur Desorption von Sekundärteilchen kommt. Dies können sowohl Elektronen, Atome und Moleküle, aber auch Ionen beliebiger Polarität der in der Probe vorhandenen Elemente und Verbindungen sein. Die Sekundärionen werden nun mittels Flugzeit-Massenspektrometrie (s. o.) detektiert und identifiziert. Als Primärteilchen werden üblicherweise Ga^+ -Ionen, in jüngerer Zeit vermehrt auch Clusterionen wie Au_n^{x+} oder Bi_n^{x+} verwendet. Diese werden mit einer Flüssigmetallionenquelle erzeugt und können so mit einem Primärionenstrahldurchmesser $< 200 \text{ nm}$ auf die Probe fokussiert werden. Durch das systematische Abrastern der Probe und den daraus erhaltenen lokalen Massenspektren können Ionenverteilungsbilder innerhalb der (Zell-) Oberfläche generiert werden, wobei mit Hilfe einer Falschfarbendarstellung eine bildliche Wiedergabe der Konzentrationsverteilung des Analyten erfolgt.

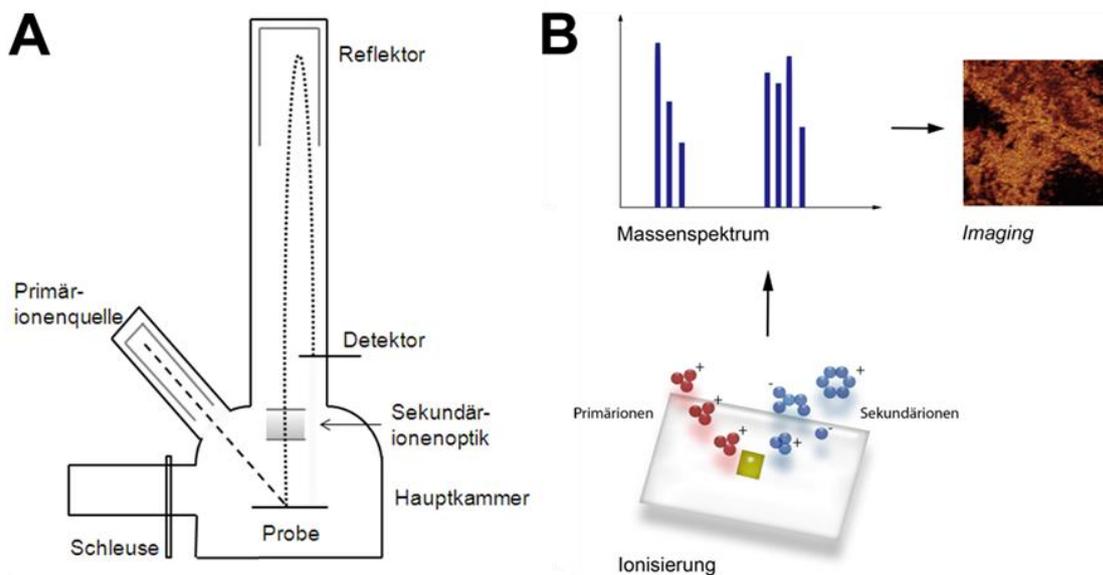


Abbildung 8: Aufbau eines TOF-SI Massenspektrometers und Prinzip der Ionisierung. (A) Aufbau des Massenspektrometers: Die Probe gelangt durch eine Schleuse in die Hauptkammer und wird dort mit einem Primärionenstrahl aus der Ionenquelle beschossen. Die Sekundärionen werden durch eine spezielle Optik fokussiert, nach ihrem m/z -Verhältnis in der feldfreien Driftstrecke aufgetrennt und am Detektor aufgezeichnet. (B) Ablauf des *ion imaging*.

Neben der zweidimensionalen Bildgebung können auch dreidimensionale Tiefenprofile von biologischen Proben mittels TOF-SIMS erstellt werden. Dazu ist das Gerät mit einer zweiten Ionenquelle ausgestattet, die dazu dient, die Probenoberfläche abzuätzen (engl.: *sputter etching*, „Zerstäubungsätzung“), um darunter liegende Schichten charakterisieren zu können (Arlinghaus, 2008).

2. ZIELSETZUNG

Humane Zellen weisen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Stx auf. Bislang wurden vergleichende Arbeiten zur Stx-vermittelten Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Zelltypen nur sporadisch und in begrenztem Umfang mit meist wenigen Zelllinien durchgeführt, z. B. mit lymphoiden und myeloiden Zelllinien (Hoffmann *et al.*, 2010) oder Endothelzelllinien (Bauwens *et al.*, 2010; Betz *et al.*, 2011, 2012). Obwohl die hochaffine Bindung des Stx an den zellulären Rezeptor Gb3Cer, die geringere Affinität gegenüber Gb4Cer und die Rezeptor-vermittelte Endozytose sowie der anschließende retrograde Transport ins Zytosol bereits länger bekannt sind, wurde bisher noch keine umfassende Untersuchung zum Rezeptor-Gehalt von humanen Zellen, der strukturellen Variabilität der GSL-Rezeptoren und der Sensitivität der Zellen gegenüber Stx durchgeführt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die systematische und detaillierte Charakterisierung eines Kollektivs von 15 verschiedenen Zelllinien des humanen duktales Adenokarzinoms des Pankreas‘ hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Stx2, ihrer Expression der Rezeptor-relevanten Glykosyltransferasen, ihres Rezeptor-Gehalts und der Feinstruktur ihrer Stx-Rezeptoren.

Zunächst sollte mit Hilfe von Zytotoxizitäts-Assays die zellschädigende Wirkung von Stx auf die Zelllinien ermittelt werden. Anschließend sollte der Gehalt an Gb3Cer- und Gb4Cer-Molekülen in den Zelllinien bestimmt werden, um Anhaltspunkte für die Unterschiede in der Sensitivität der Zelllinien gegenüber Stx2 zu erhalten. Hierzu sollten sowohl die Glykosyltransferasen, die die Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer synthetisieren, mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion analysiert als auch die Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer durch dünnschichtchromatographische und immunologische Verfahren in den Zelllinien nachgewiesen werden. Um die Stx-Rezeptoren hinsichtlich ihrer molekularen Struktur zu charakterisieren, sollten sie mit zwei unterschiedlichen massenspektrometrischen Methoden untersucht werden. Mittels IR-MALDI-o-TOF MS sollten präliminäre Informationen über die Strukturen der Stx-Rezeptoren erhalten werden, die dann detailliert mittels nanoESI-Q-TOF MS durch CID-Experimente überprüft bzw. verifiziert werden sollten.

Abschließend sollten beispielhaft TOF-SIMS-Untersuchungen durchgeführt werden, um erste Hinweise auf die Verteilung von Lipiden in Zellmembranen zu erhalten. Da bislang relativ große Moleküle wie GSL nicht intakt ionisiert werden können, sollte über den SIMS-Nachweis der Cholin-Gruppe von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin deren Verteilung in der Membran im Vergleich zur dünnschichtchromatographischen Bestimmung untersucht werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Riedel-de-Haën AG (Seelze), Röhm GmbH & Co. KG (Darmstadt), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, USA) in *pro analysis* (p.a.)-Qualität bezogen. Die organischen Lösungsmittel Chloroform und Methanol (Merck KGaA) wurden zusätzlich destilliert und das Chloroform durch die Zugabe von geringen Mengen an Methanol stabilisiert. Ein vollständiges Verzeichnis der verwendeten Chemikalien ist im Anhang (Kapitel 8.1) aufgeführt.

3.2 Pankreaskarzinomzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden Zelllinien des humanen duktales Adenokarzinoms des Pankreas‘ untersucht. Sechs der Zelllinien stammen aus einem Primärtumor, fünf Zelllinien wurden aus Lebermetastasen des Adenokarzinoms etabliert und jeweils zwei Zelllinien entstammen Aszites- bzw. Lymphknotenmetastasen. Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Jörg Haier (Zentrum für Onkologie, Universitätsklinikum Münster) bereitgestellt und wurden detailliert bezüglich ihrer Eigenschaften wie Differenzierung, Tumorgröße, Infiltrations- und Metastasierungspotential im Tiermodell charakterisiert (Mees *et al.*, 2009, 2011). In Tabelle 1 sind die Ursprungsgewebe, Eigenschaften und Kultivierungsbedingungen für die einzelnen Zelllinien zusammengefasst.

Abbildung 9 zeigt die unterschiedlichen Zellmorphologien verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien an ausgewählten Beispielen. Die Zelllinien MIA PaCa-2 und AsPC-1 zeigen eine ähnliche Morphologie wie PANC-1 (Abbildung 9A). Identische Morphologien wiesen die beiden Zelllinien S2-028 und S2-007 (Abbildung 9B) auf.

Tabelle 1: Eigenschaften der Pankreaskarzinomzelllinien, Einsaatzelllichte und für die Kultivierung verwendete FBS-Konzentrationen.

Zelllinien	Ursprung	Differenzierung	Tumorgröße ¹	Metastasierung ¹	Einsaat [Z/ml]	FBS-Gehalt
MIA PaCa-2		undifferenziert	+++ / ++	+++ / ++	1 x 10 ⁵	10 %
PT45P1		schlecht	+	+	5 x 10 ⁴	10 %
Pa-Tu-8902	Primärtumor	mäßig bis schlecht	+	-	1 x 10 ⁵	20 %
PANC-1		mäßig bis schlecht	+	+	1 x 10 ⁵	20 %
BxPC-3		mäßig bis schlecht	n. b.*	+	1 x 10 ⁴	10 %
Capan-2		gut	+	-	1 x 10 ⁵	20 %
Pa-Tu-8988T		schlecht	+	+	1 x 10 ⁵	10 %
S2-007		schlecht	+	+++	1 x 10 ⁴	10 %
S2-028	Lebermetastase	schlecht	++	++	5 x 10 ⁴	10 %
Capan-1		mäßig bis schlecht	++	++	1 x 10 ⁵	10 %
SU.86.86		n. b.*	+	++	2,5 x 10 ⁴	10 %
AsPC-1	Aszitesmetastase	mäßig bis schlecht	++	++	5 x 10 ⁴	20 %
HPAF-II		mäßig	++	+++	1 x 10 ⁵	10 %
Hs 766T	Lymphknoten-	schlecht	n. b.*	n. b.*	1 x 10 ⁵	10 %
MPanc-96	metastase	gut	++	++	1 x 10 ⁵	10 %

*n. b. = nicht bestimmt; ¹bestimmt im Tiermodell: +++/++ = sehr starke bis starkes, + = moderates, - = kein Potential (Mees *et al.*, 2009, 2011)

Capan-1, Capan-2, Bx-PC-3 und SU.86.86 sind morphologisch mit HPAF-II (Abbildung 9C) vergleichbar. Die Zelllinien Pa-Tu-8902, PT45P1, Pa-Tu-8988T und Hs 766T ließen eine Morphologie vergleichbar mit MPanc-96 (Abbildung 9D) erkennen.

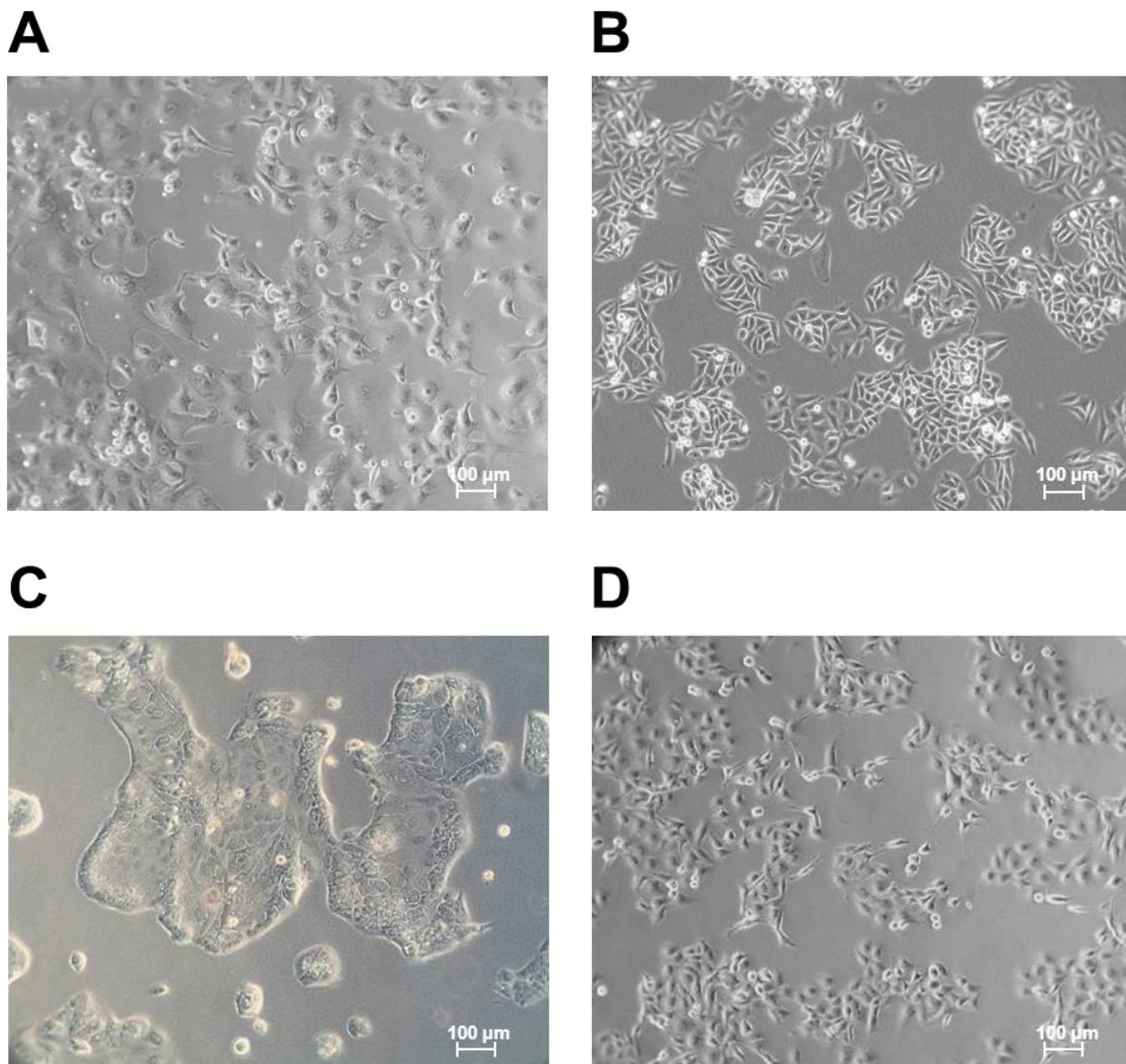


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen von Pankreaskarzinomzelllinien bei 10-facher Vergrößerung. (A) PANC-1, (B) S2-007, (C) HPAF-II und (D) MPanc-96 (siehe Tabelle 1).

3.3 Zellkultivierung

Alle verwendeten Zelllinien zeichnen sich durch adhärentes Wachstum aus und bilden typische Monolayer aus. Bei Konfluenz, d.h. bei der dichtest möglichen Anordnung von Zellen im Kulturgefäß, stellen die Zellen aufgrund der Kontaktinhibition die Proliferationsrate ein. Die Zellen sollen jedoch ihren teilungsaktiven Zustand beibehalten, weshalb eine Subkultivierung (Passagierung) während der logarithmischen Wachstumsphase durchgeführt wurde. Außerdem nimmt im konfluenten Wachstumsstadium das Nährstoffangebot ab und der pH-Wert sinkt. Die Zellen halten dem Selektionsdruck aufgrund des einsetzenden Nährstoffmangels nicht stand, zumal Abbauprodukte, wie z. B. Laktat oder Ammoniak, das Mediummilieu verschlechtern und somit der Kultur schaden. Weiterhin ist das Aufteilen einer Kultur in mehrere Kulturgefäße während der exponentiellen Wachstumsphase für hohe Zellausbeuten empfehlenswert.

3.3.1 Kultivierungsbedingungen

Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank in 8 %iger (v/v) CO₂-Atmosphäre und 95 %iger (v/v) Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Alle Lösungen zur Zellkultivierung wurden auf 37 °C temperiert, falls nicht anders angegeben.

Die Handhabung der Zellkulturen erfolgte unter aseptischen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank unter einem kontinuierlichen, laminaren, hochleistungsschwebstoffgefilterten Luftstrom. Die für die entsprechenden Versuche benötigten Geräte und Materialien wurden vor dem Einbringen in die Reinraumwerkbank äußerlich mit 70 %igem (v/v) Ethanol desinfiziert. Als Kultivierungssystem dienten Gewebekulturflaschen (engl.: *tissue flask*, T-Flasche) mit einer Wachstumsfläche von 25 und 75 cm² (Corning, Wiesbaden) sowie 175 cm² (Greiner Bio-One, Essen), welche mit 7, 20 bzw. 50 ml Kulturmedium versehen wurden. T-Flaschen bestehen aus Polystyrol und besitzen eine durch Gasionisation hydrophilisierte Wachstumsoberfläche, so dass die Adhäsion der Zellen erfolgen kann. Die verwendeten T-Flaschen sind mit *filtercaps* ausgestattet, so dass ein Gasaustausch mit der Atmosphäre im Inkubator bei

geschlossenem Deckel stattfinden kann, wodurch das Kontaminationsrisiko minimiert wird.

Alle Zelllinien des humanen Pankreaskarzinoms wurden vor Versuchsbeginn mit einer Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) hinsichtlich einer Mykoplasmenkontamination untersucht. Das Nachweisverfahren beruht auf der Detektion einer hoch konservierten Region der 16s rRNA im Mykoplasmen genom (Venor[®] GeM *Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR*, Minerva Biolabs, Berlin). Bei einer Kontamination zeigen die Proben das gleiche Muster im Agarosegel wie die internen Kontrollen. Bei einer Kontamination mit Mykoplasmen ist eine Behandlung über mindestens drei Passagen mit spezifischen Antibiotika notwendig (MycoKill AB Antibiotic, PAA Laboratories, Pasching, Österreich), um die Kontamination zu entfernen. Die nachfolgenden Experimente wurden ausschließlich mit Mykoplasmen-freien Zellkulturen durchgeführt.

3.3.2 Passagierung von Zellen

Adhärenz wachsende Zellen bilden bei Konfluenz geschlossene Monolayer aus, und es kommt zur Kontaktinhibition. Dadurch stellen die Zellen ihre Proliferation weitestgehend ein. Um sie weiter teilungsaktiv zu propagieren, müssen die Zellen von ihrer Wachstumsoberfläche dissoziiert und in geringerer Dichte in ein neues Kulturgefäß überführt werden. Dazu wurde nach dem Verwerfen des Kulturmediums der Zellrasen mit $\sim 0,2 \text{ ml/cm}^2$ kalzium- und magnesiumfreier, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (engl.: *calcium and magnesium free – phosphate buffered saline*, CMF-PBS; Lonza, Verviers, Belgien) gewaschen, um die in dem Medium enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen und die Konzentration an bivalenten Kationen zu verringern. Anschließend erfolgte eine achtminütige Inkubation mit $\sim 0,04 \text{ ml/cm}^2$ Accutaselösung (PAA Laboratories) bei 37 °C und 8 % CO₂. Darin enthaltene Proteasen verdauen die Adhäsionsproteine, und EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, die zellbindende Membranproteine stabilisieren. Durch Zugabe eines äquivalenten Volumens des entsprechenden Kulturmediums (Tabelle 2) wurde die Reaktion gestoppt, die Zellen resuspendiert und in einer definierten Zelldichte (siehe Tabelle 1) in ein Kulturgefäß mit $0,28 \text{ ml/cm}^2$ Medium eingesät.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums für humane Pankreaskarzinomzelllinien.

Bestandteil	Volumen [ml]	Firma
DMEM, 4,5 g/l Glukose	445 bzw.395*	Lonza
FBS Gold	50 bzw.100*	PAA
L-Glutamin	5	Lonza

*je nach Zelllinie, siehe Tabelle 1

3.3.3 Zellkonzentrationsbestimmung

Die Zellkonzentrationsbestimmung wird mit Hilfe eines Hämozytometers durchgeführt. Durch die Netzeinteilung auf dem Objektträger und das Aufbringen eines planar geschliffenen Deckglases kann eine Zellzählung in einem definierten Volumen erfolgen und die Zellkonzentration nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellkonzentration} \left[\frac{Z}{ml} \right] = \frac{\text{Anzahl Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate}}$$

Mit Hilfe der Trypanblau-Färbung lassen sich weiterhin lebende und tote Zellen unterscheiden, da der Farbstoff ausschließlich durch geschädigte Zellmembranen toter Zellen diffundieren kann. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblaulösung (0,4 % (v/v) in PBS; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA) vermischt und in das Hämozytometer gegeben. Die Viabilität der Zellen wird mit der nachfolgenden Formel berechnet:

$$\text{Viabilität} [\%] = \frac{\text{Anzahl tote Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

3.3.4 Kryokonservierung von Zellen

Bei der Kryokonservierung werden Zellkulturen langfristig unter Erhaltung ihrer Vitalität bei etwa -190 °C in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert. Das Kryokonservierungsmedium enthält neben dem Kulturmedium 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich Inc.), welches die Ausbildung membran-

schädigender Eiskristalle während des Einfrierprozesses verhindert. Nach der Vereinzelung der Zellen und der Zellkonzentrationsbestimmung werden die Zellen für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wird das Zellsediment in der gewünschten Zellkonzentration (meist 10^6 Zellen/ml) in gekühltem Kryokonservierungsmedium resuspendiert und je 1 ml Zellsuspension in vorgekühlte 1,8 ml-Kryoröhrchen (Cryo.S™, Greiner Bio-One; Essen) aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierkammer (Nalgene™ 1 °C Freezing Container „Mr Frosty“, Nalgene, Rochester, USA) und diese in einem -70 °C Gefrierschrank platziert, wodurch eine konstante Abkühlrate der Zellsuspension von 1 °C/min erzielt wird. In dem Tiefgefrierschrank können die kryokonservierten Zellkulturen für einige Monate gelagert werden; für die Langzeitlagerung werden diese in die Gasphase eines Stickstofftanks (German Cryo, Jüchen) bei -190 °C überführt.

3.3.5 Zytotoxizitäts-Assay

Der Zytotoxizitäts-Assay stellt eine Weiterentwicklung des etablierten *vero cell assays* (Konowalchuk *et al.*, 1977) dar und ermöglicht die Untersuchung der Sensitivität der verwendeten Zelllinien gegenüber Stx2. Das Testprinzip beruht auf der Bestimmung des zytotoxischen Titers, bei dem 50 % der Zellen abgestorben sind und sich abgelöst haben (engl.: *cytotoxicity dose*, CD_{50}).

100 µl der Zellsuspension mit entsprechender Zellkonzentration (siehe Tabelle 1) wurden pro Kavität in eine Mikrotiterplatte (MTP) eingesät und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach optischer Kontrolle des subkonfluenten Bewuchses am Lichtmikroskop wurden die Zellen mit unterschiedlichen Stx2-Konzentrationen in 100 µl Kulturmedium für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Zu den mitgeführten Kontrollen wurde kein Stx2 zugegeben. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, die nahezu kein Ablösen von der MTP zeigen sollten. Bei der Positivkontrolle wurde das Kulturmedium entfernt und die entsprechenden Kavitäten mit 100 µl 1 % (v/v) Triton X-100 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in Kulturmedium befüllt, welches als Detergenz die Zellmembran der Zellen zerstört. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank wurde die MTP geschüttelt, um tote Zellen vollständig zu lösen, und die Überstände wurden verworfen. Die Fixierung der verbliebenen Zellen erfolgte mit jeweils 70 µl einer

2 %igen (v/v) Formaldehydlösung in CMF-PBS für 10 min bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurde die Formaldehydlösung verworfen und die Zellen wurden mit jeweils 70 µl der Zellfärbelösung (0,13 % (w/v) Kristallviolett, 2 % (v/v) Formaldehyd, 5 % (v/v) Ethanol in CMF-PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Durch wiederholtes vorsichtiges Spülen mit deionisiertem Wasser (H_2O_{deion}) wurde die Färbelösung, die nicht von den Zellen aufgenommen wurde, ausgewaschen, bis keine Färbung mehr im Wasser erkennbar war. Die MTP wurde an der Luft getrocknet und zu jeder Kavität wurden 100 µl 50 % (v/v) Ethanol in CMF-PBS hinzugefügt. Unter leichtem Schwenken auf einem Schüttler wurde die MTP für 30 min inkubiert, um das Kristallviolett aus den Zellen herauszulösen. Die Quantifizierung erfolgte in einem *ELISA-Reader* (Opsys MR, Dynex, Berlin) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm. Der CD_{50} -Wert entspricht der Stx2-Konzentration, bei der 50 % der Absorption im Vergleich zu der Negativkontrolle erreicht wurde.

3.4 Nachweis von Glykosyltransferasen mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur molekularbiologischen Expressionsanalyse definierter Nukleinsäuresequenzen. Das Prinzip der PCR beruht auf der exponentiellen Amplifikation einer gewünschten Sequenz aus Desoxyribonukleinsäuren (engl.: *desoxyribonucleic acids*, DNA) in periodischen Repliken dreier temperaturabhängigen Phasen: (I) Denaturierung, (II) Annealing und (III) Elongation. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA durch Temperaturen zwischen 92-95 °C aufgeschmolzen, so dass einzelsträngige DNA-Moleküle vorliegen. Das *Annealing* bezeichnet die Hybridisierung der Primer, kurzer Oligonukleotide, an die Zielsequenz der Einzelstrang-DNA. Die Reaktionstemperatur ist von den Eigenschaften der verwendeten Primer abhängig. Ausgehend von den Primern wird dann während der Elongation bei 72 °C durch die DNA-Polymerase die Einzelstrang-DNA komplementär verlängert, so dass wieder doppelsträngige DNA vorliegt. Wird die doppelsträngige DNA nun wieder denaturiert, liegen bereits doppelt so viele DNA-Templates vor, weshalb

durch die zyklische Wiederholung der Temperaturphasen eine exponentielle Amplifikation stattfindet. Tatsächlich erfolgt die exponentielle Vervielfältigung allerdings nur in den ersten Zyklen, da die Amplifikation aufgrund der Limitierung der Substrate und der Synthese von Nebenprodukten beeinträchtigt wird.

Bei der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) werden Ribonukleinsäuren (engl.: *ribonucleic acids*, RNA) als genetisches Ausgangsmaterial für die molekularbiologische Expressionsanalyse bestimmter Gensequenzen eingesetzt. Dabei wird die RNA von reversen Transkriptasen in *complementary* DNA (cDNA) transkribiert, welche dann als Template für die DNA-Polymerase dient und amplifiziert werden kann.

3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Die Handhabung von RNA gestaltet sich als kritisch, da ubiquitär vorhandene und schwer zu inaktivierende RNasen die isolierte RNA-Probe abbauen können. RNasen werden von allen lebenden Organismen synthetisiert und benötigen im Gegensatz zu DNasen meistens keine Cofaktoren wie Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Zn^{2+} . Dementsprechend werden Materialien verwendet, die laut Herstellerangaben DNase- und RNase-frei produziert und verpackt sind. Des Weiteren werden Arbeitsflächen vor Versuchsbeginn mit RNaseZAP[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zur Entfernung von Ribonukleasen gereinigt.

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit*[®] (QIAGEN, Hilden). Dazu wurden 4×10^6 Zellen der jeweiligen Zelllinie (siehe Tabelle 1) mit 350 μl Lysepuffer (RLT-Puffer mit 1 % (v/v) Mercaptoethanol) versetzt und resuspendiert. Das Lysat wurde auf eine *QIAShredder*-Säule aufgetragen und für 2 min bei 14.100 g zentrifugiert, um den Zellaufschluss zu verbessern. Anschließend wurde das Lysat mit dem äquivalenten Volumen an 70 %igem (v/v), unvergälltem Ethanol verdünnt, gut vermischt, auf die *RNeasy Mini* Säule gegeben und 15 sec bei 6700 g zentrifugiert. Dabei bindet die RNA an die Silicamembranen der Säule. Das Eluat wurde verworfen und die Säule wurde mit 700 μl RW1-Puffer durch Zentrifugation für 15 sec bei 6700 g gewaschen. Es wurden zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500 μl RPE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde die RNA mit 40 μl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation für 1 min bei 14.100 g eluiert. Durch die Wiederholung des Elutionsschrittes wird die RNA-Ausbeute weiter erhöht.

3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die optische Dichte (OD) photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wird die RNA-Konzentration wie folgt berechnet:

$$c(\text{RNA})[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times 40$$

mit	$c(\text{RNA}) =$	Konzentration der Ausgangslösung
	$OD_{260} =$	Absorption der Lösung bei $\lambda = 260$ nm
	$V =$	Verdünnungsfaktor
	$40 =$	Multiplikationsfaktor für RNA

Zusätzlich wurde die OD bei $\lambda = 280$ nm bestimmt, um aus dem Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} den Grad der Kontamination mit Proteinen zu evaluieren. Optimale Werte für dieses Verhältnis liegen zwischen 1,8 und 2,0. Allerdings sind diese Verhältniswerte abhängig von dem Salzgehalt des Wassers, in dem die RNA gelöst ist, so dass Werte zwischen 1,5 und 2,0 durchaus messbar sind, ohne dass eine Proteinkontamination vorliegt (Wilfinger *et al.*, 1997).

3.4.3 Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion

Für die Durchführung der RT-PCR wurde das QIAGEN[®] OneStep RT-PCR Kit verwendet. In der Enzymmischung sind neben der thermostabilen *HotStar Taq* DNA-Polymerase die *Omniscript*[®]- und *Sensiscript*[®]-Reverse Transkriptasen enthalten, die jeweils rekombinant aus *E. coli* isoliert und aufgereinigt wurden. Die einzelnen Komponenten des Kits wurden schonend auf Eis aufgetaut und analog zu dem Pipettierschema in Tabelle 3 zu einem Mastermix kombiniert.

Tabelle 3: Pipettierschema für den Mastermix der RT-PCR.

Komponente	Volumen pro Reaktionsansatz
RNase-freies Wasser	13,75 μ l
5 x RT-PCR Puffer	5,0 μ l
dNTP Mix (je 10 mM pro dNTP*)	1,0 μ l
Primer F (100 pmol/ μ l)	0,25 μ l
Primer R (100 pmol/ μ l)	0,25 μ l
QIAGEN Enzymmischung	1,0 μ l
DMSO	1,25 μ l
Reaktionsvolumen ohne Template-RNA	24 μ l

*Desoxyribonukleosidtriphosphate

Die in dem Mastermix eingesetzten Primer flankieren spezifisch die Gensequenzen der α 1,4-Galaktosyltransferase (α 1,4-GalT, Gb3Cer-Synthase) bzw. der β 1,3-N-Acetylgalaktos-aminyltransferase (β 1,3-GalNAcT, Gb4Cer-Synthase). Die Primer wurden von Herrn Ivan Kouzel (Institut für Hygiene, Medizinische Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) konstruiert und von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Sequenzen und Eigenschaften der verwendeten Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')	GC-Gehalt	Annealing-temperatur	Fragmentlänge
α 1,4-GalT (sense)	CTA CCT GGA CAC GGA CTT	55,6%	51 °C	401 bp
α 1,4GalT (antisense)	CCT GGC TCT TCT TGT TCC	55,6%	51 °C	401 bp
β 1,3GalNAcT (sense)	TGT TGG CAT TGT CCT TAGA	42,1%	49 °C	603 bp
β 1,3-GalNAcT (antisense)	ATG TGG TGT TCC TTA GCAT	42,1%	49 °C	603 bp

Jeweils 24 μl des Mastermixes wurden in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) gegeben und mit 1 μl der isolierten RNA gut vermischt. Als Positivkontrolle wurde 1 μl eines RNA-Isolats von HBMECs (engl.: *human brain microvascular endothelial cells*) eingesetzt, da diese Zelllinie die nachzuweisenden Glykosyltransferasen exprimiert (Schweppe *et al.*, 2008). Für eine Negativkontrolle wurde das entsprechende Volumen an RNase-freiem Wasser verwendet. Im Thermocycler (T-Personal combi; Biometra, Göttingen) erfolgte die Transkription von der Template-RNA zu cDNA und die Amplifikation. Das Temperaturprogramm des Thermocyclers wurde so gewählt, dass anfangs die Temperatur mit 50 °C im Aktivitätsoptimum der reversen Transkriptasen liegt. Durch die anschließende Temperaturerhöhung auf 95 °C wurden die Transkriptasen inhibiert, während die *Taq*-Polymerase aktiviert wurde. In Tabelle 5 ist das Temperaturprogramm für die RT-PCR zusammen gefasst.

Tabelle 5: Temperaturprogramm des Thermocyclers für die RT-PCR.

Phase	Zeit	Temperatur
Vorheizen	30 min	50 °C
Reverse Transkription	30 min	50 °C
Polymerase-Aktivierung	15 min	95 °C
<u>Zyklusablauf</u> (30 Zyklen)		
Denaturierung	30 sec	94 °C
Annealing	30 sec	49 °C bzw. 51 °C*
Elongation	1 min	72 °C
Finale Elongation	10 min	72 °C
Kühlen	~ 60 min	4 °C

*primerabhängig, siehe Tabelle 4

Die Lagerung der Amplifikate erfolgte bei -20 °C.

3.4.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR und Identifizierung der DNA-Amplifikate wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Aufgrund ihrer Phosphatgruppen sind DNA-Fragmente negativ geladen und wandern so im elektrischen Feld von der Kathode in Richtung Anode. Anhand der Wanderungsgeschwindigkeit wird die Länge der Amplifikate durch den Vergleich mit den Fragmenten einer 100 Basenpaar (bp) DNA-Leiter (Invitrogen, Carlsbad, USA) bestimmt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Die Agarose wurde durch Aufkochen in TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer gelöst, in die Gelkammer gegossen und die Probestaschen durch Einsetzen eines Kamms geformt. Nach ca. 1 h ist das Gel vollständig polymerisiert. Das Gel wurde mit 0,5 x TBE-Puffer überschichtet, welcher als Elektrophoresepuffer dient, und der Kamm wurde entfernt. Zur Identifizierung der PCR-Produkte wurden 6 µl von einer Mischung aus 2 µl Ladepuffer, 8 µl Milli-Q Wasser und 2 µl des jeweiligen PCR-Amplifikats in eine Tasche des Agarosegels pipettiert. Die angelegte Spannung betrug 120 V. Die Elektrophorese wurde nach 1,25 h beendet und das Gel für 20 min in der Ethidiumbromidlösung inkubiert. Die Visualisierung und Dokumentation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationsgeräts ChemiDoc™ XRS (BioRad Laboratories, München).

Tabelle 6: Zusammensetzung der Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.

Lösung	Komponenten
5 x TBE-Puffer	54 g TRIS-Base 27,2 g Borsäure 20 ml 0,3 M EDTA in 1 l deionisiertem Wasser, pH 8
Agarosegel	1% (w/v) Agarose in 0,5 x TBE-Puffer
Ladepuffer	22,5 mg Bromphenolblau 22,5 mg Xylencyanol 1,5 ml 0,5 M EDTA 20,325 ml wasserfreies Glycerin 0,3 ml 10 % (w/v) SDS
Ethidiumbromidlösung	50 µl Ethidiumbromidlösung auf 1 l 0,5 x TBE-Puffer

3.4.5 DNA-Kontaminationskontrolle

Um DNA-Kontaminationen in den RNA-Isolaten auszuschließen, wurde eine modifizierte RT-PCR durchgeführt. Der angesetzte Mastermix (siehe Kapitel 3.4.3) wurde für 15 min bei 95 °C erhitzt, um die enthaltenen reversen Transkriptasen zu inaktivieren. Folglich ist die Transkription von RNA zu cDNA inhibiert und der *Taq*-Polymerase steht kein Template zur Verfügung. Anschließend wurde die PCR wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben durchgeführt. Sind nach Inkubation des Agarosegels in Ethidiumbromidlösung Banden erkennbar, liegt eine DNA-Kontamination des RNA-Isolats vor, so dass eine erneute RNA-Isolierung durchgeführt werden muss.

3.5 Shiga Toxin 2, GSL- und Phospholipid-Referenzen

3.5.1 Shiga Toxin 2

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Stx2 wurde von Frau PD Dr. Martina Bielaszweska (Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster) aufgereinigt und freundlicherweise für die Durchführung der Zytotoxizitäts-Assays und der Overlay-Assays zur Verfügung gestellt.

Stx2 wurde mit Hilfe des *E. coli*-Stammes C600 (933W) produziert, welcher das *stx2*-Gen des Bakteriophagen 933W (Strockbine *et al.*, 1986) aus dem Trägerstamm EDL933 des EHEC-Serotyps O157:H7 exprimiert. Die Produktion und Aufreinigung wurde bereits beschrieben (Bauwens *et al.*, 2011).

3.5.2 GSL- und Phospholipid-Referenzmischungen

Bei der Immundetektion von Stx-Rezeptoren (siehe Kapitel 3.7.3) wurden neutrale GSL aus humanen Erythrozyten als Positivkontrolle eingesetzt. Die GSL-Konzentration dieser Mischung beträgt 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Chloroform/Methanol (2/1, v/v) wobei Monohecosylceramid (MHC, Glc β 1Cer), Laktosylceramid (Lc2Cer, Gal β 4Glc β 1Cer), Globotriaosylceramid (Gb3Cer bzw. Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer, GalNAc β 3Gal α 4Gal β 4Glc β 1Cer) die Hauptkomponenten darstellen. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Komponenten wurden densitometrisch bestimmt (Meisen *et al.*, 2005) und sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Weiterhin wurde eine Referenzmischung mit äquimolaren Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer verwendet (Merkel, 2009).

Tabelle 7: Zusammensetzung der für die DC verwendeten GSL-Referenzmischungen aus humanen Erythrozyten.

Referenz	Code	Konzentration	GSL- Hauptkomponenten	Anteil [%]
<i>Referenz 1</i>				
Äquimolare Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer	VM01/109-2	1 µg/µl	Gb3Cer	~ 50
			Gb4Cer	~ 50
<i>Referenz 2</i>				
Neutrale GSL aus humanen Erythrozyten	JM10/80	5 µg/µl	MHC	2,8
			Lc2Cer	16,7
			Gb3Cer	21,4
			Gb4Cer	59,1

Die Referenzmischung für Phospholipide (Tabelle 8) enthält 0,12 µg/µl Sphingomyelin (SM), 0,12 µg/µl Phosphatidylcholin (PC), 1,2 µg/µl Phosphatidylethanolamin (PE), 0,08 µg/µl Phosphatidsäure (PA), 0,12 µg/µl Phosphatidylglycerol (PG) und 0,12 µg/µl Cardiolipin (CL).

Tabelle 8: Zusammensetzung der Phospholipid-Referenzmischung.

Referenz	Code	Konzentration	Phospholipid- Hauptkomponenten	Anteil [%]
Phospholipid- Referenz	RR01/66	0,12 µg/µl	SM	6,8
		0,12 µg/µl	PC	6,8
		1,2 µg/µl	PE	68,2
		0,08 µg/µl	PA	4,6
		0,12 µg/µl	PG	6,8
		0,12 µg/µl	CL	6,8

3.6 Glykosphingolipidextraktion

3.6.1 Reinigung von Glasgefäßen

Um mögliche Verunreinigungen von den für die GSL-Extraktion verwendeten Glasgefäßen zu entfernen, wurden diese nach der Reinigung mit der Laborspülmaschine mit Methanol befüllt und für 30 min im Ultraschallbad behandelt. Die für die Lipidextraktion und Langzeitlagerung der GSL-Proben genutzten Schraubdeckelröhrchen mit Teflondichtung (SDR; Pyrex[®], Staffordshire, GB) wurden zudem vorher ü. N. in methanolischer KOH-Lösung inkubiert und in H₂O_{deion} aufgeköcht. Zur Reinigung der Teflondichtungen der SDR wurde Methanol verwendet.

3.6.2 Lipidextraktion aus Zellkulturen

Als Komponenten von Zellmembranen lassen sich neben Phospholipiden und Cholesterol auch GSL durch Lipidextraktion aus humanen Zelllinien des Pankreaskarzinoms isolieren.

Die Zelllinien wurden in jeweils vier T-Flaschen mit 175 cm² Wachstumsfläche bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde verworfen und der Zellrasen wurde zweimal mit CMF-PBS gewaschen. Pro T-Flasche wurden 20 ml Methanol zu den Zellen gegeben und diese im Ultraschallbad vom Boden der T-Flasche gelöst. Bei starker Adhärenz der Zellen wurde mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner Bio-One) der Zellrasen vollständig abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein SDR überführt und die T-Flasche mit weiteren 10 ml Methanol durchgespült, welche ebenfalls in das SDR gegeben wurden. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1038 g (Hettich Universal, Rotor 1323, Bäch, Schweiz) wurde der Überstand über einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel) in einen 1 l Rundkolben filtriert. Anschließend wurden zwei weitere Extraktionsschritte durchgeführt, bei denen das Zellsediment nacheinander mit jeweils 30 ml Chloroform/Methanol (1/1, v/v) und Chloroform/Methanol (2/1, v/v) versetzt, 5 min im Ultraschallbad behandelt und abzentrifugiert wurde. Die vereinigten Überstände wurden am Rotationsverdampfer (Heidolph Laborata 4001 efficient, Kehlheim) unter Vakuum bei 37 °C und 210 UpM eingeengt.

3.6.3 Alkalische Hydrolyse und Dialyse

Da die bei der GSL-Extraktion koextrahierten Lipide, wie z. B. Triacylglyceride, die weitere GSL-Analytik stören, wurden diese selektiv durch alkalische Hydrolyse verseift. Esterbindungen der Phospholipide und Triacylglyceride werden unter milden alkalischen Bedingungen hydrolysiert, während die Amidbindungen der GSL stabil bleiben. Durch anschließende Dialyse werden Salze und niedermolekulare Substanzen der verseiften Phospholipide und Triacylglyceride abgereichert.

Der eingeeengte Extrakt wurde in 50 ml wässrigem 1 N Natrimhydroxid (NaOH) gelöst und für 1 h bei 37 °C unter Rotation inkubiert. Nach Neutralisation mit 5 ml 10 N Salzsäure (HCl) wurden die Extrakte in Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa überführt und für drei Tage bei 4 °C gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ dialysiert. Um den Konzentrationsgradienten an der Membranoberfläche hoch zu halten, wurde zweimal täglich ein Wasserwechsel vorgenommen. Die wässrige Probe wurde nach Abbruch der Dialyse in einen 1 l Glaskolben überführt und unter Vakuum bei 37 °C und 210 UpM am Rotationsverdampfer eingeeengt.

3.6.4 Anionenaustauschchromatographie

Um neutrale GSL und negativ geladene GSL (= Ganglioside) voneinander zu separieren und diese anschließend individuell analysieren zu können, wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit Diethylaminoethyl- (DEAE) Sepharose durchgeführt.

Für die Chromatographie wurde die eingesetzte Glassäule (8 cm Höhe, 1,2 cm Innendurchmesser) mit DEAE-Sepharose CL-6B (GE Healthcare, München) in der Acetatform bis zu einer Säulenbetthöhe von 1,5 cm befüllt. Das Säulenmaterial wurde mit dem 1,5fachen Säulenbettvolumen an Solvent A (Chloroform/Methanol/Wasser, 30/60/8, v/v/v) gespült, um die Acetationen zu eluieren. Der nach der alkalischen Hydrolyse gewonnene Extrakt wurde in dem 5fachen Säulenbettvolumen an Solvent A gelöst und auf das Säulenbett gegeben. Um Verluste zu minimieren, wurde der Kolben mit dem 5fachen Säulenbettvolumen an Solvent A versehen und dieses ebenfalls auf die Säule gegeben. Neutrale GSL wurden durch die Zugabe des 5fachen Säulenbettvolumens an

Solvent A und des 2,5fachen Säulenbettvolumens an Methanol eluiert. Zur Elution der Ganglioside wurde die Säule mit dem 5fachen Säulenbettvolumen an Solvent B (0,45 M Ammoniumacetat in Methanol) gespült. Die Eluate wurden am Rotationsverdampfer eingeengt, in H₂O_{deion} aufgenommen, dialysiert (siehe Kapitel 3.6.3) und erneut unter Vakuum bei 37 °C und 210 UpM eingeengt.

Die eingeengten Eluate wurden in 8 ml Chloroform/Methanol (2/1, v/v) aufgenommen, im Ultraschallbad gelöst und in SDR überführt. Ein erneutes Spülen des Kolbens mit weiteren 8 ml des Lösungsmittelgemisches, die nach Ultraschallbehandlung ebenfalls in das SDR gegeben wurden, diente der Minimierung von Verlusten durch Rückstände in dem Kolben. Die Proben wurden in einem auf 37 °C temperierten Heizblock (Dri-Block DB-3, Techne, Staffordshire, UK) unter Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeengt und in einem definiertem Volumen an Chloroform/Methanol (2/1, v/v) entsprechend 4×10^5 Zellen pro μl aufgenommen. Die Proben wurden in fest verschlossenen SDR bei -20 °C gelagert.

3.7 Glykosphingolipidanalytik

3.7.1 Hochleistungsdünnschichtchromatographie

Bei der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (engl.: *high performance thin-layer chromatography*, HPTLC) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Substanzen aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen mit einer stationären und einer mobilen Phase getrennt werden können.

Vor Gebrauch wurden die 10 x 10 cm großen, mit Kieselgel 60 beschichteten HPTLC-Platten (0,2 μm Schichtdicke; Merck, Darmstadt) für 45 min bei 110 °C aktiviert, um ihnen das Restwasser zu entziehen. Bis zur Verwendung wurden sie anschließend in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid (P₂O₅, Sicapent[®], Merck) gelagert.

Sowohl die neutralen GSL-Fractionen aus der Anionenaustauschchromatographie als auch die Referenzmischungen neutraler GSL aus humanen Erythrozyten (Tabelle 7) wurden mit Hilfe eines automatischen Probenapplikators (Linomat IV, Camag, Muttenz,

Schweiz) unter Stickstoffstrom am unteren Rand der HPTLC-Platten aufgetragen. Dadurch wurden definierte Auftragungszonen erhalten und somit eine verbesserte Auftrennung erzielt. Um verunreinigende Lipide von den GSL zu separieren, wurde die HPTLC-Platte für 30 min in einem Chromatographietank mit 40 ml Chloroform chromatographiert. Nach kurzer Trocknung wurde die HPTLC-Platte nach Probenaufgabe in einen Chromatographietank, der mit Chromatographiepapier (Whatman International Ltd, Maidstone, USA) und 100 ml Laufmittel (Chloroform/Methanol/Wasser 120/70/17, v/v/v + 20 mg CaCl₂/100 ml Laufmittel) versehen wurde, überführt und für 20 min chromatographiert.

3.7.2 Orcinolfärbung

Die Orcinolfärbung dient dem Nachweis von Kohlenhydratverbindungen und somit aller isolierten GSL-Spezies. Unter dem Einfluss von Schwefelsäure und Hitze reagieren die Zucker der GSL zu Hydroxymethylfurfuralen, welche mit Orcinol einen Farbstoff bilden. Hierzu wurde die HPTLC-Platte im Anschluss an die Dünnschichtchromatographie für 15 sec in die Orcinollösung (0,3 % (w/v) 3,5-Dihydroxytoluol-Monohydrat in 3 M H₂SO₄) getaucht, kurz getrocknet und anschließend auf einer Heizplatte (TLC Plate Heater III, CAMAG) bei 100 °C entwickelt, bis ein deutliches braun-violettes Bandenmuster zu erkennen war. Durch die destruktive Färbung der GSL stehen diese für die weitere Analytik nicht mehr zur Verfügung.

3.7.3 Overlay-Assay

Der Overlay-Assay ist eine sensitive immunchemische Methode und dient der gezielten Detektion individueller GSL in mittels HPTLC getrennten GSL-Gemischen. Das Prinzip beruht auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen, wobei neben Antikörpern auch andere GSL-bindende Proteine, wie Lektine oder Toxine, Verwendung finden. Die Bindung dieser Substanzen an GSL wird unter Verwendung eines GSL-spezifischen Primäntikörpers, eines Enzym-konjugierten Sekundäntikörpers und abschließende Zugabe eines gelösten Chromogens nachgewiesen. Diese Methode ist mit

dem ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) vergleichbar, bei dem jedoch die photometrische Quantifizierung des Enzym-katalysierten Chromogenumsatzes mit einem löslichen Farbstoff erfolgt.

Die für den Overlay-Assay eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 9 bzw. Tabelle 10 verzeichnet. Verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 9: Anti-GSL und Anti-Stx2 Primärantikörper für die GSL-Detektion mittels Overlay-Assay.

Primär-antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Code	Referenz/Hersteller
Anti-Gb3Cer	Huhn IgY	polyklonal	1:2000	JM06/298-	Müthing <i>et al.</i> , 1999
Anti-Gb4Cer	Huhn IgY	polyklonal	1:2000	JM06/206	Müthing <i>et al.</i> , 1999
Anti-Stx2	Maus IgG	monoklonal	1:1000	-	Sifin, Berlin, D

Tabelle 10: Sekundärantikörper für die GSL-Detektion mittels Overlay-Assay.

Sekundärantikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen Anti-Huhn IgY (IgG)	Alkalische	1:2000	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.
	Phosphatase		
Ziege Anti-Maus IgG	Alkalische	1:2000	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.
	Phosphatase		

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Overlay-Assay.

Lösung	Zusammensetzung
Plexigumlösung	0,5 % (w/v) Polyisobutylmethacrylat (Plexigum P28) in wasserfreiem <i>n</i> -Hexan
CMF-PBS	8,0 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,2
Lösung A	1 % (w/v) lipidfreies bovines Serumalbumin (BSA) 0,02 % (w/v) NaN ₃ in CMF-PBS
Lösung B	0,05 % (w/v) Tween 21 0,02 % (w/v) NaN ₃ in CMF-PBS
Glycinpuffer	7,5 g/l Glycin 0,14 g/l ZnCl ₂ 0,2 g/l MgCl ₂ pH 10,4
Substratlösung	0,05 % (w/v) BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- <i>p</i> -toluidinsalz) in Glycinpuffer

3.7.3.1 Antikörper-basierter Overlay-Assay

In Abbildung 10A ist das Prinzip des Antikörper-vermittelten Overlay-Assays schematisch dargestellt. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung der isolierten neutralen GSL wurde die HPTLC-Platte für 45 min unter Feinvakuum im Exsikkator über P₂O₅ getrocknet. Danach wurde das hydrophile Kieselgel fixiert, um das Ablösen vom Glasträger während der anschließenden Inkubationsschritte im wässrigen Milieu zu verhindern. Hierzu wurde die HPTLC-Platte mit Plexigumlösung imprägniert, indem sie für 30 min in einen mit Plexigumlösung versehenen Chromatographietank gestellt und, nach kurzer Trocknung, für weitere 20 min darin inkubiert wurde. Von dem oberen Teil

der HPTLC-Platte wurde das unfixierte Kieselgel entfernt. Die mit Plexigum beschichtete HPTLC-Platte wurde ü. N. bei 37 °C in CMF-PBS inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei RT. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die HPTLC-Platte für 15 min in Lösung A inkubiert. Danach wurde die HPTLC-Platte mit dem 1:2000 in Lösung A verdünnten GSL-spezifischen Primärantikörper für 1 h inkubiert. Die HPTLC-Platte wurde zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern dreimal mit Lösung B gewaschen und anschließend für 1 h mit dem enzymkonjugierten Sekundärantikörper, ebenfalls 1:2000 in Lösung A verdünnt, inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Lösung B wurde die HPTLC-Platte mit Glycinpuffer konditioniert und nach dessen Entfernung mit der Substratlösung versetzt. Abhängig von den aufgetragenen GSL-Mengen und den eingesetzten Primärantikörpern variiert die Dauer der Färbung. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurden die DC-Platten mit Glycinpuffer gewaschen.

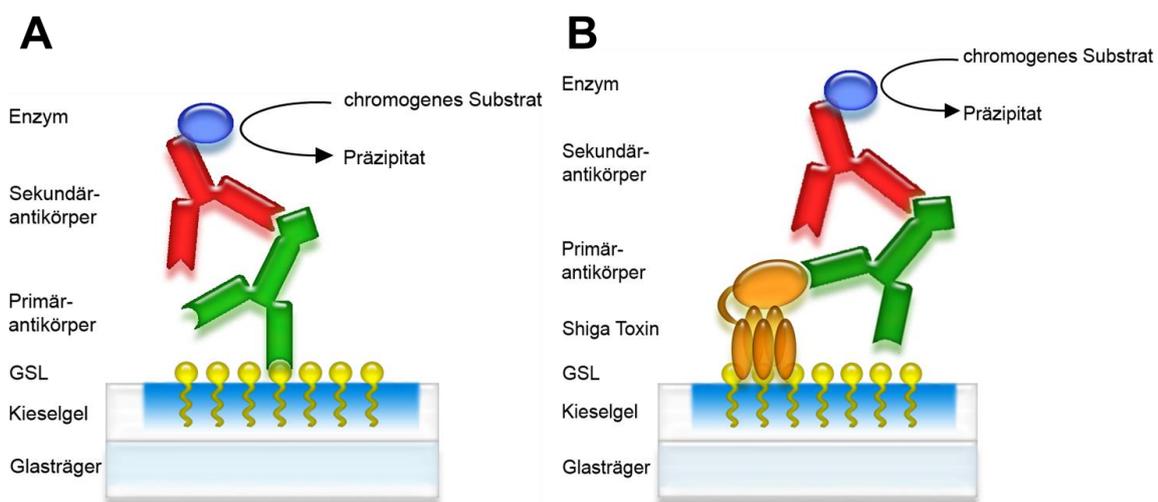


Abbildung 10: Darstellung des Overlay-Assays. Nach dünn-schichtchromatographischer Trennung der GSL erfolgt die Detektion mit einem spezifischen, primären Anti-GSL Antikörper (A) oder mit einem GSL-bindenden Toxin (B) und einem gegen das Toxin gerichteten Primärantikörper. Die Bindung eines enzymkonjugierten Sekundärantikörpers ermöglicht die Visualisierung aufgrund der enzymatischen Umwandlung eines gelösten Chromogens in ein farbiges Präzipitat.

3.7.3.2 Shiga Toxin 2-basierter Overlay-Assay

Bei dem Stx-vermittelten Overlay-Assay erfolgte die Detektion der Zielstrukturen mit GSL-bindendem Stx2 (Abbildung 10B). Nach der Inkubation ü. N. bei 37 °C in CFMF-PBS wurde eine Stx2-Lösung mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml in Lösung A für 1 h auf die HPTLC-Platte gegeben. Es folgten das dreimalige Waschen mit Lösung B und eine einstündige Inkubation mit dem gegen Stx2 gerichteten Primärantikörper in 1:1000-Verdünnung in Lösung A. Im Anschluss wurde die HPTLC-Platte erneut dreimal mit Lösung B gewaschen und für 1 h mit dem enzymgekoppelten Sekundärantikörper 1:2000 in Lösung A inkubiert. Wie zuvor beschrieben, wurde schließlich dreimal mit Lösung B gewaschen, mit Glycinpuffer äquilibriert und die Substratlösung hinzu gegeben.

3.7.4 Phospholipidnachweis

Um eine Übersicht über die in den Zelllinien enthaltenen Phospholipide zu erhalten, wurden diese aus den Zelllinien extrahiert und mittels Molybdänblaufärbung detektiert.

Die Lipidextraktion wurde wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben durchgeführt; abweichend wurde keine alkalische Hydrolyse vorgenommen. Die Extrakte wurden in SDR überführt, entsprechend 5×10^4 Zellen/µl in Chloroform/Methanol (2/1, v/v) aufgenommen und 20 µl Volumina korrespondierend zu einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte für 45 min im Laufmittel für Phospholipide (Chloroform/Methanol/Isopropanol/Triethylamin/0,25 % KCl_{aq} 30/9/25/18/6, v/v/v/v/v). Nach kurzer Trocknung wurde die HPTLC-Platte für 1 sec in eine mit Molybdänblau-Färbelösung (Reagenz A/Reagenz B/Wasser 1/1/4, v/v/v, Tabelle 12) gefüllte Färbekammer getaucht, erneut kurz trocknen gelassen und für 5 sec in eine mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gefüllte Kammer getaucht, um die Hintergrundfärbung zu minimieren.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Reagenzlösungen für die Molybdänblaufärbung.

Reagenz	Komponente
Reagenz A	40,11 g Molybdän(VI)oxid 1 l 25 N Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 6 h kochen
Reagenz B	1,78 g Molybdän 0,5 l Reagenz A

3.7.5 Densitometrische Quantifizierung und Dokumentation

Zur vergleichenden semiquantitativen Auswertung der Orcinol- und immungefärbten Banden wurden die HPTLC-Platten mit einem CD60-Scanner (Desaga; Heidelberg) densitometrisch vermessen. Die Messungen erfolgten im Remissionsmodus bei einer Wellenlänge von 630 nm für immungefärbte bzw. 544 nm für Orcinol-gefärbte GSL und 700 nm für Molybdänblau-gefärbte Phospholipide mit einem Lichtstrahl mit einer Spalthöhe von 0,02 mm und einer Spaltbreite von 3 mm. Mit Hilfe der Software ProQuant[®] (Version 1.06.000, Desaga) wurden die Ergebnisse ausgewertet.

Mit einem handelsüblichen Flachbettscanner (HP Scanjet G4050, Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) erfolgte die Dokumentation der HPTLC-Platten bei einer Auflösung von 600 dpi. Zur Bildbearbeitung wurde die Software Adobe Photoshop (Version CS4, Adobe Systems Inc., San Jose, USA) verwendet.

3.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der aus der Densitometrie erhaltenen Werte und der CD_{50} -Werte der Zytotoxizitäts-Assays wurde Spearmans Rangkorrelationskoeffizient herangezogen. Bei diesem nicht-parametrischen Testverfahren kann für voneinander unabhängige Messwerten ein Koeffizient berechnet werden, welcher Aussagen über eventuelle Abhängigkeiten der Variablen ermöglicht. Den einzelnen Messwerten werden Rangzahlen zugeordnet, so dass eine Rangfolge der Variablen gebildet wird. Bei identischen Messwerten wird diesen das arithmetische Mittel der in Frage kommenden Ränge zugewiesen. Die Rangdifferenzen werden quadriert und die Summe der Rangsummenquadrate gehen in folgende Formel ein:

$$r_s = 1 - \frac{6\sum d_i^2}{(n^2-1)n}$$

mit r_s = Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

d_i = Differenz der Rangzahlen

n = Anzahl der Proben

Für den Rangkorrelationseffizienten r_s gilt:

$$-1 \leq r_s \leq +1$$

Die Annäherung des Korrelationskoeffizienten an ± 1 deutet auf eine Abhängigkeit der Messwertpaare zueinander hin. Durch die Festlegung eines Signifikanzniveaus und den Vergleich des berechneten Rangkorrelationskoeffizienten mit tabellierten kritischen Werten können Aussagen über einen signifikanten Zusammenhang bzw. die Unabhängigkeit der Messwertpaare voneinander gemacht werden (Siegel & Castellan, 1988; Fahrmeir *et al.*, 2007).

3.9 Massenspektrometrische Verfahren

3.9.1 IR-MALDI-o-TOF Massenspektrometrie

Die präliminäre strukturelle Charakterisierung der immungefärbten GSL mittels IR-MALDI-o-TOF MS erfolgte direkt nach dem Overlay-Assay und ermöglichte somit eine schnelle Validierung der immundetektierten GSL. Hierzu wurde zunächst die Plexigum-Schicht von der HPTLC-Platte durch viermaliges Tauchen in reines Chloroform entfernt. Die HPTLC-Platte wurde in 30 mm x 40 mm große Rechtecke geschnitten und mit Hilfe von doppelseitigen Klebestreifen auf dem Probenhalter befestigt. Anschließend wurden als Flüssigmatrix mehrere Tropfen Glycerin direkt auf die zu vermessenen Banden aufgetragen. In Abbildung 11 ist der Ablauf der Kopplung von HPTLC und IR-MALDI-o-TOF MS illustriert.

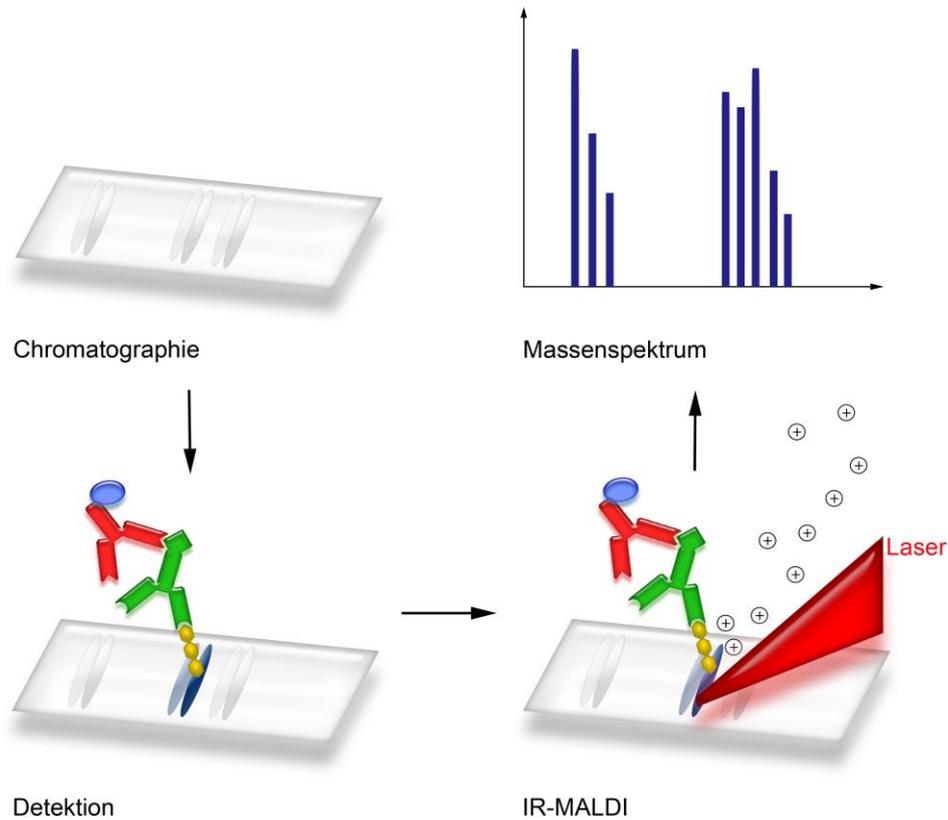


Abbildung 11: Ablauf der direkten Kopplung von HPTLC, Immundetektion und IR-MALDI-o-TOF Massenspektrometrie. Die Messungen der Proben wurden an einem modifizierten o-TOF Prototypen (MDS Sciex, Concord, Kanada) durchgeführt. Der angekoppelte Er:YAG-Laser (Erbium-dotierter Yttrium Aluminium Granat-Laser; Speser GmbH, Berlin) wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$, einer Pulsdauer von etwa 100 ns und einer Pulsfrequenz von 2 Hz betrieben. Dabei wurde eine elliptische Fläche mit den Halbachsen $100 \mu\text{m}$ und $150 \mu\text{m}$ bestrahlt. Im Massenanalysator wurde eine Beschleunigungsspannung von 10 kV angelegt. Alle Messungen erfolgten im Positivionenmodus. Die generierten Massenspektren wurden mit Hilfe der Software MoverZ (Version 2001.02.13, Genomic Solutions, Ann Arbor, USA) ausgewertet.

3.9.2 nanoESI-Q-TOF Massenspektrometrie

Zur detaillierten Strukturaufklärung der GSL wurde die indirekte Kopplung des Overlay-Assays mit der nanoESI-Q-TOF MS angewendet. Dazu wurde ebenfalls das Kieselgelfixativ Plexigum durch viermaliges Eintauchen der HPTLC-Platte in Chloroform entfernt. Nach Trocknung der HPTLC-Platte wurde das Kieselgel mit den

immungefärbten Doppelbanden mit Hilfe eines Skalpell von der HPTLC-Platte abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Um die GSL aus dem Kieselgel zu extrahieren, wurden 300 µl Methanol in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Probe wurde zweimal für 30 s mit dem Vortex Genie 2 (Bender & Hobein GmbH, Bruchsal) durchmischt und anschließend für 15 min bei 14.100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein 1,5 ml SDR überführt und der Extraktionsschritt zweimal wiederholt. Die vereinten Überstände wurden bei 37 °C unter Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Für die nachfolgenden MS-Experimente wurden die getrockneten GSL in definierten Volumina Methanol, supplementiert mit 1 % (v/v) Ameisensäure, gelöst.

Die massenspektrometrischen Messungen der aus dem Kieselgel extrahierten GSL erfolgte mittels nanoESI-Q-TOF MS. Hierzu wurde ein Quadrupol-Flugzeit (Q-TOF) Massenspektrometer (Micromass/Waters; Manchester, UK), ausgestattet mit einem Nanoelektrospray Manipulator, verwendet. Die Proben wurden mit Kapillaren, die mit Hilfe eines Kapillarenziehers (Hilgenberg, Malsfeld) aus Borsilikatglas hergestellt wurden, in die Quelle des Massenspektrometers überführt. Als Desolvatisierungsgas diente Stickstoff. Alle Messungen erfolgten im Positivionenmodus.

Abbildung 12 zeigt schematisch den Ablauf der Extraktion der immundetektierten GSL aus dem Kieselgel der HPTLC-Platte sowie deren massenspektrometrische Charakterisierung mittels nanoESI-Q-TOF MS.

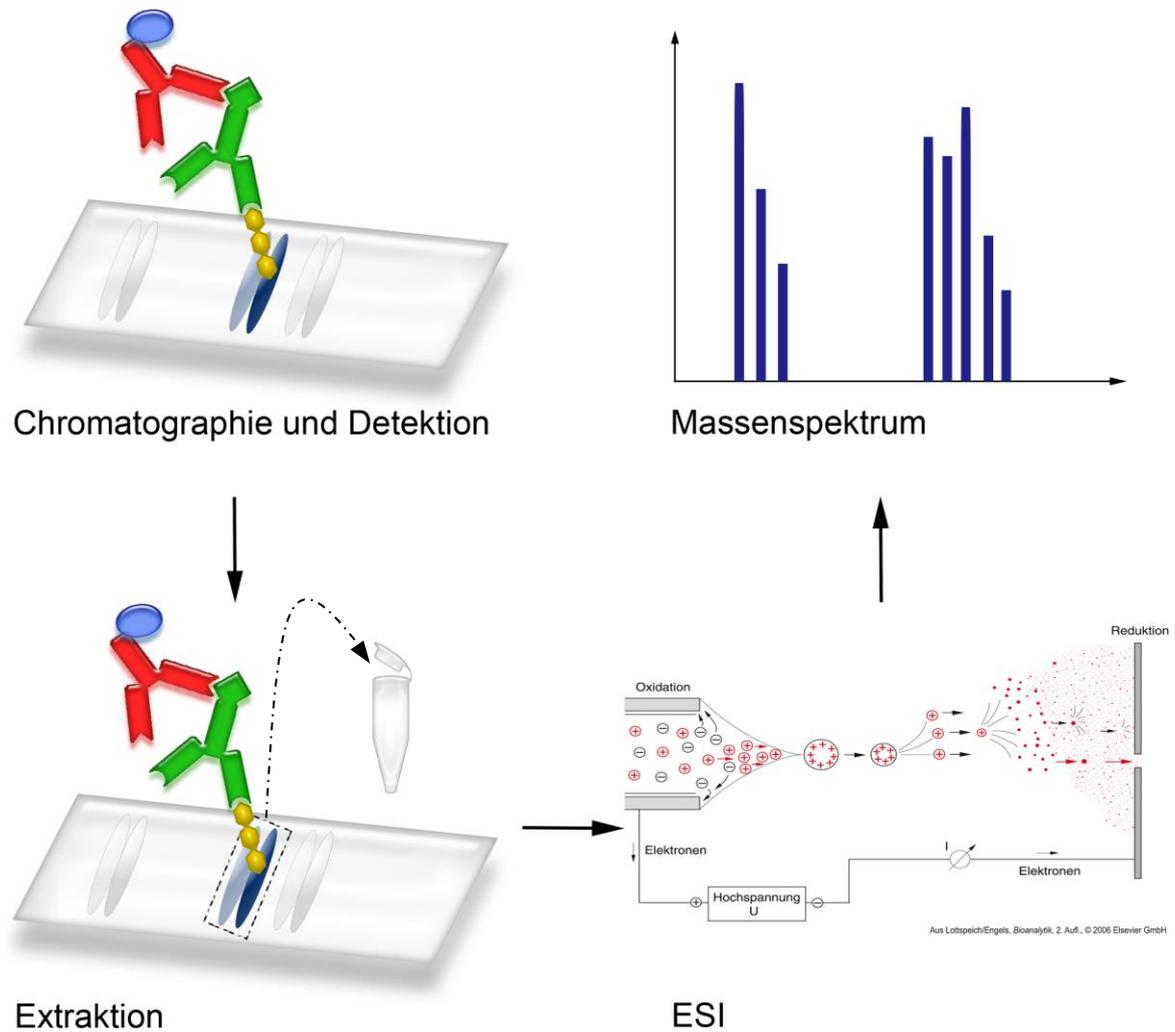


Abbildung 12: Ablauf der Kopplung von HPTLC, Immundetektion, Extraktion der immunpositiven Banden und nanoESI-Q-TOF Massenspektrometrie.

Zur Durchführung von CID (engl.: *collision induced dissociation*)-Experimenten wurden die zu untersuchenden Vorläuferionen mit Hilfe eines Quadrupols selektiert und anschließend in einer Kollisionskammer mit Argon fragmentiert. Hierbei zerfielen die Ionen in spezifische Fragmentionen, wodurch eine strukturelle Charakterisierung der GSL ermöglicht wurde. Die Bezeichnung der Fragmentionen erfolgte nach der Nomenklatur von Domon und Costello (Domon & Costello, 1988) und Adams und Ann (Adams & Ann, 1993).

3.9.3 Sekundärionen Massenspektrometrie

3.9.3.1 Vorbereitung der Zellen

Die TOF-SIMS-Experimente wurden exemplarisch mit der Zelllinie PANC-1 durchgeführt. Bei der Zellvorbereitung wurde unter aseptischen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank gearbeitet. Zunächst wurden die Zellen auf den als Targets dienenden ozonisierten Silizium *wafers* (Si-Mat Silicon Materials, Kaufering) kultiviert. Hierzu wurden die autoklavierten *wafers* in einer 6-well Platte (Greiner Bio-One) ausgelegt. Anschließend wurden jeweils 3 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml in die Kavitäten der 6-well Platte gegeben. Die Zellen wurden 24 h in einem Brutschrank bei 8 % (v/v) CO₂ und 37 °C inkubiert und deren Adhäsion wurde an einem Auflichtmikroskop kontrolliert. Wenn die Zellen in einem Konfluenzstadium von 70-80 % vorlagen, wurden sie für die nachfolgenden TOF-SIMS-Messungen verwendet.

3.9.3.2 Durchführung

Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Arlinghaus (Physikalisches Institut, Massenspektrometrie und Oberflächenphysik, Universität Münster) von Herrn Dipl. Phys. F. Draude und Herrn Dipl. Phys. M. Körsgen durchgeführt. Das für die Messungen verwendete TOF-SI Massenspektrometer wurde am Physikalisches Institut konzipiert und gebaut. Für die massenspektrometrische Messung wurden die mit den PANC-1-Zellen bewachsenen *wafers* aus den 6-well Platten herausgenommen und mit 150 mM Ammoniumacetat in Milli Q Wasser, pH 7 gewaschen (Berman *et al.*, 2008). Anschließend wurden jeweils 5 µl einer *spacer*-Suspension mit einer finalen Konzentration von 84 mg *spacer* / ml 150 mM Ammoniumacetatlösung auf die *wafers* gegeben. Bei den *spacern* handelt es sich um Mikropartikel auf Polystyrolbasis mit einem Durchmesser von 10 µm (1,05 g/ml, Sigma-Aldrich). Die *wafers* wurden durch das Auflegen eines weiteren, goldbedampften *wafers* „gedeckt“. Zum Einfrieren der Proben wurden die *wafers* in flüssiges Propan getaucht, welches höhere Kühlraten aufweist als flüssiger Stickstoff und somit ein schnelleres Einfrieren des Probenmaterials ermöglicht. Die *wafers* wurden dann mittels Gefrierbruchtechnik voneinander getrennt, so

dass auf einem der beiden *wafer* hauptsächlich die Komponenten der apikalen und auf dem anderen *wafer* die der zytosolischen Seite der Plasmamembran verbleiben. Es folgte eine zweistufige Gefriertrocknung der Proben. Anschließend wurden die *wafer* auf einem Schlitten fixiert und über eine Ladevorrichtung und Schleusen mit stetig sinkendem Druck in die Hauptkammer des Massenspektrometers gebracht, in der ein Ultrahochvakuum ($\sim 10^{-8}$ mbar) herrschte. Der Primärionenstrahl bestand aus Bi_3^+ -Clusterionen und wurde mit einer Stromstärke von ~ 25 fA ($\sim 1 \times 10^{13}$ Primärionen/cm²) und einer Energie von 25 keV auf die *wafer*-Oberfläche gelenkt. Die beschossene Fläche betrug $\sim 62,5 \mu\text{m}^2$. Mittels TOF-Analysator wurden die emittierten Sekundärionen detektiert.

4. ERGEBNISSE

Die 15 verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurden zunächst hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Stx2 untersucht. Hierzu wurde ein Zytotoxizitäts-Assay mit unterschiedlichen Stx2-Konzentrationen durchgeführt. Um die mögliche Ursache für die differierende Wirkung von Stx2 auf die einzelnen Zelllinien zu erklären, wurde anschließend der Gehalt an Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer in den Zelllinien bestimmt. Zum einen wurde dazu die Expression der entsprechenden Glykosyltransferasen α 1,4-GalT (Gb3Cer-Synthase) und β 1,3-GalNAcT (Gb4Cer-Synthase) mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Zum anderen erfolgte die immunchemische Detektion der GSL nach Extraktion aus den Zellkulturen und dünnschichtchromatographischer Trennung der GSL-Mischungen. Die exakten Strukturen der Gb3Cer- und Gb4Cer-Moleküle wurden nach Immundetektion mit zwei verschiedenen massenspektrometrischen Verfahren bestimmt: Mit Hilfe der IR-MALDI-o-TOF MS wurden die Stx-Rezeptoren direkt auf der Kieselgelplatte und mittels nanoESI-Q-TOF MS nach GSL-Extraktion aus dem Kieselgel charakterisiert. Abschließend wurde die Phospholipidzusammensetzung von ausgewählten Pankreaskarzinomzelllinien durch Phospholipidfärbung der Gesamtlipidextrakte bestimmt. Mittels SIMS wurde abschließend eine mögliche Kolokalisation von bestimmten Phospholipiden und den Stx2-Rezeptoren untersucht.

4.1 Sensitivität von Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Shiga Toxin 2

Zur Evaluation der zytotoxischen Wirkung von Stx2 auf die unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien (Tabelle 1) wurden Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt. Die Zellen wurden über 48 h mit Stx2-Konzentrationen zwischen 0,1 pg/ml und 10 μ g/ml inkubiert. Abgelöste Zellen wurden ausgewaschen und die verbliebenen adhärenen Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Als Maß für die Sensitivität der Zellen gegenüber Stx2 wurde die Absorption des Kristallvioletts photometrisch bei einer Wellenlänge von

$\lambda = 570$ nm bestimmt. Die Ergebnisse wurden als prozentuale Anteile der nach Stx2-Inkubation vorhandenen vitalen Zellen bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen (= 100 % Vitalität) angegeben. Zunächst werden die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays von Zelllinien aus Primärtumoren des humanen Pankreaskarzinoms vorgestellt, im nächsten Abschnitt die aus Lebermetastasen und dann die aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen abstammenden Zelllinien.

Primärtumoren

Abbildung 13 zeigt die zytotoxische Wirkung von Stx2 auf die sechs Pankreaskarzinomzelllinien aus Primärtumoren bei steigenden Toxinkonzentrationen. Es konnte festgestellt werden, dass die Zelllinien unterschiedlich stark auf Stx2 reagierten. Die höchste Sensitivität gegenüber Stx2 weist die Zelllinie Pa-Tu-8902 auf. Bereits bei einer Stx2-Konzentration von 10 pg/ml wurde der CD_{50} -Wert erreicht. Bei weiter steigenden Stx2-Konzentrationen nahm die Vitalität stetig ab, bis die Pa-Tu-8902-Zellen bei 1×10^7 pg/ml Stx2 nur noch 8 % der Vitalität aufwiesen. MIA PaCa-2-Zellen zeigten bei den niedrigen Stx2-Konzentrationen von 1×10^{-1} bis 1×10^2 pg/ml keine Beeinträchtigung ihrer Vitalität. Bei dieser Zelllinie war eine zellschädigende Wirkung erst ab einer Stx2-Konzentration von $> 1 \times 10^2$ pg/ml zu beobachten. Der CD_{50} -Wert lag bei $6,8 \times 10^5$ pg/ml. Bei der höchsten eingesetzten Stx2-Konzentration von 1×10^7 pg/ml wiesen Zellen von MIA PaCa-2 38 % Vitalität auf. Die Zelllinien PT45P1 und Capan-2 ließen bei Toxinkonzentrationen von $5,5 \times 10^6$ pg/ml bzw. $5,8 \times 10^6$ pg/ml einen ähnlichen CD_{50} -Wert erkennen. Die Abnahme der Vitalität verlief allerdings unterschiedlich. Beide Zelllinien zeigten bereits bei der niedrigsten Stx2-Konzentration mit 86 % bzw. 91 % eine deutliche Verringerung ihrer Vitalität. Während bei PT45P1-Zellen erstaunlicherweise zunächst ein leichter Anstieg der Vitalität zu beobachten war, sank die Vitalität ab einer Stx2-Konzentration von 1×10^3 pg/ml stetig ab. Bei BxPC-3-Zellen verminderte sich die Vitalität bis auf 60 % bei 1×10^2 pg/ml, blieb bis zu einer Stx2-Konzentration von 1×10^4 pg/ml relativ konstant und fiel schließlich auf 31 % der Vitalität ab. Der CD_{50} -Wert liegt für BxPC-3-Zellen bei $4,5 \times 10^5$ pg/ml. Den geringsten zytotoxischen Einfluss hatte Stx2 auf PANC-1-Zellen. Zwischen Stx2-Konzentrationen von 1×10^{-1} und 1×10^5 pg/ml blieb die Zellvitalität mit einem Wert von 95 % relativ

konstant. Erst bei einer Erhöhung der Stx2-Konzentration wurde die Vitalität beeinträchtigt und sank bei 1×10^7 pg/ml auf 65 % ab, weshalb bei den hier eingesetzten Stx2-Konzentrationen kein CD_{50} -Wert für PANC-1 ermittelt werden konnte (Storck *et al.*, 2012).

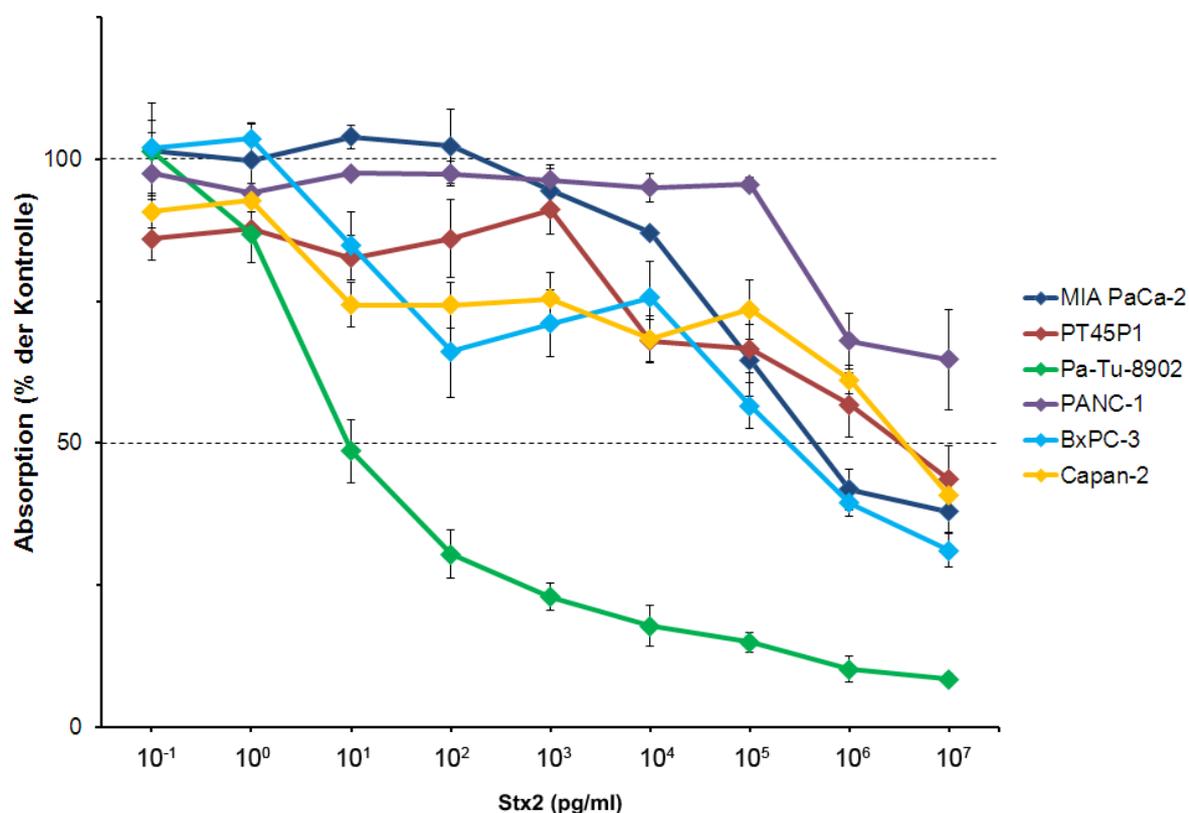


Abbildung 13: Zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Zelllinien aus Primärtumoren des humanen Pankreaskarzinoms. Die Zelllinien wurden in 96-well Platten bis zur 70 %igen Subkonfluenz kultiviert und mit ansteigenden Stx2-Konzentrationen für 48 h inkubiert. Nach Entfernung abgelöster Zellen und Färbung der verbliebenen adhären Zellen mit Kristallviolett erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei $\lambda = 570$ nm. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen und werden als prozentualer Anteil der Absorption von unbehandelten Kontrollzellen dargestellt.

Lebermetastasen

Der zytotoxische Effekt von Stx2 auf Pankreaskarzinomzelllinien aus Lebermetastasen ist in

Abbildung 14 dargestellt. Den gravierendsten Einfluss hatte Stx2 auf die Zelllinie Pa-Tu-8988T. Bemerkenswerterweise war die Vitalität bei der niedrigsten Stx2-Konzentration von 1×10^{-1} pg/ml höher als die der Kontrollzellen, jedoch nahm die Vitalität rapide ab, so dass der CD_{50} -Wert bereits bei $9,4 \times 10^{-1}$ pg/ml erreicht wurde. Außerdem war bereits ab einer Stx2-Konzentration von 1×10^2 pg/ml lediglich eine Vitalität von 12 % zu verzeichnen, die auch bei weiter steigenden Stx2-Konzentrationen nicht weiter abnahm. Die Vitalität der Zelllinie SU.86.86 stieg zunächst von 85 % auf etwas über 100 % an. Der CD_{50} -Wert konnte für eine Stx2-Konzentration von $9,4 \times 10^1$ pg/ml bestimmt werden. Ab einer Stx2-Konzentration von 5×10^4 pg/ml blieb die Vitalität von SU.86.86-Zellen relativ konstant bei 11 %. Eine zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Capan-1-Zellen konnte erst ab einer Konzentration von 1×10^5 pg/ml beobachtet werden. Für Capan-1 wurde der CD_{50} -Wert bei einer Konzentration von $1,4 \times 10^6$ pg/ml ermittelt. Bei der höchsten, eingesetzten Stx2-Konzentration überlebten nur noch 40 % der Zellen. Für die Zelllinien S2-007 und S2-028 konnten keine CD_{50} -Werte bestimmt werden, da die Vitalität bei den eingesetzten Stx2-Konzentrationen nicht unter 56 % bzw. 64 % fiel. Bei der Zelllinie S2-007 konnte jedoch bei 1×10^5 pg/ml als ungewöhnlicher Toxineffekt zunächst ein leichter Anstieg der Vitalität beobachtet werden, die dann aber wieder stetig abnahm (Storck *et al.*, 2012).

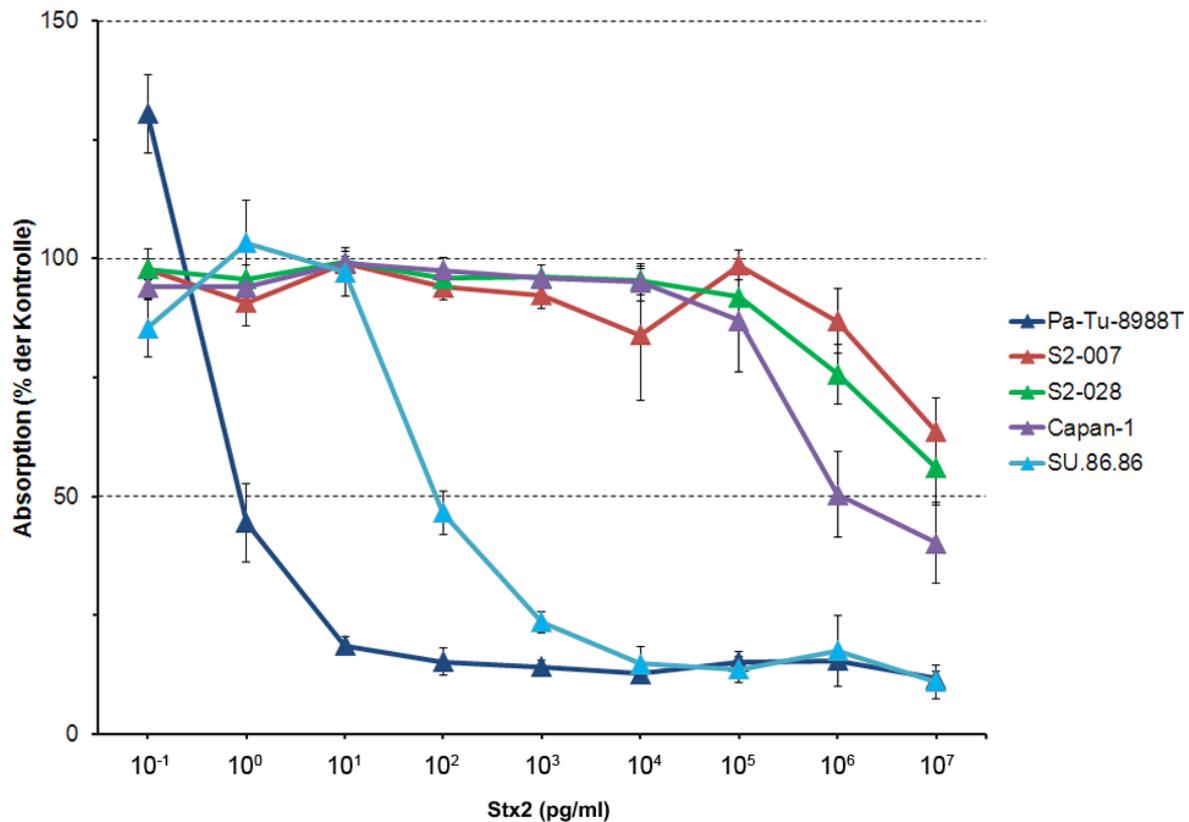


Abbildung 14: Zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Zelllinien aus Lebermetastasen des humanen Pankreaskarzinoms. Die Zelllinien wurden in 96-well Platten bis zur 70 %igen Subkonfluenz kultiviert und mit ansteigenden Stx2-Konzentrationen für 48 h inkubiert. Nach Entfernung abgelöster Zellen und Färbung der verbliebenen adhärenen Zellen mit Kristallviolett erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei $\lambda = 570$ nm. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen und werden als prozentualer Anteil der Absorption von unbehandelten Kontrollzellen dargestellt.

Aszites- und Lymphknotenmetastasen

Abbildung 15 veranschaulicht die Sensitivität von Pankreaskarzinomzelllinien aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen gegenüber Stx2. In dem gewählten Konzentrationsbereich ließ sich kein konzentrationsabhängiger zellschädigender Effekt auf die AsPC-1-Zelllinie feststellen. Da die Vitalität bereits bei der geringsten Stx2-Konzentration von 0,1 pg/ml um mehr als 50 % reduziert war, dann aber wieder trotz zunehmender Stx2-Konzentration leicht anstieg, konnte kein eindeutiger CD_{50} -Wert bestimmt werden. Bei einer Toxinkonzentration von 1×10^7 pg/ml nahm die Vitalität letztendlich bis auf 22 % ab. Eine zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Hs 766T-Zellen wurde ab einer Konzentration von mehr als 1×10^1 pg/ml beobachtet. Der CD_{50} -Wert wurde bei $8,8 \times 10^3$ pg/ml bestimmt und bei einer Konzentration von 1×10^7 pg/ml lag lediglich eine Vitalität von 20 % vor. Die beiden Zelllinien HPAF-II und MPanc-96 reagierten insofern vergleichbar auf Stx2, als dass ihre Vitalität über einen weiten Konzentrationsbereich nahezu unverändert hoch um die 98 % blieb. HPAF-II-Zellen wiesen ab einer Konzentration von $> 1 \times 10^4$ pg/ml eine stetige Abnahme hinsichtlich ihrer Vitalität auf, während MPanc-96-Zellen zwischen 1×10^3 pg/ml und 1×10^6 pg/ml eine leichte Steigerung ihrer Vitalität von 91 % auf 98 % erkennen ließen, die dann abrupt auf 58 % bei Einsatz der höchsten Stx2-Konzentration absank. Die Zelllinien wiesen bei der höchsten Stx2-Konzentration von 1×10^7 pg/ml eine Vitalität von 70 % bei HPAF-II bzw. 58 % bei MPanc-96 auf, so dass kein CD_{50} -Wert berechnet werden konnte (Storck *et al.*, 2012).

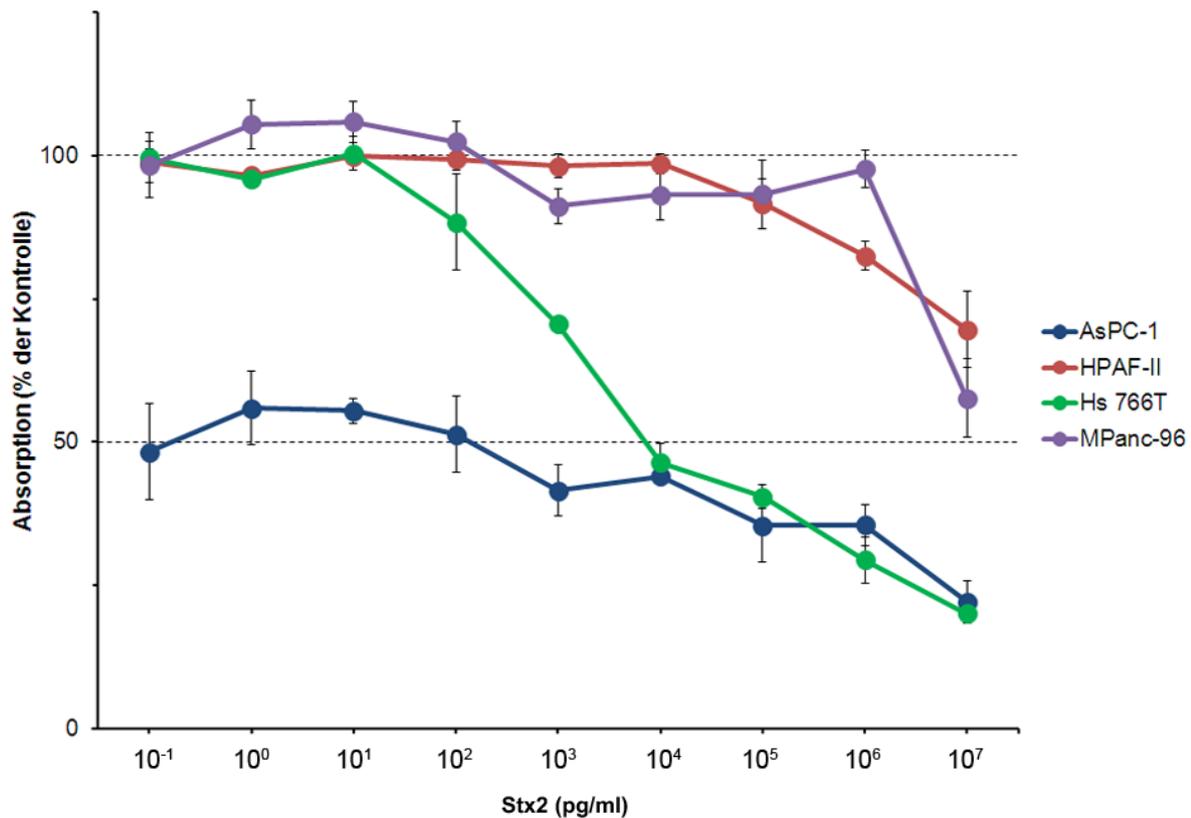


Abbildung 15: Zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Zelllinien des humanen Pankreaskarzinoms aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen. Die Zelllinien wurden in 96-well Platten bis zur 70%igen Subkonfluenz kultiviert und mit ansteigenden Stx2-Konzentrationen für 48 h inkubiert. Nach Entfernung abgelöster Zellen und Färbung der verbliebenen adhären Zellen mit Kristallviolett erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei $\lambda = 570$ nm. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen und werden als prozentualer Anteil der Absorption von unbehandelten Kontrollzellen dargestellt.

Rangzuordnung nach CD_{50} -Werten als Maß für die Sensitivität der Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Stx2

Nach Bestimmung der CD_{50} -Werte konnten den Zelllinien Ränge entsprechend ihrer Sensitivität zugeordnet werden, wobei die Rangzuordnung entsprechend abnehmender CD_{50} -Werte, die als Maß für die Sensitivität der Zelllinien gegenüber Stx2 zugrunde gelegt wurden, erfolgte. Rang 1 erhielt die empfindlichste Zelllinie mit dem niedrigsten CD_{50} -Wert, Rang 2 die Zelllinie mit dem zweitniedrigsten CD_{50} -Wert usw. Bei den sechs

Zelllinien, für die kein CD_{50} -Wert bestimmt werden konnte, erfolgte eine Zuordnung der gemittelten Rangzahl 12,5. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: CD_{50} -Werte als Maß für die Sensitivität der Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Stx2 und entsprechende Rangzuordnungen.

Zelllinie	Ursprung	Zytotoxizität von Stx2	
		CD_{50} [pg/ml]	Rang
MIA PaCa-2		$6,8 \times 10^5$	6
PT45P1		$5,5 \times 10^6$	8
Pa-Tu-8902	Primärtumor	$9,7 \times 10^0$	2
PANC-1		n. b.*	12,5
BxPC-3		$4,5 \times 10^5$	5
Capan-2		$5,8 \times 10^6$	9
Pa-Tu-8988T		$9,4 \times 10^{-1}$	1
S2-007		n. b.*	12,5
S2-028	Lebermetastase	n. b.*	12,5
Capan-1		$1,4 \times 10^6$	7
SU.86.86		$9,4 \times 10^1$	3
AsPC-1	Aszitesmetastase	n. b.*	12,5
HPAF-II		n. b.*	12,5
Hs 766T	Lymphknoten-	$8,8 \times 10^3$	4
MPanc-96	metastase	n. b.*	12,5

*nicht bestimmbar

Die CD_{50} -Werte als Maß für die zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Pankreaskarzinomzelllinien ließen keinen Zusammenhang zwischen der Sensitivität der Zelllinien gegenüber Stx2 und deren Ursprungsgewebe erkennen. In allen drei Ursprungsgewebsgruppen sind Zelllinien vertreten, die sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit gegenüber Stx2 aufwiesen. Die Toleranz gegenüber Stx2 in einem weiten Konzentrationsbereich verdeutlichte sich hier in Form von nicht bestimmbareren CD_{50} -Werten. Bei der Betrachtung der zwei Aszites- und zwei Lymphknotenmetastasen fiel jedoch auf, dass in dieser Gruppe eine überproportional

hohe Anzahl an „widerstandsfähigen“ Zelllinien auftrat. Andererseits zeigte die Lymphknotenmetastasen-Zelllinie Hs 766T die vierthöchste Sensitivität, weshalb keine statistisch haltbare Aussage zu einer generell erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Stx2 von Aszites- und Lymphknotenmetastasen gemacht werden kann, zumal nur vier Zelllinien untersucht wurden. Außerdem kann die AsPC-1-Zelllinie als die empfindlichste Zelllinie angesehen werden, auch wenn kein eindeutiger CD_{50} -Wert bestimmt werden konnte und die Ergebnisse dieser Zelllinie aufgrund der insgesamt niedrigen Vitalität nicht eindeutig zu interpretieren waren.

4.2 Nachweis der Expression der Glykosyltransferasen α 1,4-GalT und β 1,3-GalNAcT sowie der Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer in Pankreaskarzinomzelllinien

4.2.1 Expression der Glykokosyltransferasen α 1,4-GalT und β 1,3-GalNAcT

Um zu untersuchen, ob die Pankreaskarzinomzelllinien über die Gene für die Biosynthese der Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer verfügen, wurde die Expression der α 1,4-Galaktosyltransferase (α 1,4-GalT) und der β 1,3-*N*-Acetylgalaktosaminyltransferase (β 1,3-GalNAcT) (siehe Abbildung 3) mit Hilfe der RT-PCR analysiert. Als Template wurden identische Mengen von 200 ng RNA eingesetzt, um anhand der Fluoreszenzintensitäten die Expression der Transferasen der Zelllinien näherungsweise vergleichen zu können. Die spezifischen Primer sind in Tabelle 4 (siehe Kapitel 3.4.3) aufgelistet. Nach Amplifikation wurden die Proben in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht wurden die Transkripte sichtbar gemacht und die Intensitäten verglichen, die anschließend auf den Wert des intensivsten Signals normiert wurden. Mit Hilfe von DNA-Fragmenten bekannter Größe (100 bp Leiter, Invitrogen) erfolgte die Größenzuordnung der Amplifikate. Als Positivkontrolle diente ein RNA-Isolat der α 1,4-GalT- und β 1,3-GalNAcT-exprimierenden Zelllinie HBMEC, wohingegen bei der Negativkontrolle

anstelle von RNA das entsprechende Volumen an Wasser eingesetzt wurde (siehe Kapitel 3.4.3).

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis der α 1,4-GalT und der β 1,3-GalNAcT für die 15 Pankreaskarzinomzelllinien zusammengefasst dargestellt. Alle Zelllinien des humanen Pankreaskarzinoms exprimieren das Gen für die α 1,4-GalT und, mit Ausnahme von MIA PaCa-2, für die β 1,3-GalNAcT.

Primärtumoren

Die Expression der α 1,4-GalT und β 1,3-GalNAcT in Primärtumoren des Pankreaskarzinoms ist in Abbildung 16A dargestellt. Die Zelllinien PT45P1 und BxPC-3 ließen die stärkste α 1,4-GalT-Expression mit theoretisch 401 bp großen Amplifikaten (siehe Tabelle 4) erkennen. Auch bei den Zelllinien Pa-Tu-8902, PANC-1 und Capan-2 konnte eine moderate α 1,4-GalT-Expression detektiert werden. Dagegen wurde nur ein schwaches Signal bei der Zelllinie MIA PaCa-2 erhalten. Bei der RT-PCR-Analyse der β 1,3-GalNAcT-Expression wiesen die Zelllinien PT45P1, Pa-Tu-8902, PANC-1 und Capan-2 eine eindeutige Amplifikation der 603 bp großen DNA-Sequenzen (siehe Tabelle 4) auf, wohingegen BxPC-3 eine etwas schwächere Expression erkennen ließ. Dagegen konnte kein Signal bei MIA PaCa-2 nachgewiesen werden.

Lebermetastasen

In allen Zelllinien, die aus Lebermetastasen des Pankreaskarzinoms stammen, konnte ebenfalls mit Hilfe der RT-PCR die Expression der α 1,4-GalT nachgewiesen werden (Abbildung 16B), wobei ein besonders starkes Signal bei SU.86.86 erhalten wurde. Während in den Zelllinien S2-028 und Capan-1 eine moderate α 1,4-GalT-Expression detektiert wurde, wiesen Pa-Tu-8988T und S2-007 vergleichsweise etwas geringere Amplifikatmengen der α 1,4-GalT auf. Auch die aus Lebermetastasen des Pankreaskarzinoms isolierten Zelllinien wiesen alle eine eindeutige Expression der β 1,3-GalNAcT auf, wobei für S2-007 eine relativ geringe Signalintensität erhalten wurde.

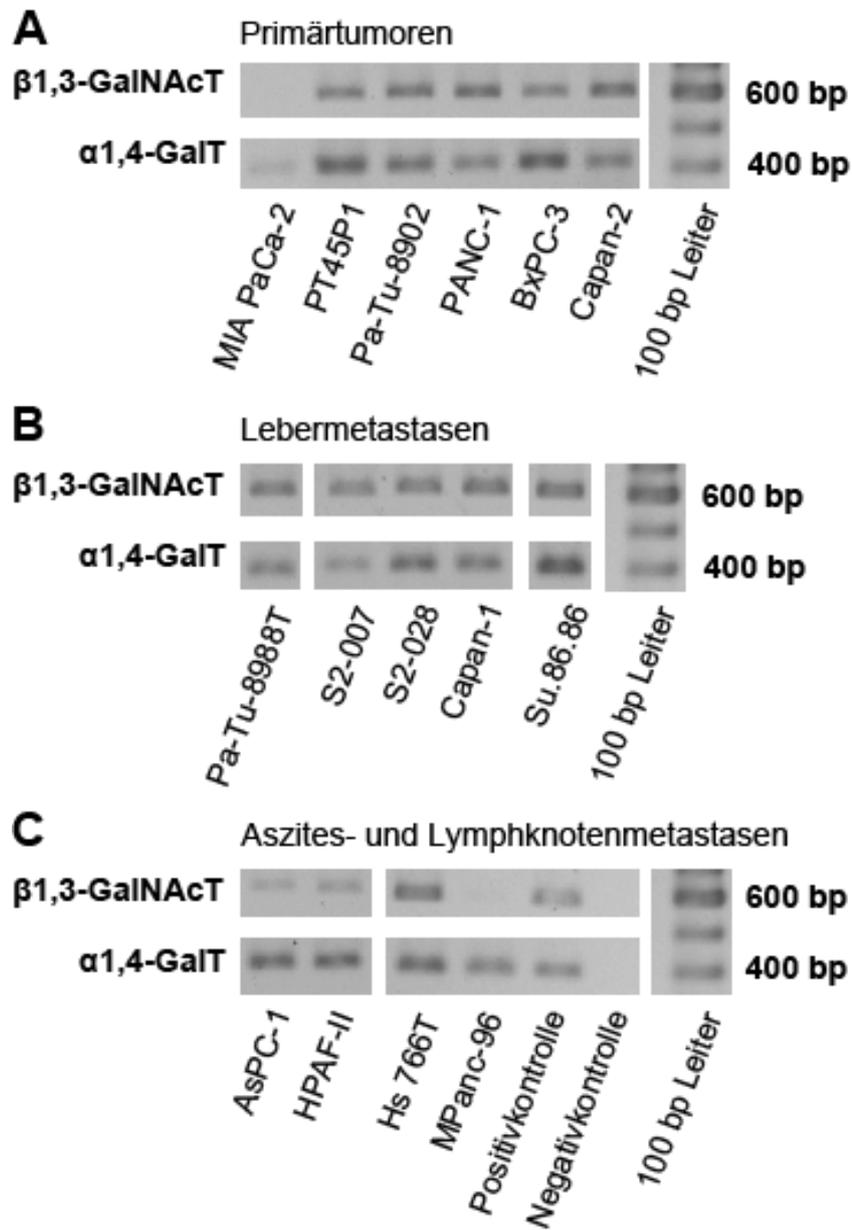


Abbildung 16: RT-PCR-Amplifikate der α 1,4-GalT und der β 1,3-GalNAcT aus Zelllinien der Primärtumoren (A), Lebermetastasen (B) und Aszites- und Lymphknotenmetastasen (C). Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1%igen (w/v) Agarosegel im Vergleich zu DNA-Referenzfragmenten definierter Größe (100 bp Leiter) elektrophoretisch getrennt. Nach Ethidiumbromidfärbung wurden die Ergebnisse unter UV-Licht dokumentiert (hier mit inversen Farben dargestellt).

Aszites- und Lymphknotenmetastasen

Die α 1,4-GalT-Expression in Zelllinien aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen des Pankreaskarzinoms (Abbildung 16C) fiel bei AsPC-1, HPAF-II und Hs 766T moderat, bei MPanc-96 dagegen etwas schwächer aus. Während Hs 766T-Zellen ein eindeutiges Transkript hinsichtlich der β 1,3-GalNAcT-Expression erkennen ließen, zeigten die Zelllinien aus Aszites- (AsPC-1 und HPAF-II) und Lymphknotenmetastasen (Hs 766T und MPanc-96) eine vergleichsweise geringe β 1,3-GalNAcT-Expression.

Rangzuordnung nach Expression der α 1,4-GalT und der β 1,3-GalNAcT

Die relativen Intensitäten der Fluoreszenzsignale der Ethidiumbromid-gefärbten Banden wurden densitometrisch bestimmt, wobei die höchste Signalintensität auf 100 % gesetzt und alle weiteren Signale diesbezüglich normiert wurden. Anschließend wurden den Zelllinien diesbezüglich Ränge zugeordnet, wobei Rang 1 der höchsten und Rang 15 der niedrigsten Expression entsprach. Tabelle 14 fasst die Ergebnisse der normierten Signalintensitäten und der daraus abgeleiteten Rangzuordnung zusammen.

Der semiquantitative Nachweis der Expression beider Glykosyltransferasen ergab, dass kein Zusammenhang zwischen den Expressionsstärken und dem Tumorausprung der Zelllinien besteht. Lediglich die aus Aszitesmetastasen isolierten Zelllinien zeigten mit den Rängen 4 und 6 bzw. 13 und 12 eine vergleichbare Genexpression für die α 1,4-GalT und die β 1,3-GalNAcT. Dagegen variierte die Expression bei Zelllinien aus Primärtumoren, Leber- und Lymphknotenmetastasen sehr stark. So wurde beispielsweise in der Gruppe der Primärtumor-Zelllinien neben der zweit- und dritthöchsten α 1,4-GalT-Expression für die Zelllinien BxPC-3 und PT45P1 auch die niedrigste Expression für die Zelllinie MIA PaCa-2 bestimmt. Die Expression der β 1,3-GalNAcT variierte in der Gruppe der Zelllinien aus Primärtumoren sogar von der höchsten (PANC-1) bis zur niedrigsten Expression (MIA PaCa-2). Bei den aus Lebermetastasen abstammenden Zelllinien wurde im Fall der α 1,4-GalT sowohl die höchste (SU.86.86) als auch die zweitniedrigste Signalintensität (S2-007) detektiert. Bezüglich der β 1,3-GalNAcT belegten diese Zelllinien Ränge entsprechend einer relativ hohen (4) und einer verhältnismäßig niedrigen (11) Expression. Den von Lymphknotenmetastasen

stammenden Zelllinien konnten die Ränge 5 und 13 in Bezug auf die α 1,4-GalT-Expression bzw. 6 und 14 hinsichtlich der β 1,3-GalNAcT-Expression zugeordnet werden, so dass auch hier eine relativ hohe Varianz beobachtet wurde.

Die zugeordneten Ränge in Tabelle 14 werden weiter bei der statistischen Auswertung in Kapitel 4.3 für die Bestimmung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman als Maß für die Korrelation zwischen der Expression der jeweiligen Glykosyltransferase und des entsprechenden GSL verwendet.

Tabelle 14: Signalintensitäten und Rangzuordnung der Pankreaskarzinomzelllinien bezüglich der Expression der α 1,4-Gal- und der β 1,3-GalNAc-Transferase.

Zelllinie	Ursprung	α 1,4-GalT		β 1,3-GalNAcT	
		Signalstärke [%]	Rang	Signalstärke [%]	Rang
MIA PaCa-2		35,4	15	0	15
PT45P1		88,4	3	82,0	9
Pa-Tu-8902	Primärtumor	73,9	8	94,7	3
PANC-1		60,5	11	100	1
BxPC-3		94,6	2	77,8	10
Capan-2		65,4	10	99,6	2
Pa-Tu-8988T		59,9	12	87,4	7
S2-007		50,2	14	75,3	11
S2-028	Lebermetastase	78,9	7	83,1	8
Capan-1		69,4	9	90,4	5
SU.86.86		100	1	94,6	4
AsPC-1	Aszitesmetastase	79,3	4	49,9	13
HPAF-II		79,1	6	56,6	12
Hs 766T	Lymphknoten-	79,2	5	89,5	6
MPanc-96	metastase	57,4	13	30,4	14

4.2.2 Orcinolfärbung der neutralen GSL aus humanen

Pankreaskarzinomzelllinien

Um eine Übersicht über die von den 15 Pankreaskarzinomzelllinien synthetisierten GSL zu erhalten, wurde nach der Lipidextraktion der Zellkulturen und anschließender alkalischer Hydrolyse der koextrahierten Phospholipide eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt, um die neutralen GSL von den negativ geladenen Gangliosiden zu trennen (Kapitel 3.5). Die neutralen GSL-Fractionen der Karzinomzelllinien wurden mit identischen Zellzahlen entsprechend 1×10^6 Zellen auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, dünnschichtchromatographisch getrennt (Kapitel 3.7.1) und anschließend mit Orcinol angefärbt (Kapitel 3.7.2). Abbildung 17 zeigt die Orcinolgefärbten neutralen GSL der 15 Pankreaskarzinomzelllinien. Als Referenzen dienten eine GSL-Mischung, die äquimolare Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer enthielt (Referenz 1), und neutrale GSL aus humanen Erythrozyten (Referenz 2) (siehe Tabelle 7).

Vorab ist anzumerken, dass GSL häufig als Doppelbanden detektiert werden, was aus der Variabilität der Fettsäurekettenlängen resultiert. Dabei beinhaltet die obere Bande GSL-Spezies mit langen, meist C22- bis C24-Fettsäureresten, während die untere Bande hydrophilere GSL mit kurzer C16-Fettsäure repräsentiert.

Primärtumoren

In den Fraktionen der neutralen GSL aus den von Primärtumoren abstammenden Zelllinien (Abbildung 17A) konnten durch den Vergleich mit der GSL-Referenzmischung 2 (siehe Tabelle 7) sowohl MHC und Lc2Cer als auch Gb3Cer und Gb4Cer tentativ nachgewiesen werden. Dabei variierte der GSL-Gehalt in den Fraktionen der Zelllinien erheblich. Ein relativ hoher Gb3Cer-Gehalt war in den Präparationen der Zelllinien BxPC-3 und Pa-Tu-8902 nachweisbar. Die vier Zelllinien MIA Pa-Ca-2, PT45P1, PANC-1 und Capan-2 wiesen vergleichsweise geringe Mengen an und Gb3Cer auf. Das neutrale GSL Gb4Cer war mittels Orcinolfärbung nur in den Zelllinien PT45P1, Pa-Tu-8902, PANC-1 und BxPC-3 nachweisbar, nicht aber in MIA PaCa-2- und Capan-2-Zellen.

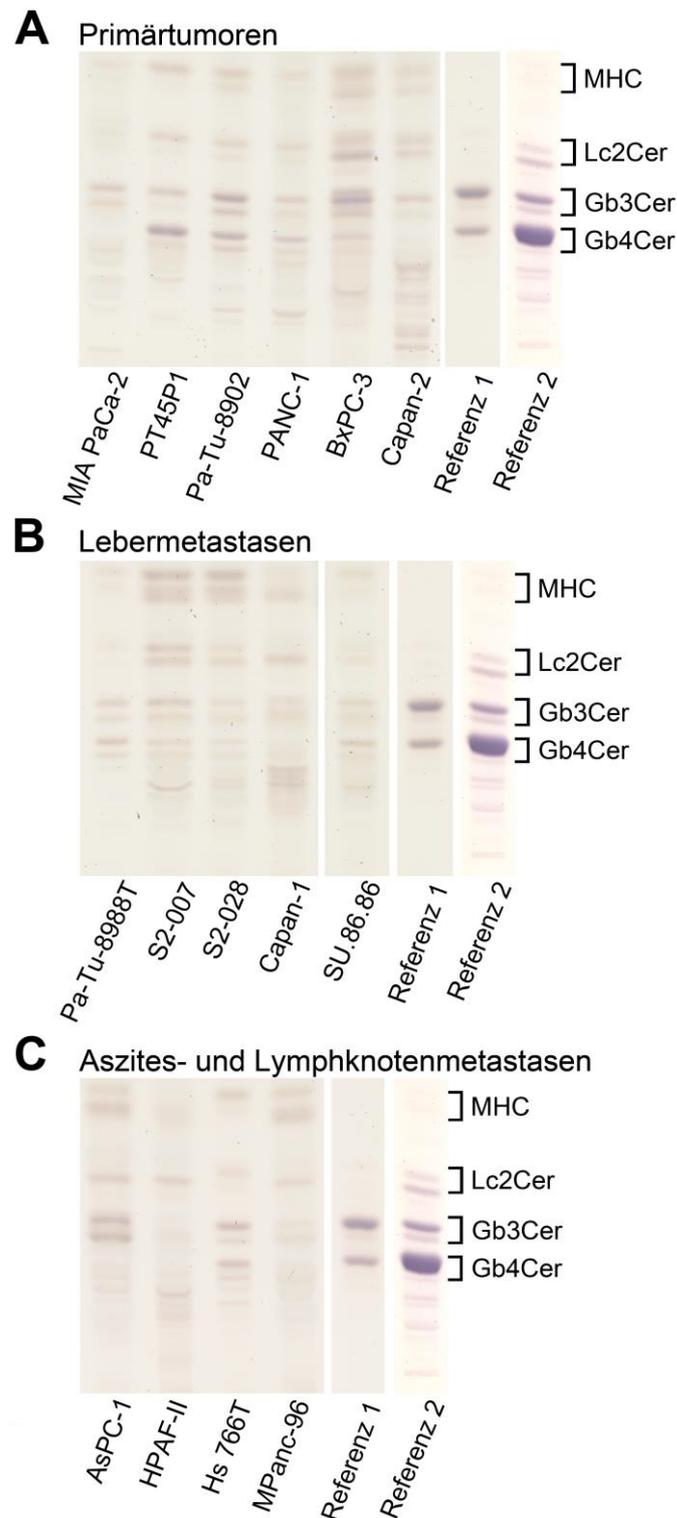


Abbildung 17: Orcinolfärbung von neutralen GSL aus Zelllinien der Primärtumoren (A), Lebermetastasen (B) und Aszites- und Lymphknotenmetastasen (C). Es wurden Aliquots entsprechend 1×10^6 Zellen auf die HPTLC-Platte appliziert und dünnschichtchromatographisch separiert. Als Referenzen dienen $10 \mu\text{g}$ der äquimolaren GSL-Mischung von Gb3Cer und Gb4Cer (Referenz 1) und $12,5 \mu\text{g}$ der neutralen GSL aus humanen Erythrozyten (Referenz 2).

Dies bestätigt die Ergebnisse der Expressionsstudie zu den Glykosyltransferasen in Kapitel 4.2.1, da analog zu der fehlenden β 1,3-GalNAcT-Expression kein Gb4Cer nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich der aus Primärtumoren stammenden Zelllinien waren MHC und Lc2Cer ebenfalls am stärksten in den Isolaten aus BxPC-3 und Pa-Tu-8902 vertreten, wohingegen die Zelllinien MIA Pa-Ca-2, PT45P1, PANC-1 und Capan-2 vergleichsweise geringe Mengen an MHC, Lc2Cer und Gb3Cer aufwiesen.

Lebermetastasen

Die Ergebnisse der Orcinolfärbung der neutralen GSL der Lebermetastasen sind in Abbildung 17B dargestellt. Alle Zelllinien synthetisierten Gb3Cer, Gb4Cer, MHC und Lc2Cer. Dabei wiesen die Präparationen aus den Zelllinien S2-007 und S2-028 die größten Mengen an GSL auf, während die Zelllinien Capan-1 und SU.86.86 moderate und die Zelllinie Pa-Tu-8988T im Vergleich zu den anderen Zelllinien nur geringe Mengen an neutralen GSL erkennen ließen.

Aszites- und Lymphknotenmetastasen

Abbildung 17C zeigt, dass in den neutralen GSL-Fractionen der aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen stammenden Zelllinien Gb3Cer enthalten war. Ein sehr hoher Gb3Cer-Gehalt wurde in der Zelllinie AsPC-1 festgestellt. Dagegen wurde mittels Orcinolfärbung Gb4Cer ausschließlich in den untersuchten Zelllinien der Lymphknotenmetastasen Hs 766T nachgewiesen. Die Vorläuferstruktur von Gb3Cer, das Lc2Cer, wurde ebenfalls in allen Zelllinien dieser Gruppe detektiert. Mit Ausnahme von HPAF-II war MHC ebenfalls in diesen Zelllinien vorhanden (Storck *et al.*, 2012).

Da der GSL-Nachweis mittels Orcinolfärbung jedoch nur auf dem vergleichenden Laufverhalten mit Referenzsubstanzen beruht, erfolgte der spezifische Nachweis von Gb3Cer und Gb4Cer in den neutralen GSL-Fractionen der Pankreaskarzinomzelllinien sowohl mit Stx2 und dem entsprechenden Anti-Stx2-Antikörper als auch mit Anti-Gb3Cer- bzw. Anti-Gb4Cer-Antikörpern.

4.2.3 Immundetektion von Gb3Cer und Gb4Cer aus humanen Pankreaskarzinomzelllinien

Der exakte Nachweis der Stx-Rezeptoren erfolgte mittels immunchemischer Detektion von Gb3Cer und Gb4Cer mit Hilfe des Stx2- und der Antikörper-vermittelten Overlay-Assays (siehe Kapitel 3.7.3). Die Intensitäten der GSL-Banden wurden densitometrisch quantifiziert (siehe Kapitel 3.7.5). Da die Immundetektion eine spezifische und sehr sensitive Methode zum Nachweis von GSL darstellt, ist im Vergleich zur Orcinolfärbung eine deutlich geringere Menge an Probenmaterial erforderlich. So wurde bei der Orcinolfärbung (siehe Abbildung 17) eine Probenmenge entsprechend einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen aufgetragen, während bei der Immundetektion neutrale GSL-Präparate korrespondierend zu 4×10^5 Zellen für den Stx2-vermittelten und 2×10^5 Zellen für den Antikörper-vermittelten Overlay-Assay eingesetzt wurden.

Primärtumoren

Abbildung 18 zeigt die Stx2- und Antikörper-vermittelten Overlay-Assays mit den neutralen GSL aus den Primärtumor-Zelllinien. Im Stx2-vermittelten Overlay-Assay (Abbildung 18A) wurde deutlich, dass das Stx2 primär an den *high affinity* Rezeptor Gb3Cer und nur in sehr geringem Maße an den *low affinity* Rezeptor Gb4Cer bindet, da bei Betrachtung der GSL-Referenzmischung mit äquimolaren Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer (Referenz 1) eine ausgeprägte Gb3Cer-Doppelbande und nur eine schwache Gb4Cer-Bande zu erkennen war. Weiterhin wurde ersichtlich, dass alle Zelllinien aus Primärtumoren den Stx-Rezeptor Gb3Cer enthielten. Dabei wurde der höchste Gehalt an Gb3Cer in BxPC-3-Zellen beobachtet. In dem Kieselgel war ein auffälliges Bandenmuster in Form einer Dreifachbande zu erkennen, welches auf eine hohe Heterogenität der Gb3Cer-Spezies im Lipidteil schließen ließ. Neben der oberen Bande, die Gb3Cer-Spezies mit langer Fettsäure im Ceramidsegment des Moleküls repräsentiert, und der unteren Bande, welche Gb3Cer-Moleküle mit kurzer Fettsäure darstellt, erscheint eine weitere Bande, die aufgrund der stärkeren Retardierung Gb3Cer-Spezies mit stärkeren hydrophilen Eigenschaften enthalten muss. In den neutralen GSL der Zelllinien MIA PaCa-2 und Pa-Tu-8902 wurden ebenfalls relativ hohe Gb3Cer-Mengen detektiert. Hier zeigte die Immunfärbung das charakteristische Doppelbandenmuster, wobei die

untere und die obere Bande bei Pa-Tu-8902 relativ identische Farbintensitäten aufwiesen, während bei MIA PaCa-2 die untere Bande schwächer ausgeprägt war als die obere Bande. Bei dem mittels Stx2-Test immungefärbten Banden der Extrakte aus den Zelllinien PT45P1, PANC-1 und Capan-2 wurden etwas schwächer gefärbte Gb3Cer-Banden erzielt. Die untere Bande der Gb3Cer-Spezies mit kurzkettiger Fettsäure war visuell kaum zu erkennen.

Der Vergleich von Abbildung 18A und Abbildung 18B verdeutlicht, dass Stx2 und der Anti-Gb3Cer Antikörper prinzipiell analoge Ergebnisse liefern. Jedoch konnten mittels Anti-Gb3Cer Antikörper (Abbildung 18B) die unteren Banden bei PT45P1, PANC-1 und Capan-2 eindeutiger nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde bei genauer Betrachtung in den Fraktionen neutraler GSL der Zelllinien Pa-Tu-8902, PANC-1 und (in Spuren) MIA PaCa-2 mit dem sensitiveren Antikörper im Vergleich zum Stx2-basierten Assay eine schwache Bande mit hoch polaren Gb3Cer-Spezies detektiert.

Abbildung 18C lässt erkennen, dass die neutralen GSL-Fraktionen der Zelllinien PT45P1, Pa-Tu-8902, PANC-1 und BxPC-3 Gb4Cer enthielten. Auch Capan-2 synthetisierte Gb4Cer, jedoch in erheblich geringeren Mengen. Das Pa-Tu-8902-Präparat ließ außerdem polare Gb4Cer-Spezies, vermutlich mit einer hydroxylierten Fettsäure, durch die zusätzliche Bande unterhalb der Bande von dem C16-Fettsäure-haltigen Gb4Cer erkennen. Gb4Cer konnte in MIA PaCa-2 auch nicht mit Hilfe des hochempfindlichen Overlay-Assays nachgewiesen werden (Abbildung 18C). Daher wird Gb4Cer von diesen Zellen nicht synthetisiert, was durch die Ergebnisse der PCR (siehe Kapitel 4.2.1) und der Oligosaccharidfärbung (siehe Kapitel 4.2.2) bereits nahegelegt wurde.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die obere Bande in den Fraktionen neutraler GSL der Primärtumor-Zelllinien ausgeprägter war, was auf einen höheren Anteil an GSL-Spezies mit langkettiger Fettsäure als mit kurzkettiger, C16-Fettsäure schließen ließ.

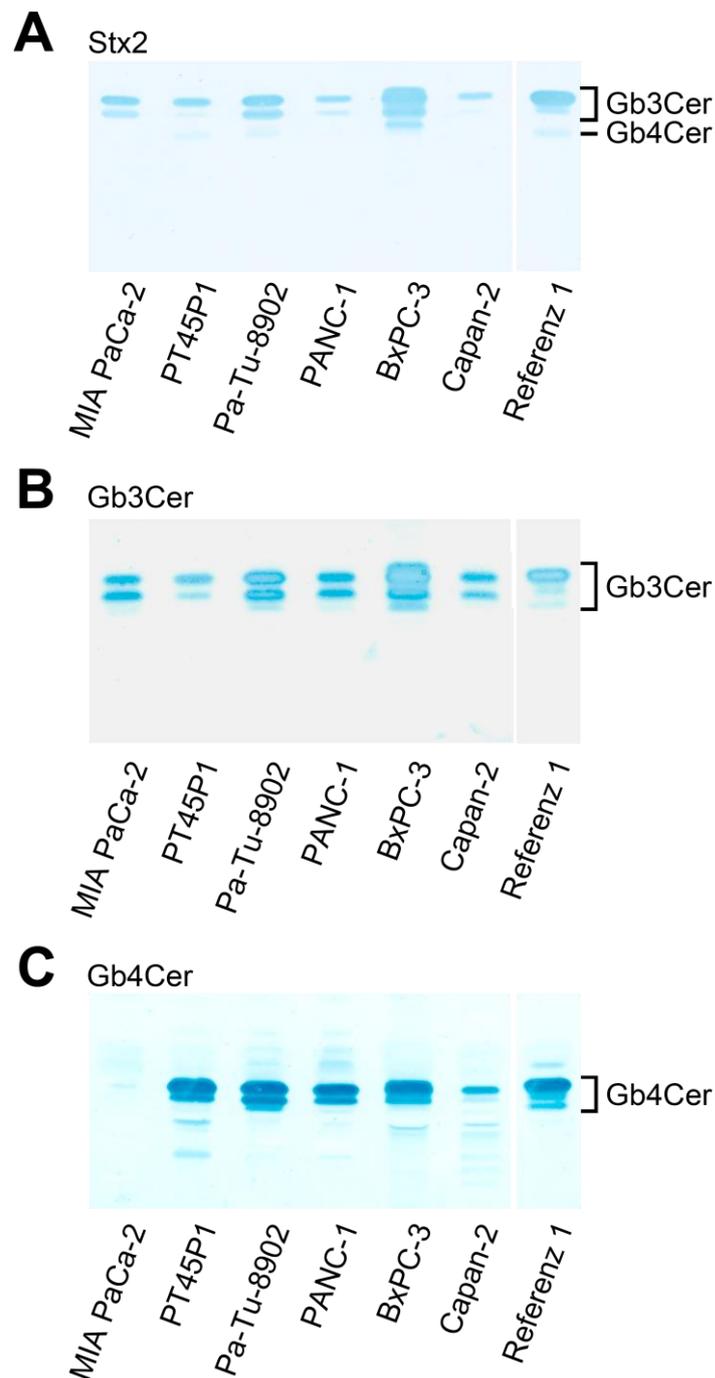


Abbildung 18: Immundetektion der Stx-Rezeptoren in neutralen GSL-Fractionen der Pankreaskarzinomzelllinien aus Primärtumoren. Aliquots wurden entsprechend einer Zellzahl von 4×10^5 Zellen für den Stx2-vermittelten Overlay-Assay (A) bzw. 2×10^5 Zellen für die Antikörpervermittelten Overlay-Assay (B und C) auf die HPTLC-Platte appliziert und dünnschichtchromatographisch separiert. Als Positivkontrolle wurden $1,5 \mu\text{g}$ einer Mischung mit äquimolaren Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer eingesetzt (Referenz 1). Der GSL-Nachweis erfolgte mit Stx2 und einem gegen das Toxin gerichteten Primärantikörper (A), einem Anti-Gb3Cer Antikörper (B) bzw. einem Anti-Gb4Cer Antikörper (C). Die Visualisierung erfolgte durch die Bindung eines AP-konjugierten Sekundärantikörpers und die Zugabe des Substrats BCIP.

Lebermetastasen

Bei den HPTLC Overlay-Assays von neutralen GSL-Präparationen der Lebermetastasen-Zelllinien wurden in allen Proben Gb3Cer nachgewiesen. Bei der Stx2-basierten Immundetektion (Abbildung 19A) ließ sich aufgrund der erscheinenden Dreifachbande eine starke Heterogenität der Gb3Cer-Spezies in der Zelllinie Capan-1 vermuten. In den Präparaten der Zelllinien Pa-Tu-8988T, S2-007 und SU.86.86 konnte ebenfalls ein deutlicher Gb3Cer-Gehalt nachgewiesen werden. Die geringste Immunfärbung gegen Gb3Cer wurde im Vergleich der aus Lebermetastasen stammenden Zelllinien in der neutralen GSL-Fraktion von S2-028 beobachtet.

Mit Hilfe des AK-vermittelten Overlay-Assays (Abbildung 19B) wurden vergleichbare Immunfärbungen erzielt, wobei zusätzlich festgestellt werden konnte, dass am meisten Gb3Cer-Spezies mit kurzkettigen, vermutlich C16-Fettsäuren synthetisiert wurden, da die entsprechende Bande die intensivste Färbung aufwies.

Gb4Cer wurde ebenfalls in allen aus Lebermetastasen stammenden Zelllinien detektiert. Dies zeigte sich durch die charakteristische immunpositive Doppelbande, welche die langkettigen (C20-C24) und die kurzkettigen (C16) Gb4Cer-Spezies repräsentieren. Dabei war jeweils die obere, Gb4Cer-Spezies mit langkettiger Fettsäure repräsentierende Bande stärker ausgeprägt als die untere Bande. Eine weitere immungefärbte Doppelbande, die besonders bei dem Präparat aus S2-007 auffällig wurde, ist wahrscheinlich auf eine Kreuzreaktivität des polyklonalen Anti-Gb4Cer Antikörpers zurückzuführen (Müthing *et al.*, 1999).

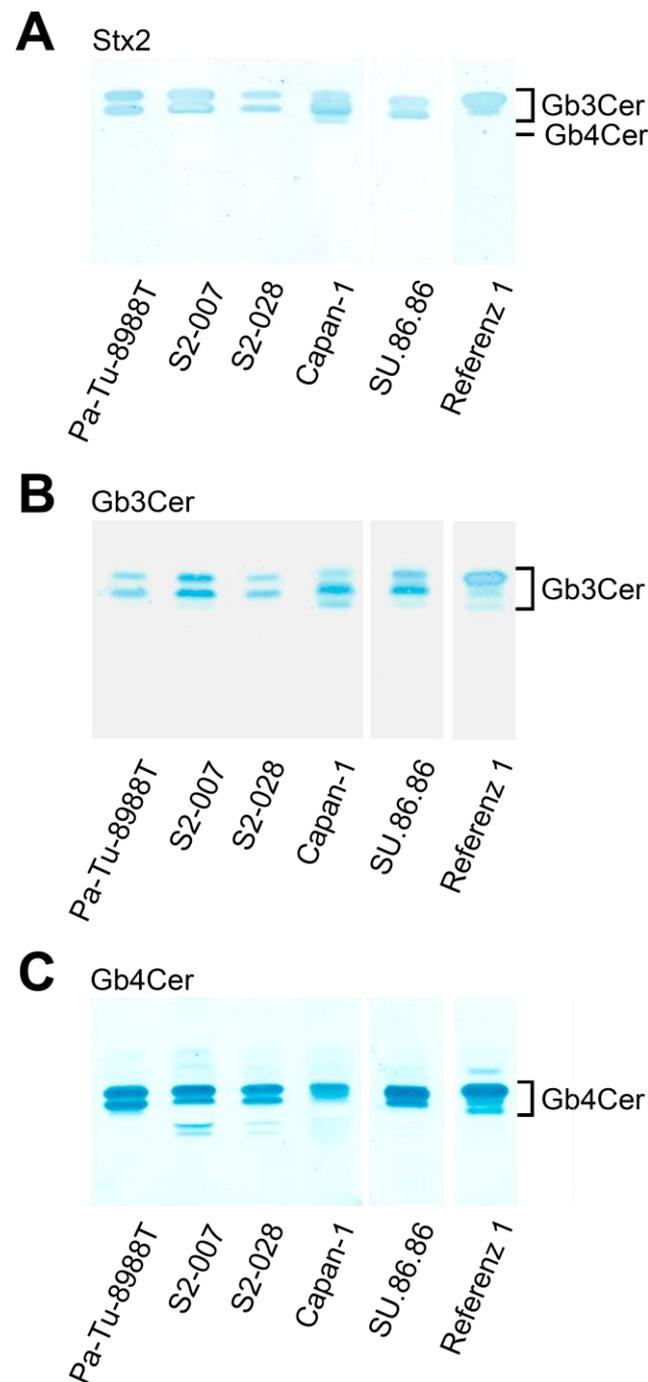


Abbildung 19: Immundetektion der Stx-Rezeptoren in neutralen GSL-Fractionen der Pankreaskarzinomzelllinien aus Lebermetastasen. Aliquots wurden entsprechend einer Zellzahl von 4×10^5 Zellen für den Stx2-vermittelten Overlay-Assay (A) bzw. 2×10^5 Zellen für die Antikörper-vermittelten Overlay-Assays (B und C) auf die HPTLC-Platte appliziert und dünnenschichtchromatographisch separiert. Als Positivkontrolle wurden $1,5 \mu\text{g}$ einer Mischung mit äquimolaren Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer eingesetzt (Referenz 1). Der GSL-Nachweis erfolgte mit Stx2 und einem gegen das Toxin gerichteten Primärantikörper (A), einem Anti-Gb3Cer Antikörper (B) bzw. einem Anti-Gb4Cer Antikörper (C). Die Visualisierung erfolgte durch die Bindung eines AP-konjugierten Sekundärantikörpers und die Zugabe des Substrats BCIP.

Aszites- und Lymphknotenmetastasen

In Abbildung 20 wird der immunchemische Nachweis von Gb3Cer und Gb4Cer in neutralen GSL-Fractionen aus den Zelllinien der Aszites- und Lymphknotenmetastasen dargestellt. Der Gb3Cer-Gehalt in AsPC-1-Zellen ist im Vergleich zu allen anderen humanen Pankreaskarzinomzelllinien am höchsten (siehe Kapitel 4.3). Im Stx2-vermittelten Overlay-Assay (Abbildung 20A) zeigten sich in dem Präparat von AsPC-1 zwei extrem stark ausgeprägte Banden, die kaum voneinander abgegrenzt werden konnten, wobei der untere Bereich etwas stärker gefärbt war und so auf einen höheren Anteil an Gb3Cer mit kurzketziger Fettsäure deutete. Bei Hs 766T trat die häufig zu beobachtende Doppelbande der Gb3Cer-Spezies mit lang- (C20-C24) und kurzketzigen (C16) Fettsäuren auf. Dabei enthielt die Hs 766T-Präparation einen höheren Anteil an Gb3Cer-Spezies mit langkettigen als mit kurzketziger Fettsäure. Dagegen zeigten die Gb3Cer-Spezies der immunpositiven Doppelbande bei HPAF-II im Vergleich zur Referenz und den anderen Präparaten ein leicht verringertes Laufverhalten, was auf das Vorliegen überwiegend hydrophiler Gb3Cer-Spezies hindeutet. Die unterste Bande war sogar intensiver gefärbt als die der Gb3Cer-Spezies mit C16-Fettsäure. Interessanterweise war weiter zu beobachten, dass mit dem Stx2-vermittelten Overlay-Assay kein Gb3Cer in dem MPanc-96-Präparat detektiert werden konnte.

Durch die Verwendung des Gb3Cer-spezifischen Antikörpers im Overlay-Assay (Abbildung 20B) wurde die Gb3Cer-Spezies in dem neutralen GSL-Präparat von AsPC-1 als eine Dreifachbande detektiert, was auf eine hohe Heterogenität innerhalb der Gb3Cer-Spezies schließen lässt. Dabei dominierte die Bande, die die Gb3Cer-Spezies mit einer C16-Fettsäure repräsentiert. Bei der Färbung der neutralen GSL-Fraktion aus MPanc-96 erschien ebenfalls eine Dreifachbande, obwohl mittels Stx2 kein Gb3Cer nachgewiesen werden konnte (s.o.). Dies demonstriert die hohe Empfindlichkeit des Anti-Gb3Cer Overlay-Assays. Dabei war ebenfalls die Bande der Gb3Cer-Varianten mit C16-Fettsäure am stärksten ausgeprägt. Im Falle der Fraktionen neutraler GSL aus den Zelllinien Hs 766T und HPAF-II wurden Doppelbandenmuster analog zu denen der Stx2-basierten Immundetektion erhalten.

Der mit dem Anti-Gb4Cer-Antikörper durchgeführte Overlay-Assay (Abbildung 20C) verdeutlicht, dass Gb4Cer in den untersuchten Zelllinien aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen mit Abstand am stärksten in Hs 766T synthetisiert wurde, wobei

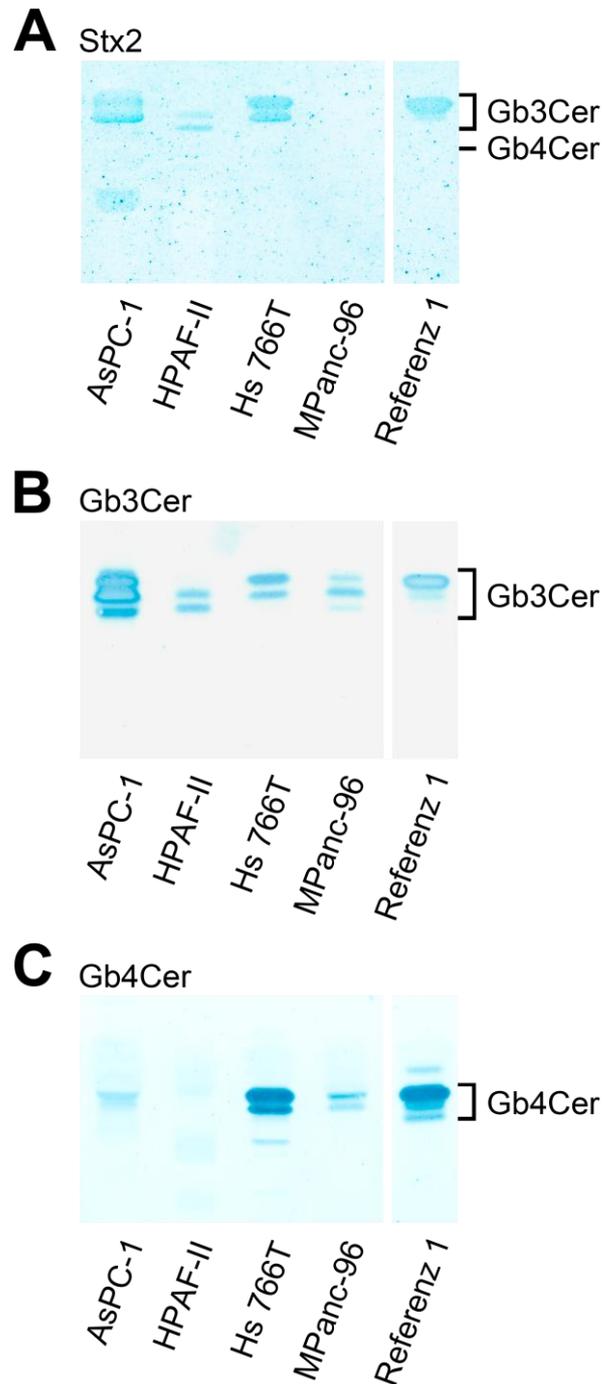


Abbildung 20: Immundetektion der Stx-Rezeptoren in neutralen GSL-Fractionen der Pankreaskarzinomzelllinien aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen. Aliquots wurden entsprechend 4×10^5 Zellen für den Stx2-vermittelten Overlay-Assay (A), bzw. 2×10^5 Zellen für die Antikörper-vermittelten Overlay-Assays (B und C) auf die HPTLC-Platte appliziert und dünnschichtchromatographisch separiert. Als Positivkontrolle wurden $1,5 \mu\text{g}$ einer Mischung mit äquimolaren Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer eingesetzt (Referenz 1). Der GSL-Nachweis erfolgte mit Stx2 und einem gegen das Toxin gerichteten Primärantikörper (A), einem Anti-Gb3Cer Antikörper (B) bzw. einem Anti-Gb4Cer Antikörper (C). Die Visualisierung erfolgte durch die Bindung eines AP-konjugierten Sekundärantikörpers und die Zugabe des Substrats BCIP.

mehr langkettige Gb4Cer-Varianten vorlagen. Auch in MPanc-96 konnte Gb4Cer mit hauptsächlich langkettigen Fettsäuren nachgewiesen werden, jedoch war das Antikörpervermittelte Signal sehr schwach. Lediglich Spuren von Gb4Cer konnten in der Präparation von AsPC-1 detektiert werden, und überhaupt kein Gb4Cer fand sich in HPAF-II-Zellen (Storck *et al.*, 2012).

Bestimmung der Fettsäureanteile von Gb3Cer-Spezies

Um den Gb3Cer- und Gb4Cer-Gehalt und insbesondere den relativen Anteil von Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies mit lang- und kurzkettigen sowie hydroxylierten Fettsäuren (Doppel- bzw. Dreifachbanden) semiquantitativ zu bestimmen, wurden die Antikörpervermittelten Overlay-Assays densitometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630$ nm ausgewertet (siehe Kapitel 3.7.5).

Primärtumoren

Die densitometrischen Messungen liefern genauere Werte und erhöhen die Aussagekraft der zuvor „nach Augenschein“ beschriebenen Ergebnisse der Immundetektion. Abbildung 21 verdeutlicht, dass der höchste Gb3Cer-Gehalt bei der Zelllinie AsPC-1 und die geringste Menge bei S2-028 vorliegt. Bei den Primärtumoren zeigte die Zelllinie BxPC-3 den höchsten Gehalt an Gb3Cer, die Zelllinie PT45P1 den niedrigsten. Bemerkenswert war, dass MIA PaCa-2 als einzige Zelllinie aus Primärtumoren des Pankreaskarzinoms einen höheren Anteil an kurzkettigen Fettsäuren im Ceramid als an langkettigen Fettsäuren zeigte. Alle anderen Zelllinien wiesen einen höheren Anteil an langkettigen Fettsäuren auf. Das Vorhandensein von hydroxylierten Fettsäuren konnte bei den Zelllinien MIA PaCa-2, Pa-Tu-8902, PANC-1 und BxPC-3 semiquantitativ bestimmt werden, während die Zelllinien PT45P1 und Capan-2 keine hydroxylierten Gb3Cer-Spezies erkennen ließen.

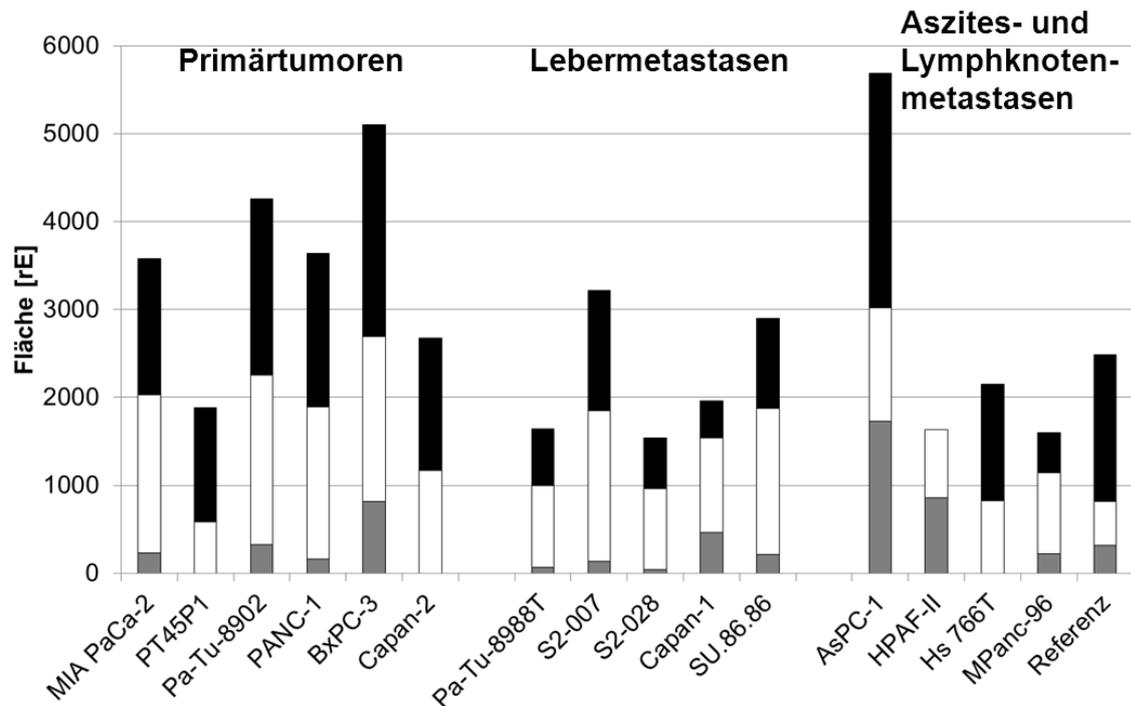


Abbildung 21: Semiquantitative Bestimmung der Gb3Cer-Spezies in den Pankreaskarzinomzelllinien mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge. Die immunpositiven Banden wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630$ nm densitometrisch vermessen. Als Kontrolle wurden die Gb3Cer-Spezies der Referenzmischung mit äquimolaren Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer (Referenz 1) bestimmt.

Lebermetastasen

In den Zelllinien aus Lebermetastasen des Pankreaskarzinoms wurde der höchste Gb3Cer-Gehalt bei S2-007 und der niedrigste Gehalt bei S2-028 detektiert (Abbildung 21). Im Gegensatz zu den Zelllinien aus Primärtumoren zeigten die der Lebermetastasen einen höheren Anteil an Gb3Cer-Varianten mit kurzkettigen Fettsäuren als an Spezies mit langkettigen Fettsäuren. Außerdem wurden bei allen fünf Zelllinien polare, vermutlich hydroxylierte Spezies densitometrisch nachgewiesen, wobei die Zelllinie Capan-1 den höchsten Gehalt an Gb3Cer mit hydroxylierten Fettsäuren erkennen ließ.

Aszites- und Lymphknotenmetastasen

Eine ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich der Fettsäurevariabilität von Gb3Cer wurde in den Zelllinien aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen beobachtet (Abbildung 21). Interessanterweise wurde in der Zelllinie AsPC-1 ein auffallend höherer Gehalt an Gb3Cer mit hydroxylierten Fettsäuren als an Spezies mit kurzkettigen Fettsäuren detektiert. Den Hauptanteil stellten jedoch Gb3Cer-Varianten mit langkettigen Fettsäuren dar. Auch die Zelllinie HPAF-II zeigte eine ungewöhnliche Fettsäurezusammensetzung, da in etwa gleichen Anteilen Gb3Cer-Spezies mit hydroxylierten und kurzkettigen Fettsäuren auftraten. Dagegen waren keine Gb3Cer-Varianten mit langkettigen Fettsäuren detektierbar. Bei der densitometrischen Quantifizierung zeigte sich, dass in der Zelllinie Hs 766T Gb3Cer-Spezies mit langkettiger Fettsäure gegenüber denjenigen mit kurzkettiger Fettsäure dominierten. Spezies mit hydroxylierter Fettsäure konnten hier nicht nachgewiesen werden. Dagegen überwog in der Zelllinie MPanc-96 der Anteil an Gb3Cer mit kurzkettiger Fettsäure gegenüber Gb3Cer mit langkettiger Fettsäure, wobei bei dieser Zelllinie ein geringer Anteil an Gb3Cer-Spezies mit hydroxylierten Fettsäuren bestimmt werden konnte. In der Referenzmischung (Referenz 1) überwog der Anteil an Gb3Cer-Varianten mit langkettigen Fettsäuren gegenüber denen mit kurzkettigen Fettsäuren. In geringerem Maße enthielt die Referenzmischung Gb3Cer-Spezies mit hydroxylierten Fettsäuren.

Die prozentualen Anteile der verschiedenen Gb3Cer-Varianten für die 15 Zelllinien sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Bestimmung der Fettsäureanteile von Gb4Cer-Spezies

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der densitometrischen, semiquantitativen Bestimmung der Gb4Cer-Heterogenität der humanen Pankreaskarzinomzelllinien. Der höchste Gehalt an Gb4Cer wurde in Pa-Tu-8902 nachgewiesen. Neben MIA PaCa-2 und HPAF-II, die kein Gb4Cer besitzen, zeigte AsPC-1 den geringsten Gehalt an Gb4Cer.

Primärtumoren

In der Kollektion der Primärtumor-Zelllinien wies Pa-Tu-8902 nicht nur die stärkste Gb4Cer-Expression auf, sondern auch mehrheitlich Gb4Cer-Spezies mit langkettigen Fettsäuren im Vergleich zu den kurzkettigen Fettsäurevarianten (Abbildung 22). Bei den Primärtumor-Zelllinien wurden nur bei dieser Zelllinie (und der Referenz 1) hydroxylierte Gb4Cer-Varianten nachgewiesen. Auch in den Zelllinien PT45P1, PANC-1, BxPC-3 und Capan-2 dominierte Gb4Cer mit langkettiger Fettsäure. Capan-2 zeigte den geringsten Gb4Cer-Gehalt.

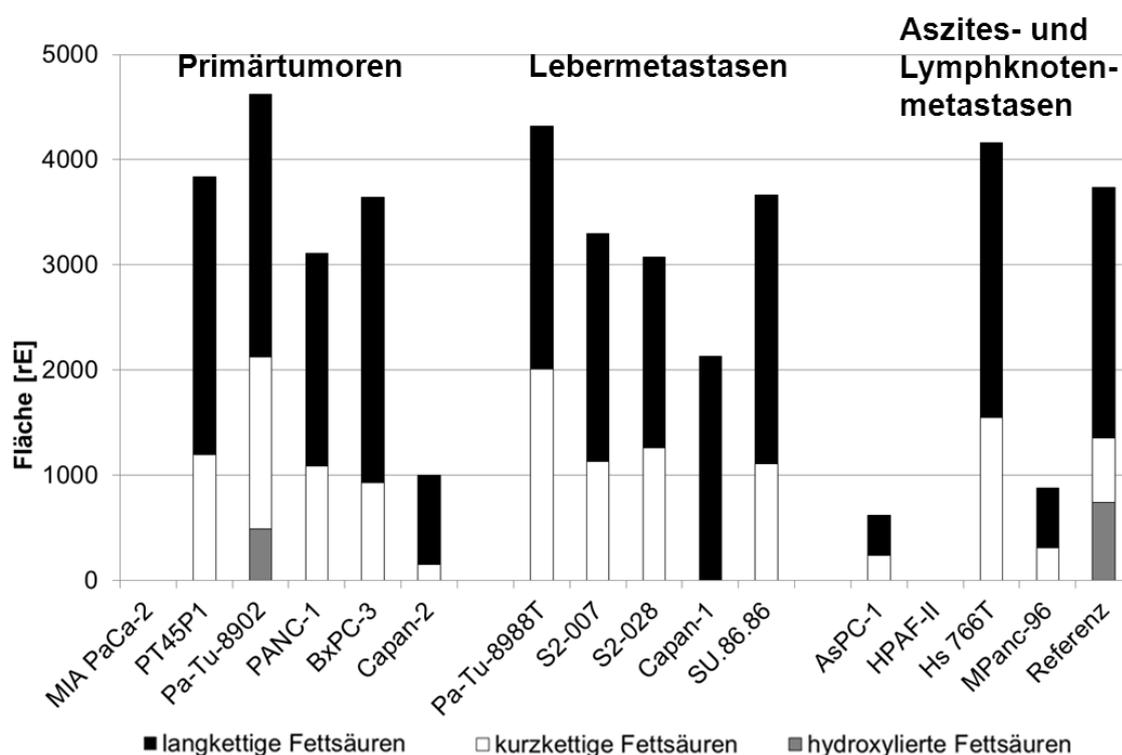


Abbildung 22: Semiquantitative Bestimmung der Gb4Cer-Spezies in den Pankreaskarzinomzelllinien mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge. Die immunpositiven Banden wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630$ nm densitometrisch vermessen. Als Kontrolle wurden die Gb3Cer-Spezies der Referenzmischung mit äquimolaren Mengen an Gb4Cer und Gb4Cer (Referenz 1) bestimmt.

Lebermetastasen

In den Zelllinien aus Lebermetastasen wies Pa-Tu-8988T den höchsten Gb4Cer-Gehalt auf, wobei Spezies mit langkettigen Fettsäuren etwas stärker vertreten waren als solche mit kurzkettigen Fettsäuren (Abbildung 22). Auch in den Zelllinien S2-007, S2-028 und SU.86.86 wurde mit der Densitometrie jeweils ein höherer Anteil an Gb4Cer mit langkettigen Fettsäuren als mit kurzkettigen Fettsäuren bestimmt. Die Zelllinie Capan-1 zeigte sogar ausschließlich die Gb4Cer-Variante mit langkettigen Fettsäuren. Es wurden keine Gb4Cer-Spezies mit hydroxylierter Fettsäure beobachtet.

Aszites- und Lymphknotenmetastasen

Die Zelllinien aus Aszitesmetastasen des Pankreaskarzinoms (AsPC-1 und HPAF-II) ließen nur einen geringen Gb4Cer-Gehalt erkennen. Während Gb4Cer in AsPC-1 noch marginal mit einem höheren Anteil an langkettigen Fettsäuren detektiert werden konnte, wies HPAF-II überhaupt kein Gb4Cer auf. Bei den Zelllinien aus Lymphknotenmetastasen Hs 766T und MPanc-96 wurden ebenso höhere Anteile an langkettigen Fettsäuren in Gb4Cer nachgewiesen, wobei Hs 766T den höchsten Gb4Cer-Gehalt in dieser Gruppe zeigte.

Die prozentualen Anteile der verschiedenen Gb4Cer-Spezies sind in Tabelle 15 aufgeführt. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die Gb3Cer-Spezies in der Gruppe der Primärtumor-Zelllinien, mit Ausnahme von MIA PaCa-2, alle einen höheren Anteil an langkettigen Fettsäuren zeigten, während im Gegensatz dazu in den Zelllinien aus Lebermetastasen ein höherer Anteil an Gb3Cer-Varianten mit kurzkettigen Fettsäuren erkennen ließen. Bei den aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen abstammenden Zelllinien dagegen konnte keine derartige Regelmäßigkeit festgestellt werden. Im Fall der Gb4Cer-Varianten wurde in allen 15 Pankreaskarzinomzelllinien ein höherer Anteil an Spezies mit langkettigen Fettsäuren gegenüber solchen mit kurzkettigen Fettsäuren detektiert.

Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der verschiedenen Fettsäurereste innerhalb von Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies aus humanen Pankreaskarzinomzelllinien.

Zelllinie	Gb3Cer-Spezies			Gb4Cer-Spezies		
	langkettig	kurzkettig	hydroxyliert	langkettig	kurzkettig	hydroxyliert
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
MIA PaCa-2	43,3	50,3	6,3	0	0	0
PT45P1	68,9	31,1	0	31,1	68,9	0
Pa-Tu-8902	47,2	45,3	7,6	35,3	54,1	10,6
PANC-1	48,1	47,5	4,4	34,9	65,1	0
BxPC-3	47,3	36,7	16,0	25,6	74,4	0
Capan-2	56,3	43,7	0	15,1	84,9	0
Pa-Tu-8988T	39,2	56,9	3,9	46,5	53,5	0
S2-007	42,6	53,2	4,2	34,5	65,5	0
S2-028	37,7	59,7	2,7	40,9	59,1	0
Capan-1	21,4	55,2	23,4	0	100,0	0
SU.86.86	35,4	57,3	7,2	30,3	69,7	0
AsPC-1	46,9	22,7	30,4	38,7	61,3	0
HPAF-II	0	47,5	52,5	0	0	0
Hs 766T	61,7	38,3	0	37,2	62,8	0
MPanc-96	28,3	57,7	14,0	35,4	64,6	0

Rangzuordnung nach GSL-Gehalt

Anhand der densitometrisch bestimmten Gehalte an Gb3Cer und Gb4Cer wurden den Zelllinien Ränge zugeordnet, wobei Rang 1 die Zelllinie mit dem höchsten GSL-Gehalt und Rang 15 die Zelllinie mit dem niedrigsten GSL-Gehalt repräsentiert. Die Rangzuordnung ist in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Verteilung der Ränge lässt erkennen, dass keine Korrelation zwischen dem Tumortyp der Zelllinien und dem GSL-Gehalt besteht, weder in Bezug auf den Gb3Cer- noch auf den Gb4Cer-Gehalt. In den drei Tumorgruppen finden sich Zelllinien, die sowohl einen hohen als auch einen niedrigen Gehalt an Gb3Cer bzw. Gb4Cer zeigten. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen dem Gb3Cer- und dem Gb4Cer-Gehalt erkannt werden.

Tabelle 16: Rangzuordnung der Pankreaskarzinomzelllinien entsprechend ihres Gehalts an Gb3Cer und Gb4Cer.

Zelllinie	Ursprung	Gb3Cer-Gehalt		Gb4Cer-Gehalt	
		Signal [rE]	Rang	Signal [rE]	Rang
MIA PaCa-2		3581	5	0	14,5
PT45P1		1879	11	3835	4
Pa-Tu-8902	Primärtumor	4260	3	4620	1
PANC-1		3639	4	3110	8
BxPC-3		5105	2	3645	5,5
Capan-2		2676	8	1003	11
Pa-Tu-8988T		1644	12	4321	2
S2-007		3220	6	3295	7
S2-028	Lebermetastase	1537	15	3078	9
Capan-1		1955	10	2134	10
SU.86.86		2896	7	3668	5,5
AsPC-1	Aszitesmetastase	5685	1	620	13
HPAF-II		1629	13	0	14,5
Hs 766T	Lymphknoten-	2149	9	4161	3
MPanc-96	metastase	1597	14	879	12

4.3 Statistische Auswertung

Auf Grundlage der Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays und der densitometrisch bestimmten GSL-Mengen wurde eine mögliche Korrelation zwischen Rezeptorgehalt und Sensitivität gegenüber Stx2 für die einzelnen Pankreaskarzinomzelllinien statistisch untersucht. Den Zelllinien wurden anhand der bestimmten CD_{50} -Werte des Zytotoxizitäts-Assays und des desitometrisch bestimmten Gehalts an Gb3Cer bzw. Gb4Cer Ränge von 1 bis 15 zugeordnet, wobei Ränge von der höchsten Stx2-Sensitivität (Rang 1) zur niedrigsten Sensitivität (Rang 15) (siehe Tabelle 13) bzw. von dem höchsten GSL-Gehalt (Rang 1) zum niedrigsten GSL-Gehalt (Rang 15) (siehe Tabelle 16) zugewiesen wurden. In Tabelle 17 sind die Ränge bezüglich der CD_{50} -Werte (siehe Kapitel 4.1) und die Ränge

der semiquantitativ bestimmten Gb3Cer- und Gb4Cer-Mengen (siehe Kapitel 4.2.3) der Pankreaskarzinomzelllinien aufgelistet.

Tabelle 17: Rangzuordnung der Pankreaskarzinomzelllinien bezüglich der CD_{50} -Werte, sowie des Gb3Cer- und Gb4Cer-Gehalts.

Zelllinie	CD_{50} Stx2 Rang	α 1,4-GalT Rang	β 1,3-GalNAcT Rang	Gb3Cer Rang	Gb4Cer Rang
MIA PaCa-	6	15	15	5	14,5
PT45P1	8	3	9	11	4
Pa-Tu-8902	2	8	3	3	1
PANC-1	12,5	11	1	4	8
BxPC-3	5	2	10	2	5,5
Capan-2	9	10	2	8	11
Pa-Tu-	1	12	7	12	2
S2-007	12,5	14	11	6	7
S2-028	12,5	7	8	15	9
Capan-1	7	9	5	10	10
SU.86.86	3	1	4	7	5,5
AsPC-1	12,5	4	13	1	13
HPAF-II	12,5	6	12	13	14,5
Hs 766T	4	5	6	9	3
MPanc-96	12,5	13	14	14	12

Bei den Berechnungen der möglichen Korrelationen wird ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,005$ mit einem kritischen Wert von $r_s = 0,654$ zugrunde gelegt. Die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman für die Sensitivität der Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Stx2 und dem Gb3Cer-Gehalt ergab einen Wert von $r_s = 0,201$, was eine Korrelation der beiden Testgrößen aufgrund des kritischen Wertes von $r_s = 0,654$ ausschloss. Dagegen konnte ein Zusammenhang zwischen den CD_{50} -Werten und dem Gb4Cer-Gehalt erkannt werden ($r_s = 0,682$). Da es sich bei Gb4Cer um das Elongationsprodukt von Gb3Cer handelt, ist der mögliche Zusammenhang zwischen Gb3Cer- und Gb4Cer-Gehalt von Interesse. Allerdings war auch bei dem Vergleich der Gehalte an Gb3Cer und Gb4Cer mit $r_s = 0,096$ keine

Korrelation festzustellen. Für die Expression der Glykosyltransferasen α 1,4-GalT und β 1,3-GalNAcT (Kapitel 4.2.1, Tabelle 14) konnte ebenfalls mit $r_s = 0,164$ kein Zusammenhang beobachtet werden. Beim Vergleich des Gb3Cer-Gehalts und der Expression der Gb3Cer-Synthase α 1,4-GalT ergab sich aus der Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten ein Wert von $r_s = 0,139$, so dass auch hier von keiner Korrelation ausgegangen werden konnte. Dies galt ebenso für den Vergleich der Gb4Cer-Gehalte und der Gb4Cer-Synthase β 1,3-GalNAcT ($r_s = 0,521$), dem CD_{50} -Wert und der α 1,4-GalT ($r_s = 0,229$) und dem CD_{50} -Wert und der β 1,3-GalNAcT ($r_s = 0,358$) (Storck *et al.*, 2012).

4.4 Strukturelle Charakterisierung der Stx-Rezeptoren aus humanen Pankreaskarzinomzelllinien

Um die Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer strukturell zu charakterisieren, wurden zwei verschiedene massenspektrometrische Methoden angewendet. Nachdem die Plexigum-Beschichtung mit Hilfe von Chloroform nach der dünnschichtchromatographischen Trennung und der GSL-Immundetektion entfernt wurde, erfolgte die Messung entweder direkt auf der HPTLC-Platte mittels IR-MALDI-o-TOF MS oder nach GSL-Extraktion aus dem Kieselgel durch nanoESI-Q-TOF MS. Dabei diente die IR-MALDI-o-TOF MS dazu, erste Anhaltspunkte für Unterschiede hinsichtlich der Gb3Cer und Gb4Cer-Lipoformen der einzelnen Zelllinien zu erhalten. Die nanoESI-Q-TOF MS ermöglichte die exakten Strukturaufklärungen durch CID-Experimente.

4.4.1 Identifizierung von Globotriaosyl- und Globotetraosylceramid mittels IR-MALDI-o-TOF MS

Die direkte Kopplung von HPTLC und IR-MALDI-o-TOF MS ermöglicht die strukturelle Charakterisierung von Substanzen im Nanogrammbereich, da auf zeitintensive, mit Verlusten verbundene Extraktionsverfahren verzichtet werden kann. Somit bietet dieses Verfahren die Möglichkeit unmittelbar eine Übersicht über die

verschiedenen GSL-Spezies zu erhalten, allerdings kann keine Aussage über die exakte Struktur getroffen werden. Nach dünnenschichtchromatographischer Trennung der GSL-Extrakte und anschließender Immundetektion wurde die Plexigum-Schicht mit Chloroform von der HPTLC-Platte entfernt und diese auf die für das Massenspektrometer passende Targetgröße zugeschnitten. Als Flüssigmatrix wurde Glycerin appliziert, die Probe in die Ionenquelle des Massenspektrometers überführt und die Messung im Positivionenmodus durchgeführt. Exemplarisch werden IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von Pa-Tu-8902 als Vertreter der aus Primärtumoren des humanen Pankreaskarzinoms isolierten Zelllinien, von S2-007 als Beispiel der aus Lebermetastasen isolierten Zelllinien und von Hs 766T als Repräsentant der aus Lymphknotenmetastasen isolierten Zelllinien gezeigt.

Primärtumoren

In Abbildung 23 sind die IR-MALDI-o-TOF Massenspektren der mittels Stx2 und Anti-Gb3Cer- sowie Anti-Gb4Cer-Antikörper detektierten GSL aus der Zelllinie Pa-Tu-8902 dargestellt. Es wurden primär einfach natriumkationisierte $[M+Na]^+$ -Ionen nachgewiesen. Zunächst wurden die Stx2-detektierten Gb3Cer-Spezies massenspektrometrisch untersucht, wobei die untere und die obere immunpositive Bande separat voneinander vermessen wurden. Abbildung 23A zeigt das Massenspektrum der unteren, hydrophileren Bande, die ausschließlich Gb3Cer (d18:1, C16:0) mit m/z 1046,64 beinhaltet. Das von der oberen Stx2-positiven Bande erzeugte Spektrum (Abbildung 23B) weist als Hauptkomponenten Gb3Cer-Spezies mit Sphingosin (d18:1) und einer C24:1- (m/z 1156,74) bzw. C24:0-Fettsäure (m/z 1158,75) auf. Als Nebenkomponten wurden sehr geringe Mengen der Gb3Cer-Varianten mit C21:0, C22:0, C23:0, C25:1 und C25:0 bei m/z 1116,73, m/z 1130,72, m/z 1144,75, m/z 1170,74 und m/z 1172,76 detektiert.

Die mittels IR-MALDI-o-TOF erzielten Massenspektren der Antikörper-detektierten Gb3Cer-Spezies aus der unteren und oberen Bande sind in Abbildung 23C und in Abbildung 23D dargestellt. In der unteren Bande wurde erwartungsgemäß Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,68 detektiert. Der im Vergleich zum Spektrum in Abbildung 23A zusätzlich detektierte Peak bei m/z 1062,65 kann tentativ einer hydroxylierten

Gb3Cer-Variante zugeordnet werden; wahrscheinlicher ist jedoch, dass es sich um ein Kaliumaddukt der Hauptkomponente Gb3Cer (d18:1, C16:0) handelt. Der mit einem Stern versehene Peak bei m/z 1064,67 stellt eine unbekannte Substanz dar, die offensichtlich mit Gb3Cer komigriert. Analog zu Abbildung 23B wurden in Abbildung 23D hauptsächlich Gb3Cer-Spezies mit C24:1 bei m/z 1156,77 bzw. C24:0 bei m/z 1158,79 detektiert. Sehr kleine Mengen an Gb3Cer (d18:1, C25:1/C25:0) wurden durch Ionen bei m/z 1170,77 und m/z 1172,78 nachgewiesen.

Bei der Vermessung der Gb4Cer-Spezies aus Pa-Tu-8902 wurden hauptsächlich Signale bei m/z 1249,71 für Gb4Cer-Spezies mit kurzer Fettsäurekette (Abbildung 23E) und bei m/z 1359,81 und m/z 1361,82 für Spezies mit langer Fettsäurekette (Abbildung 23F) detektiert, die den Strukturen Gb4Cer (d18:1, C16:0) sowie Gb4Cer (d18:1, C24:1) und Gb4Cer (d18:1, C24:0) zugeordnet wurden. Diese Spezies traten im Massenspektrum auch als $[M-H+2Na]^+$ -Ionen bei m/z 1271,70 (C16:0), m/z 1381,79 (C24:1) und m/z 1383,81 (C24:0) auf. Als Substanzen mit sehr geringer Häufigkeit wurden außerdem Gb4Cer-Spezies mit C22:0, C23:0, C25:1 und C25:0 bei m/z 1133,80, m/z 1347,82, m/z 1373,81 und m/z 1375,83 detektiert (Abbildung 23F).

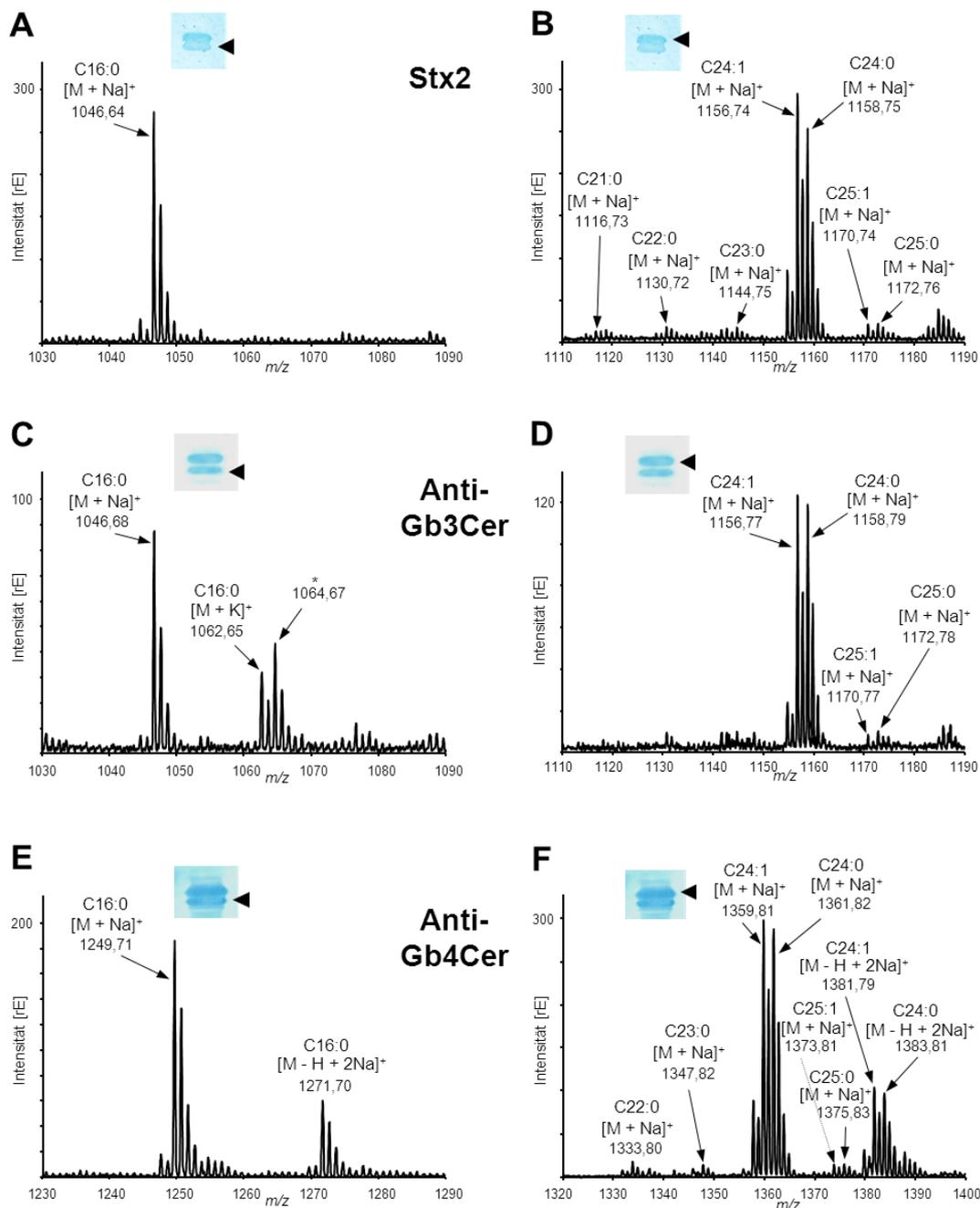


Abbildung 23: IR-MALDI-o-TOF Massenspektren der Stx2- und Antikörper-detektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Primärtumor-Zelllinie Pa-Tu-8902. Nach dünn-schichtchromatographischer Trennung und Immundetektion wurden Massenspektren von (A und B) Stx2-detektierten Gb3Cer-Spezies, (C und D) Anti-Gb3Cer Antikörper-detektierten Gb3Cer-Spezies und (E und F) Anti-Gb4Cer Antikörper-detektierten Gb4Cer-Spezies generiert. Die linksseitigen Massenspektren wurden aus den unteren immungefärbten Gb3Cer-/Gb4Cer-Banden erhalten, während die rechtsseitigen Massenspektren aus den oberen immungefärbten Gb3Cer-/Gb4Cer-Banden generiert wurden. Die Pfeilspitzen in den Overlay-Assay-Ausschnitten zeigen an, welcher Bereich der immunpositiven Doppelbande mit dem Laser beschossen wurde. Das mit einem Stern markierte Ionensignal (C) stellt eine unbekannte Substanz dar, die offensichtlich mit Gb3Cer chromatographiert.

Lebermetastasen

Der GSL-Extrakt von S2-007 wurde ebenfalls mittels IR-MALDI-o-TOF MS untersucht. Stx2-detektiertes Gb3Cer der unteren immunpositiven Bande lieferte ausschließlich Spezies (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,67 (Abbildung 24A) und vorwiegend Spezies (d18:1) mit C24:1- und C24:0-Fettsäuren bei m/z 1156,76 und m/z 1158,77 in der oberen immunpositiven Bande (Abbildung 24B). In der oberen Bande wurden als Minoritäten noch Gb3Cer (d18:1, C21:0) bei m/z 1116,76, Gb3Cer (d18:1, C22:0) bei m/z 1130,75 und Gb3Cer (d18:1, C25:0) bei m/z 1172,76 detektiert. Die Anti-Gb3Cer Antikörper-detektierten Gb3Cer-Spezies mit C16:0-Fettsäuren (Abbildung 23D) wurden in der unteren Bande sowohl als $[M+Na]^+$ -Ionen bei m/z 1046,68 als auch als $[M+K]^+$ -Ionen bei m/z 1062,64 nachgewiesen. Offensichtlich komigrierte außerdem eine unbekannte Substanz mit m/z 1064,65 (Abbildung 24C). In der oberen Bande wurden neben den Ionensignalen bei m/z 1156,79 und m/z 1158,79, die den Gb3Cer-Varianten mit C24:1- und C24:0-Fettsäuren zugeordnet werden konnten, zwei weitere Signale bei m/z 1148,14 und m/z 1187,17 erhalten (Abbildung 24D). Hierbei handelt es sich ebenfalls um unbekannte, mit Gb3Cer komigrierende Substanzen. Die massenspektrometrische Charakterisierung von Antikörper-detektiertem Gb4Cer zeigte, dass in der unteren Bande die Spezies mit C16:0-Fettsäure sowohl in Form von den $[M+Na]^+$ -Ionen bei m/z 1249,73 als auch als $[M-H+2Na]^+$ -Ionen bei m/z 1271,73 auftrat (Abbildung 24E). Außerdem wurden zusätzlich unbekannte Ionensignale bei m/z 1254,75/1256,76 erhalten. In der oberen immunpositiven Bande wurden die Ionensignale bei m/z 1359,84 und m/z 1361,85 bzw. bei m/z 1381,82 und m/z 1383,82 den Gb4Cer-Spezies (d18:1, C24:1/C24:0) als $[M+Na]^+$ - bzw. als $[M-H+2Na]^+$ -Ionen zugeordnet. Weiterhin wurden bei m/z 1333,80, m/z 1347,84, m/z 1373,83 und m/z 1375,82 die Gb4Cer-Spezies (d18:1) mit C22:0-, C23:0-, C25:1- und C25:0-Fettsäuren detektiert (Abbildung 24F).

Aszites- und Lymphknotenmetastasen

Sowohl bei der massenspektrometrischen Untersuchung des Stx-vermittelten (Abbildung 25A und B) als auch des Anti-Gb3Cer-Antikörper-vermittelten Overlay-Assays (Abbildung 25C und D) wurden in dem GSL-Extrakt aus Hs 766T ausschließlich Gb3Cer-Spezies mit C16:0 in der unteren Bande (Abbildung 25A und C) nachgewiesen. In der oberen Bande wurde vorrangig Gb3Cer (d18:1, C24:1/ C24:0) und in geringerer Intensität auch Gb3Cer mit C21:0-, C22:0-, C23:0-, C25:1- sowie C25:0-Fettsäure detektiert (Abbildung 25B und D). Die in dem Hs 766T-Extrakt enthaltenen Gb4Cer-Varianten (Abbildung 25E und F) enthielten mehrheitlich Fettsäuren mit C16:0, C24:1 und C24:0, welche sowohl als $[M-Na]^+$ -Ionen als auch als $[M-H+2Na]^+$ -Ionen detektiert werden konnten. Außerdem wurden mit geringen Signalintensitäten Gb4Cer-Spezies mit C22:0-, C23:0-, C25:1- und C25:0-Fettsäuren nachgewiesen.

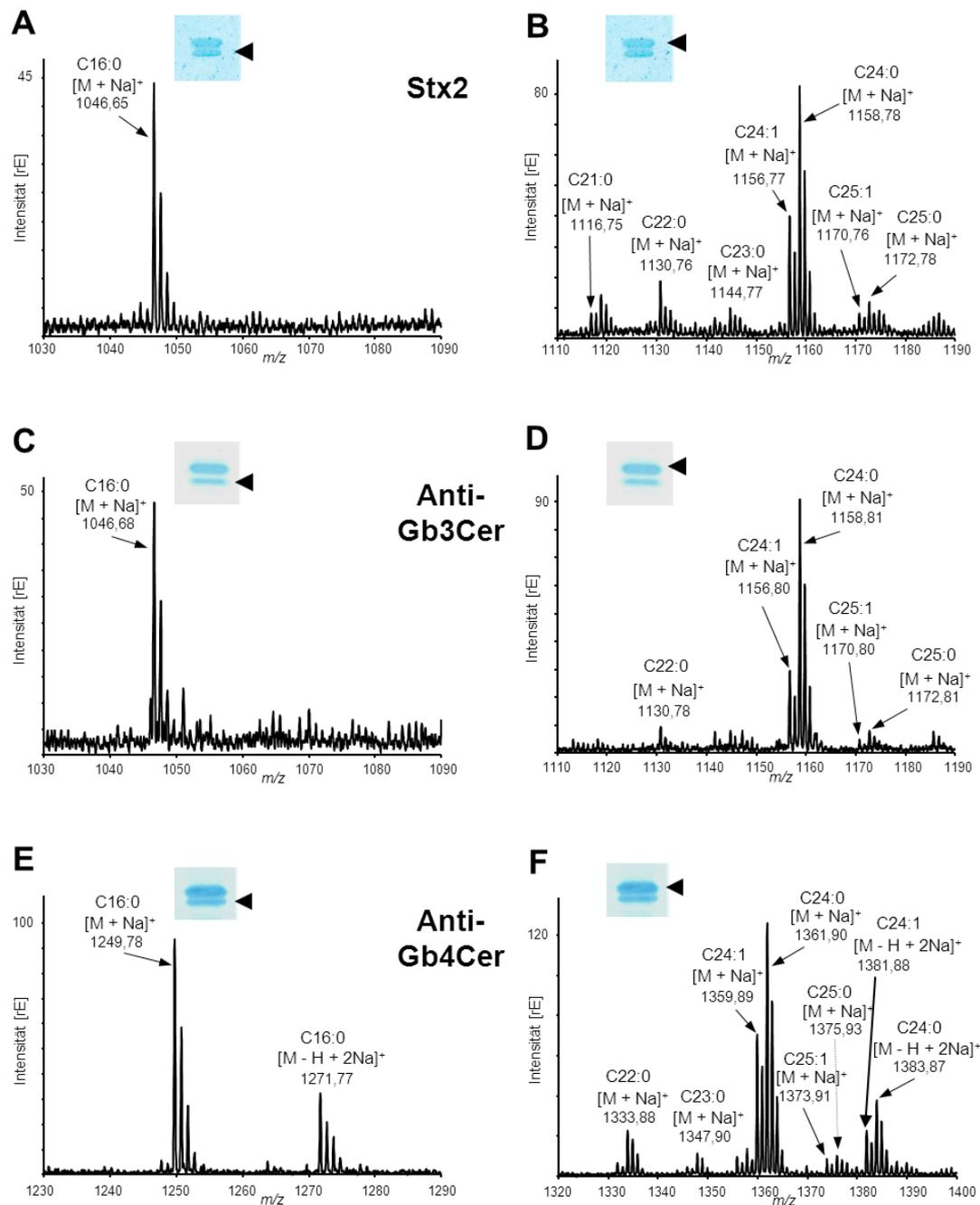


Abbildung 25: IR-MALDI-o-TOF Massenspektren der Stx2- und Antikörper-detektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Lymphknotenmetastasen-Zelllinie Hs 766T. Nach dünnstschichtchromatographischer Trennung und Immundetektion wurden Massenspektren von (A und B) Stx2-detektierten Gb3Cer-Spezies, (C und D) Anti-Gb3Cer Antikörper-detektierten Gb3Cer-Spezies und (E und F) Anti-Gb4Cer Antikörper-detektierten Gb4Cer-Spezies generiert. Die linksseitigen Massenspektren wurden aus den unteren immungefärbten Gb3Cer-/Gb4Cer-Banden erhalten, während die rechtsseitigen Massenspektren aus den oberen immungefärbten Gb3Cer-/Gb4Cer-Banden generiert wurden. Die Pfeilspitzen in den Overlay-Assay-Ausschnitten zeigen an, welcher Bereich der immunpositiven Doppelbande mit dem Laser beschossen wurde.

Die Ionensignale der Gb3Cer-Spezies, die mit Hilfe der IR-MALDI-o-TOF MS erhalten wurden, sind mit entsprechendem Strukturvorschlag in Tabelle 18 aufgelistet. Tabelle 19 fasst die Ionensignale der Gb4Cer-Varianten und die Strukturzuordnung zusammen. Die in Fettdruck hervorgehobenen Signale stellen dabei die in den jeweiligen Massenspektren dominierenden Spezies dar.

Tabelle 18: Strukturvorschläge für die mittels IR-MALDI-o-TOF MS erhaltenen Gb3Cer-Ionensignale.

Fettsäure von Gb3Cer (d18:1)	Pa-Tu-8902	S2-007	Hs 766T
C16:0	1046,68	1046,68	1046,68
C21:0	1116,73	1116,78	1116,75
C22:0	1130,72	1130,75	1130,78
C23:0	1144,75	n. d.*	1144,77
C24:1	1156,77	1156,79	1156,80
C24:0	1158,79	1158,79	1158,81
C25:1	1170,77	n. d.*	1170,80
C25:0	1172,78	1172,76	1172,81

*n. d. = nicht detektiert

Tabelle 19: Strukturvorschläge für die mittels IR-MALDI-o-TOF MS erhaltenen Gb4Cer-Ionensignale.

Fettsäure von Gb4Cer (d18:1)	Pa-Tu-8902	S2-007	Hs 766T
C16:0	1249,71	1249,73	1249,78
C22:0	1333,80	1333,80	1333,88
C23:0	1347,82	1347,84	1347,90
C24:1	1359,81	1359,84	1359,89
C24:0	1361,82	1361,85	1361,90
C25:1	1373,81	1373,83	1373,91
C25:0	1375,83	1375,85	1375,93

Bei den mittels IR-MALDI-o-TOF MS erhaltenen Ergebnissen handelt es sich jedoch nur um Strukturvorschläge, da keine sicheren Aussagen über die Zusammensetzung des Ceramidteils und die exakte Zuckersequenz des Oligosaccharids gemacht werden können. Deshalb sollen die Strukturvorschläge detailliert mit Hilfe der bei der nanoESI-Q-TOF MS durchführbaren CID-Experimenten verifiziert werden.

4.4.2 Strukturaufklärung von Globotriaosyl- und Globotetraosylceramid mittels nanoESI-Q-TOF MS

Zur vollständigen Strukturaufklärung der verschiedenen Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies wurde die nanoESI-Q-TOF MS mit anschließenden CID-Experimenten durchgeführt. Die GSL aus humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurden mittels HPTLC aufgetrennt, immunchemisch detektiert und die Doppel- bzw. Dreifachbanden (siehe Kapitel 4.2.3) aus dem Kieselgel extrahiert. Durch die erhaltenen MS¹-Spektren konnte die Diversität der Gb3Cer- und Gb4Cer-Varianten jeweils in einem Übersichtsspektrum dargestellt werden. Die anschließenden CID-Experimente von selektierten [M+Na]⁺-Vorläuferionen ermöglichten die vollständige strukturelle Charakterisierung der Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies hinsichtlich der Anzahl der Zucker, der Zuckersequenz sowie des Sphingosins und der Fettsäure des Ceramids. Für die Zelllinien aus Primärtumoren werden exemplarisch Massenspektren der Zelllinie Pa-Tu-8902 gezeigt, für die aus Lebermetastasen abgeleiteten Zelllinien werden Massenspektren von S2-007 dargestellt und als Repräsentant der Zelllinien aus Lymphknotenmetastasen werden Hs 766T-Massenspektren abgebildet (Storck *et al.*, 2012).

Primärtumoren

Abbildung 26A zeigt das MS¹-Übersichtsspektrum, welches von der immunpositiven Gb3Cer-Doppelbande von Pa-Tu8902 generiert wurde. Das gepunktete Rechteck umrahmt den Bereich der HPTLC-Platte, aus dem die immunpositive Doppelbande extrahiert wurde. Das Übersichtsspektrum zeigt als Hauptkomponenten Gb3Cer-Spezies korrespondierend zu einfach natriumkationisierten [M+Na]⁺-Ionen von Gb3Cer (d18:1,

C16:0) bei m/z 1046,69, Gb3Cer (d18:1, C24:0) bei m/z 1158,84, Gb3Cer (d18:1, C24:1) bei m/z 1156,82 und Gb3Cer (d18:1, C22:0) bei m/z 1130,80. In geringerem Maße werden auch Gb3Cer-Spezies bei m/z 1062,69 (d18:1, C16:0-OH), m/z 1074,71 (d18:1, C18:0), m/z 1116,77 (d18:1, C21:0), m/z 1144,83 (d18:1, C23:0), m/z 1172,84 (d18:1, C25:0) und m/z 1186,85 (d18:1, C26:0) detektiert. Die vorgeschlagenen Strukturen wurden im Folgenden mit Hilfe von CID-Experimenten bestätigt. In Abbildung 26B wird exemplarisch das CID-Spektrum der $[M+Na]^+$ -Ionen mit m/z 1130,94, die tentativ der Gb3Cer (d18:1, C22:0) zugeordnet wurden, zusammen mit dem exemplarischen Fragmentierungsschema von Gb3Cer (d18:1, C22:0) (Abbildung 26C) gezeigt. Die Benennung der Fragmentationen folgt der Nomenklatur von Domon und Costello (Domon & Costello, 1988). Die Fragmente der Y-Ionenserie, welche Gb3Cer-Ionen nach dem sukzessiven Verlust der drei Hexosen darstellt, wurde vollständig bei m/z 986,86 (Y_2), m/z 806,78 (Y_1) und m/z 644,73 (Y_0) detektiert. Des Weiteren wurden sämtliche Fragmentationen der B-Serie als B_1 bei m/z 185,08, B_2 bei m/z 347,17 und B_3 bei m/z 509,22, die den Ionen der Hexosen ohne reduzierendes Ende entsprechen, und die Ionen der C-Serie, die die Ionen der Hexosen mit reduzierendem Ende repräsentieren, als C_1 bei m/z 203,09, C_2 bei m/z 365,17 und C_3 bei m/z 527,25 nachgewiesen. In geringem Maße wurden auch das $^{0,2}A_2$ - Ion bei m/z 305,14 und das $^{0,2}A_3$ -Ion bei m/z 467,21 erhalten, welche aus Ringspaltungen innerhalb des Oligosaccharids hervorgehen. Zusätzlich konnten Z_0 -Ionen bei m/z 626,70 detektiert werden, die die Ionen des Ceramids darstellen.

Das MS^1 -Übersichtsspektrum, welches von der immunpositiven Gb4Cer-Doppelbandes aus der Zelllinie Pa-Tu-8902 erhalten wurde, ist in Abbildung 26D dargestellt. Analog zu den detektierten Gb3Cer-Spezies wurden als Hauptkomponenten Gb4Cer (d18:1)-Spezies mit C16:0- und C24:1/C24:1-Fettsäuren bei m/z 1249,78 und m/z 1359,88/1361,88 detektiert. Ionen mit geringerer Signalstärke wurden Gb4Cer (d18:1, C16:0-OH), Gb4Cer (d18:1, C22:0), Gb4Cer (d18:1, C23:0), Gb4Cer (d18:1, C25:0) und Gb4Cer (d18:1, C26:0) bei m/z 1265,80, m/z 1333,85, m/z 1347,87, m/z 1375,88 und m/z 1389,90 zugeordnet. Das beispielhaft gezeigte CID-Spektrum von Gb4Cer (d18:1, C24:0) mit m/z 1360,05 und das Fragmentierungsschema von Gb4Cer (d18:1, C16:0) sind in Abbildung 26E und F dargestellt. Es wurden wie im Falle der Gb3Cer-Varianten die vollständigen Serien der Y- und B-Ionen detektiert. Weiterhin wurden einige C-Ionen und

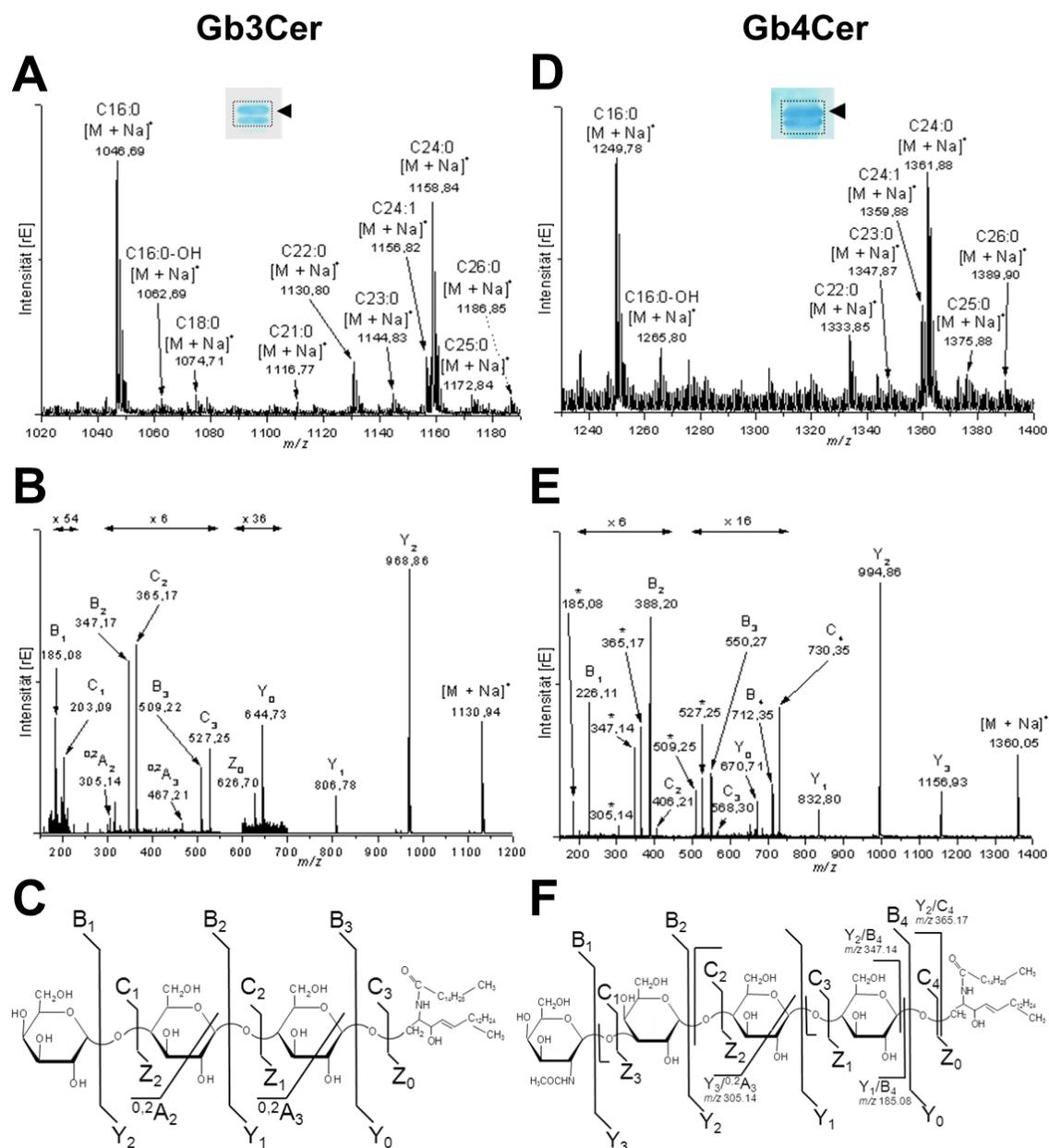


Abbildung 26: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von immundetektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Primärtumor-Zelllinie Pa-Tu-8902 und Fragmentierungsschemata. Die gepunkteten Rechtecke markieren die immunpositiven Doppelbanden auf der HPTLC-Platte, die abgekratzt und aus der die GSL extrahiert wurden. Die Pfeile weisen auf die GSL-Spezies, dessen Vorläuferionen für die CID-Messung selektiert wurden. (A) MS¹-Spektrum der Gb3Cer-Doppelbande und Ausschnitt des entsprechenden Anti-Gb3Cer Overlay-Assays. (B) CID-Spektrum von Gb3Cer-Spezies (d18:1, C22:0) bei m/z 1130,94. (C) Struktur und beispielhaftes Fragmentierungsschema von Gb3Cer (d18:1, C16:0). (D) MS¹-Spektrum der Gb4Cer-Doppelbande und Ausschnitt des entsprechenden Anti-Gb4Cer Overlay-Assays. (E) CID-Spektrum von Gb4Cer (d18:1, C24:1) bei m/z 1360,05. (F) Struktur und beispielhaftes Fragmentierungsschema von Gb4Cer (d18:1, C16:0).

Fragmentionen, die durch molekulinterne Spaltungen entstanden sind und im CID-Spektrum mit Sternen markiert wurden, generiert. Die Fragmentierung, die die Abspaltung des HexNAc-Moleküls am nichtreduzierenden Ende beweist, wurde durch die Y_3 -Ionen bei m/z 1156,93 und B_1 -Ionen bei m/z 226,11 nachgewiesen. Darauf folgte die sequenzielle Abspaltung der drei Hexosen von den Y_3 -Ionen bis hin zu den Y_0 -Ionen bei m/z 670,71, während die zu dem Trisaccharid korrespondierenden B_1 -Ionen bei m/z 226,11 5 sequenziell bis hin zu den B_4 -Ionen bei m/z 712,3 verlängert wurden.

Lebermetastasen

Die MS^1 -Übersichtsspektren und ausgewählte CID-Spektren für Gb3Cer (d18:1, C24:0) und Gb4Cer (d18:1, C16:0) der Lebermetastasen-Zelllinie S2-007 sind in Abbildung 27 dargestellt. Die im MS^1 -Modus bei m/z 1046,75 und m/z 1158,90 detektierten dominanten Gb3Cer-Spezies (Abbildung 27A) besitzen eine C16:0- bzw. C24:0-Fettsäure, während Spezies mit C22:0 bei m/z 1130,86 und C24:1 bei m/z 1156,89 nur als Nebenkomponten vorliegen. Weitere Peaks mit geringer Intensität bei m/z 1144,90 und m/z 1172,90 wurden tentativ Gb3Cer-Varianten mit den ungradzahligen Fettsäuren C23:0 und C25:0 zugeordnet. Die strukturelle Charakterisierung von Gb3Cer (d18:1, C24:0) ist in Abbildung 27B exemplarisch gezeigt. Der sequenzielle Verlust dreier Hexosen ergibt sich aus der Y-Ionenserie bei m/z 996,88 (Y_2), m/z 834,82 (Y_1) und m/z 627,73 (Y_0). Die zur Y-Serie komplementären B- und C-Ionen sowie einige interne Fragmentionen, die durch Ringspaltungen entstanden, wurden eindeutig nachgewiesen.

Im Übersichtsspektrum der Gb4Cer-Varianten wurden erneut hauptsächlich Spezies mit C16:0- bzw. C24:0-Fettsäure nachgewiesen (Abbildung 27C). Ferner konnten Gb4Cer-Spezies mit den Fettsäurenkettenlängen C21:0 bei m/z 1319,94, C22:0 bei m/z 1333,98, C23:0 bei m/z 1348,00 und C25:0 bei m/z 1376,01 als Minoritäten detektiert werden. Das CID-Spektrum von Gb4Cer (d18:1, C16:0) mit m/z 1249,87 in Abbildung 27D bestätigte diesen Strukturvorschlag. Die stärksten Signalintensitäten entsprachen den vollständigen Y- und B-Ionenserien, während zusätzlich einige Z- und C-Ionen sowie interne Fragmentionen, welche im Spektrum mit einem Stern markiert wurden, in geringerer Intensität auftraten.

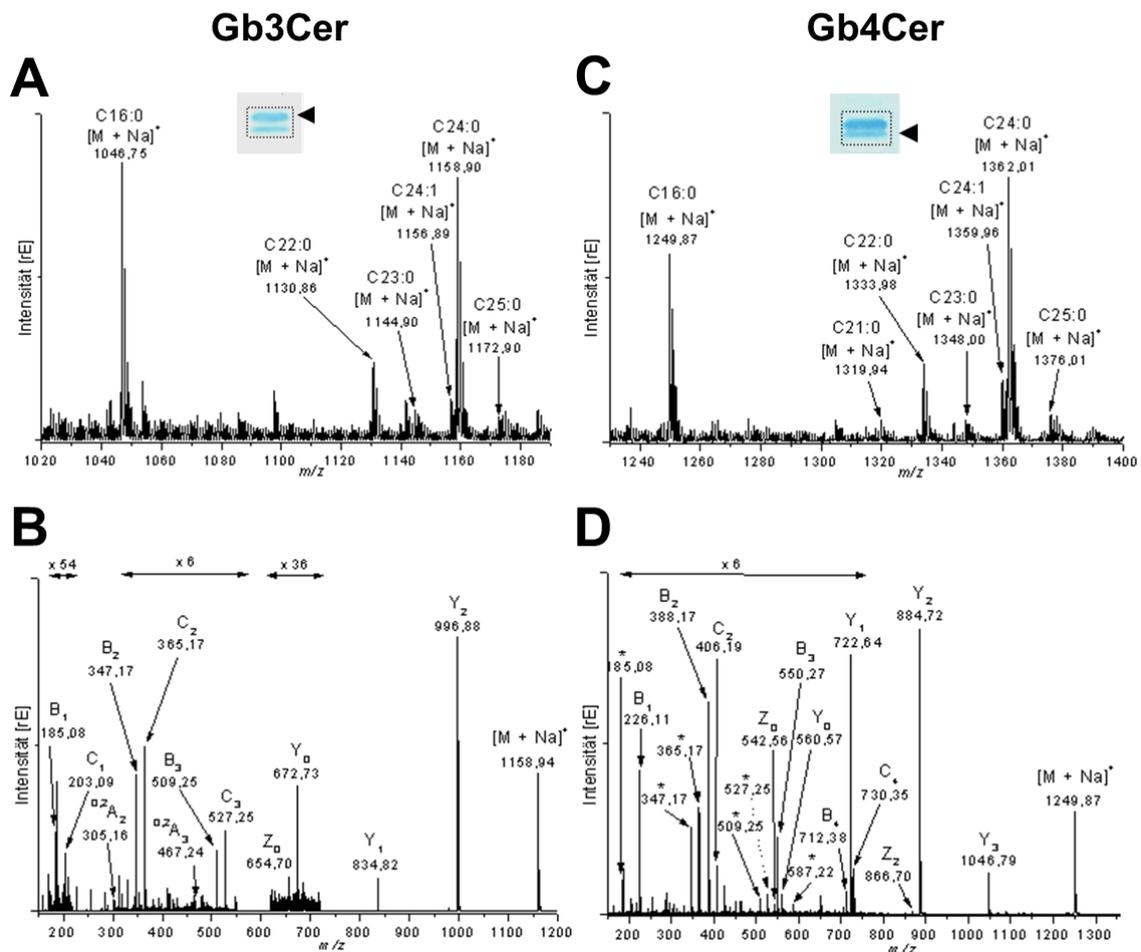


Abbildung 27: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von immundetektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Lebermetastasen-Zelllinie S2-007. Die gepunkteten Rechtecke markieren die immunpositiven Doppelbanden auf der HPTLC-Platte, die abgekratzt und aus der die GSL extrahiert wurden. Die Pfeile weisen auf die GSL-Spezies, dessen Vorläuferionen für die CID-Messung selektiert wurden. (A) MS¹-Spektrum der Gb3Cer-Doppelbande und Ausschnitt des entsprechenden Anti-Gb3Cer Overlay-Assays. (B) CID-Spektrum von Gb3Cer-Spezies (d18:1, C24:0) bei m/z 1158,94. (C) MS¹-Spektrum der Gb4Cer-Doppelbande und Ausschnitt des entsprechenden Anti-Gb4Cer Overlay-Assays. (D) CID-Spektrum von Gb4Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1249,87.

Aszites- und Lymphknotenmetastasen

Bei der Strukturanalyse der Gb3Cer-Varianten der Lymphknotenmetastasen-Zelllinie Hs 766T (Abbildung 28A) wurde ein vergleichbares Spektrum zu dem der Lebermetastasen-Zelllinie S2-007 (Abbildung 27A) mit den vorwiegend auftretenden Spezies mit C24:0-, C16:0- bzw. C22:0-Fettsäure generiert. Zusätzlich wurde mit geringerer Signalintensität Gb3Cer (d18:1, C23:0), Gb3Cer (d18:1, C24:1) und Gb3Cer (d18:1, C25:0) detektiert. Obwohl die Gb3Cer-Spezies mit C25:0-Fettsäure bei m/z 1172,90 nur eine Minorität darstellte, konnte bei den anschließenden CID-Experimenten diese Struktur durch die Detektion von allen Ionen der B-, C- und Y-Serie sowie einigen Z- und A-Ionen zweifelsfrei nachgewiesen werden (Abbildung 28B). Die Ergebnisse demonstrieren die Leistungsfähigkeit dieser Methode für die Strukturaufklärung von GSL, da selbst nur in Spuren auftretende GSL-Spezies eindeutig nach ihrem m/z -Verhältnis isoliert und durch CID-Experimente im Detail charakterisiert werden konnten.

Das MS¹-Spektrum der Gb4Cer-Spezies aus Hs 766T-Zellen (Abbildung 28C) zeigte nahezu identische Ionensignale wie das Spektrum von S2-007 (Lebermetastasen-Zelllinie) (Abbildung 27C). Als Hauptkomponenten wurden Gb4Cer-Spezies mit C24:0-, C22:0- und C16:0-Fettsäuren detektiert. Das CID-Spektrum von Gb4Cer (d18:1, C24:0) in Abbildung 28D weist alle Ionen der B- und Y-Serie sowie einige relevante Ionen der C- und Z-Serien auf und bestätigt die postulierte Struktur.

Bei dem Vergleich der beiden massenspektrometrischen Verfahren zeigte sich, dass mittels nanoESI-Q-TOF MS GSL-Spezies nachgewiesen wurden, die mittels IR-MALDI-o-TOF MS nicht detektiert werden konnten. Dabei handelte es sich um Gb3Cer (d18:1, C18:0) und Gb3Cer (d18:1, C16:0-OH) sowie Gb4Cer (d18:1, C16:0-OH) und Gb4Cer (d18:1, C26:0) (siehe Tabelle 18 und Tabelle 19). Dagegen konnten mit Hilfe der nanoESI-Q-TOF MS keine GSL-Spezies mit C25:1-Fettsäure nachgewiesen werden. Vermutlich lag dies daran, dass in der Gesamtmischung aller immunpositiven GSL-Varianten das relativ schwache Ionensignal im Vergleich zu den dominanten Signalen der anderen Spezies zu gering ausfiel, so dass es vom „Hintergrundrauschen“ nicht mehr zu unterscheiden war. Im Vergleich dazu lagen nach HPTLC-Trennung die GSL-Varianten (d18:1, C25:1) in der oberen Bande „höher konzentriert“ vor und wurden daher mittels

IR-MALDI-o-TOF MS noch erfasst. Die mittels IR-MALDI-o-TOF MS detektierten GSL-Varianten und postulierten Strukturvorschlage (siehe Tabelle 18 und Tabelle 19) konnten alle mit Hilfe der nanoESI-Q-TOF MS bestatigt bzw. detailliert verifiziert werden.

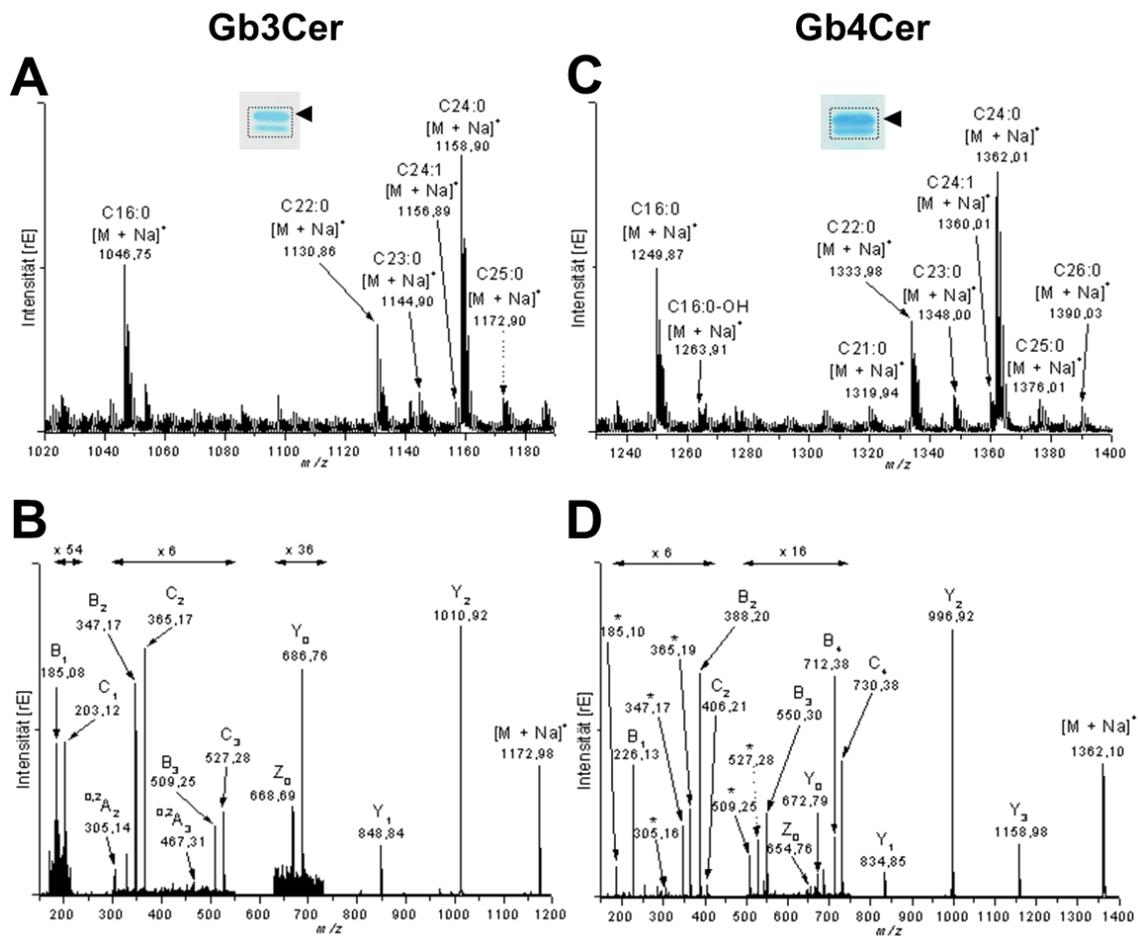


Abbildung 28: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von immundetektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Lymphknotenmetastasen-Zelllinie Hs 766T. Die gepunkteten Rechtecke markieren die immunpositiven Doppelbande auf der HPTLC-Platte, die abgekratzt und aus der die GSL extrahiert wurden. Die Pfeile weisen auf die GSL-Spezies, dessen Vorluferionen fur die CID-Messung selektiert wurden. (A) MS¹-Spektrum der Gb3Cer-Doppelbande und Ausschnitt des entsprechenden Anti-Gb3Cer Overlay-Assays. (B) CID-Spektrum von Gb3Cer-Spezies (d18:1, C25:0) bei m/z 1172,98. (C) MS¹-Spektrum der Gb4Cer-Doppelbande und Ausschnitt des entsprechenden Anti-Gb4Cer Overlay-Assays. (D) CID-Spektrum von Gb4Cer (d18:1, C24:0) bei m/z 1362,10.

4.5 Phospholipidbestimmung aus Gesamtlipidextrakten humaner Pankreaskarzinomzelllinien

Um die in den Pankreaskarzinomzelllinien enthaltenen Phospholipide zu charakterisieren, wurden die Gesamtlipidextrakte mittels HPTLC chromatographiert, die Phospholipide mittels Molybdänblaufärbung detektiert und durch Vergleich mit der Phospholipid-Referenzmischung (Tabelle 8) identifiziert. Die dadurch gewonnenen vorläufigen Indizien zu der Verteilung von Lipiden in Zellmembranen sollten anschließend mittels TOF-SIMS eingehender untersucht werden.

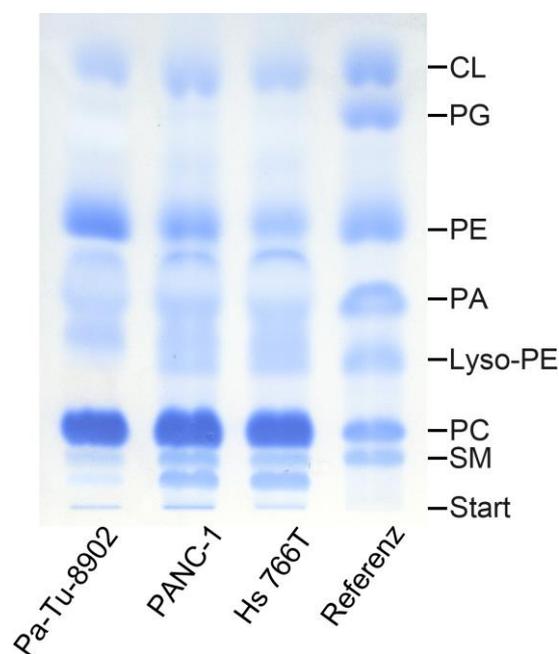


Abbildung 29: Nachweis von Phospholipiden im Gesamtlipidextrakt der Zelllinien Pa-Tu-8902, PANC-1 und Hs 766T. Aliquots entsprechend 5×10^5 Pa-Tu-8902- bzw. 1×10^6 PANC-1- und Hs 766T-Zellen wurden auf die HPTLC-Platte aufgetragen und dünnschichtchromatographisch getrennt. Als Phospholipid-Referenz wurde eine Mischung aus Cardiolipin (CL), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) eingesetzt.

Abbildung 29 zeigt den Molybdänblauachweis von Phospholipiden aus den Zelllinien Pa-Tu-8902, PANC-1 und Hs 766T. Diese Zelllinien wurden exemplarisch

ausgewählt, da sie besonders gut an den bei der TOF-SIMS eingesetzten *wafers* adhärten. Alle Zelllinien wiesen eine sehr ähnliche Phospholipidzusammensetzung auf. Durch Vergleich mit der Referenzmischung wurde Phosphatidylcholin (PC) als Hauptkomponente in allen drei Zelllinien identifiziert. Des Weiteren konnte ein ähnlicher Gehalt an Phosphatidylethanolamin (PE) in allen Zelllinien festgestellt werden. In geringerer Menge konnten ferner die Phospholipide Sphingomyelin (SM), Phosphatidsäure (PA) und Cardiolipin (CL) identifiziert werden; jedoch wurde kein Phosphatidylglycerol (PG) nachgewiesen. Lyso-Phosphatidylethanolamin (Lyso-PE) wurde nur in den Zelllinien PANC-1 und Hs 766T detektiert. Außerdem waren in allen Zelllinien drei Banden erkennbar, die keinem der Standardphospholipide der Referenzmischung zugeordnet werden konnten. Die unbekannt Phospholipide chromatographierten unterhalb von PE, PA bzw. SM. Vermutlich handelt es sich dabei um Lipoforen von Phospholipiden mit ungewöhnlichen Fettsäuren, die nicht Bestandteile der Phospholipid-Referenzmischung waren. Die Phospholipid-Referenzmischung besteht aus einzelnen Phospholipiden, die aus verschiedenen Organen des Rindes und aus Eigelb stammen (siehe Kapitel 8.2) und daher völlig andere Lipoforen aufweisen können als die Phospholipide aus den Zelllinien humanen Ursprungs.

Die prozentuale Verteilung der identifizierten bzw. zuordnungsfähigen Phospholipide in den Lipidextrakten der Zelllinien wurde densitometrisch bestimmt und ist in Tabelle 20 aufgeführt. Die densitometrisch bestimmten Peakintegrale aller Phospholipide einschließlich der unbekannt Phospholipide wurden aufsummiert und gleich 100 % gesetzt, so dass die Summe der quantifizierten bekannten Phospholipide erheblich < 100 % ist.

Tabelle 20: Prozentuale Anteile der identifizierten Phospholipide aus Gesamtlipidextrakten humaner Pankreaskarzinomzelllinien.

Phospholipid	Pa-Tu-8902 [%]	PANC-1 [%]	Hs 766T [%]
Cardiolipin	10,7	10,6	13,2
Phosphatidylglycerol	n. d.*	n. d.*	n. d.*
Phosphatidylethanolamin	26,5	15,3	11,5
Phosphatidsäure	7,4	8,7	6,4
Lyso-Phosphatidylethanolamin	n. d.*	5,1	10,5
Phosphatidylcholin	38,0	40,7	37,8
Sphingomyelin	1,1	5,6	4,3

*n. d. = nicht detektiert

Um eine hohe laterale Auflösung bei den anschließenden TOF-SIMS-Untersuchungen zu erhalten, bedarf es einer auf die jeweiligen Zelllinien individuell optimierter Probenpräparation, beispielsweise hinsichtlich der Waschlösung, der Größe der *spacer* und der Konzentration der *spacer*-Lösung. Da für die Primärtumor-Zelllinie PANC-1 die beste Probenpräparation erzielt wurde, werden im Folgenden die Ergebnisse der Experimente mit dieser Zelllinie dargelegt.

4.6 Untersuchung der Phosphatidylcholin- und Sphingomyelinverteilung mittels TOF-SIMS

Die Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 wurde exemplarisch mittels TOF-SIMS hinsichtlich der Verteilung von Cholin-Gruppen untersucht (siehe Abbildung 29 und Tabelle 20). Hierzu wurden die Zelllinie zunächst auf Silizium *wafers* kultiviert. Die *wafers* wurden mit 150 mM Ammoniumacetatlösung gewaschen, mit goldbeschichteten *wafers* gedeckelt und in flüssigem Propan schockgefroren. Durch die Gefrierbruchtechnik wurden die Plasmamembranen der Zellen „auseinander gerissen“, wobei die apikale Seite der Membran auf den goldbeschichteten *wafers*, die Zellreste mit der zytosolischen Seite der Plasmamembran auf den Silizium *wafers* verblieben. Die Komponenten der apikalen

Seite wurden mit einem Bi_3^+ -Primärionenstrahl ionisiert und mit einem TOF-Instrument entsprechend ihrer m/z -Verhältnisse getrennt und detektiert. Im Massenspektrum wurde das Cholin (mit einer Phosphat-Gruppe) als $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion bei $m/z = 184,1$ detektiert, welches als indirekter Nachweis von Phosphatidylcholin (PC) und theoretisch auch von Sphingomyelin (SM) dient. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass detektiertes Cholin von PC stammt und nur zu vernachlässigbar kleinen Anteilen von SM abgeleitet werden kann, da PC das dominante Phospholipid in PANC-1-Zellen darstellt (siehe Abbildung 29 und Tabelle 20).

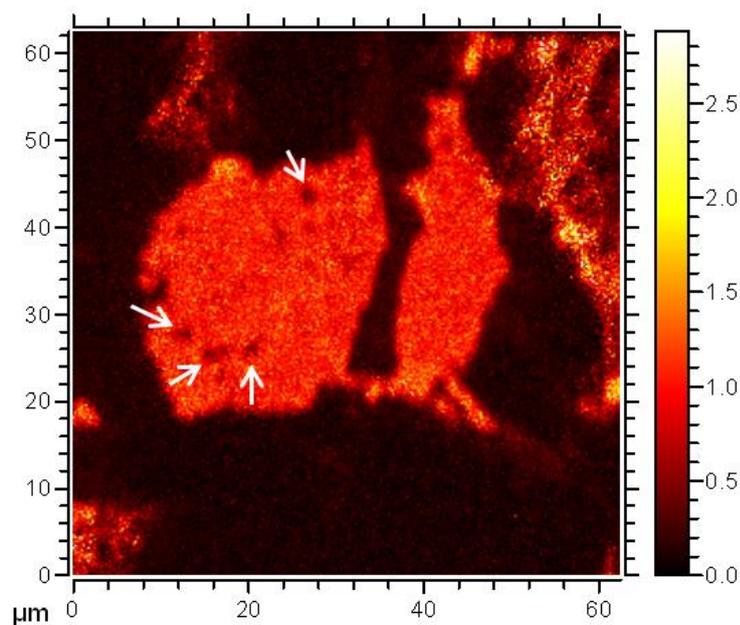


Abbildung 30: Ion imaging der apikalen Seite der Plasmamembran von PANC-1-Zellen. Die farbliche Visualisierung der Cholin-Phosphat-Kopfgruppen von Phosphatidylcholin (und eventuell partiell von Sphingomyelin) ($m/z = 184,1$; $[\text{M}+\text{H}]^+$) wurde auf Fettsäurereste normiert, wobei ein helleres Farbsignal einer höheren Analytkonzentration entspricht. Die weißen Pfeile markieren Cholin-arme Membranregionen.

Abbildung 30 zeigt das mit Hilfe der TOF-SIMS generierte *ion imaging* der apikalen Plasmamembranseite von PANC-1-Zellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Primärionenstrahl auf die „Innenseite“ der apikalen Seite, also praktisch auf den hydrophoben Bereich der Membran, gelenkt wurde. Das *image* zeigt die abgerissene apikale Schicht einer Zellmembran. Der dunkle Spalt zwischen dem relativ runden roten

Bereich und dem länglichen Areal stellt wahrscheinlich einen Riss in der apikalen Plasmamembranseite dar, der bei der Probenpräparation entstanden ist. Die hellroten bis gelben Bereiche innerhalb der Membran lassen erkennen, dass die Kopfgruppen von PC über einen großen Teil der Zelloberfläche verteilt nachgewiesen werden konnten. Dies kongruiert mit dem mittels HPTLC bestimmten hohen Gehalt an PC in PANC-1-Zellen (siehe Abbildung 29 und Tabelle 20). Es gibt jedoch auch Regionen, in denen Cholin in signifikant niedrigerer Intensität gemessen wurde und die als dunklere Areale in den Ionenverteilungsbildern erschienen. Diese Regionen werden in Abbildung 30 mit weißen Pfeilen gekennzeichnet und sind ungefähr 1 μm groß. Dies lässt darauf schließen, dass PC nicht homogen über die gesamte Zelloberfläche verteilt vorliegt, sondern in einigen Bereichen konzentrierter auftritt und dort akkumuliert und in anderen Domänen nur geringe Mengen an PC bzw. gar keine Cholin-haltigen Phospholipide vertreten sind.

Bislang können relativ große Moleküle wie GSL mittels TOF-SIMS nicht intakt ionisiert werden. Jedoch können über den SIMS-Nachweis der Cholin-Gruppe von Phosphatidylcholin deren Membranverteilung aufgrund der effizienten Ionisierung des Cholins untersucht werden.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine umfassende und systematische Studie zur zytotoxischen Wirkung von Stx2 auf humane Zelllinien unter Einbeziehung des Stx-Rezeptor-Gehalts und den molekularen Strukturen der Stx-Rezeptoren durchgeführt. Es galt zu klären, inwiefern ein Zusammenhang zwischen dem Rezeptor-Gehalt bzw. dem Vorkommen bestimmter Rezeptor-Lipofomen und einer erhöhten Stx2-Zytotoxizität besteht.

5.1 Sensitivitäten humaner Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Stx2

In der vorliegenden Arbeit wurden 15 verschiedene humane Pankreaskarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivitäten gegenüber Stx2 untersucht. Sechs Zelllinien entstammten Primärtumoren, fünf Zelllinien wurden aus Lebermetastasen isoliert und jeweils zwei Zelllinien wurden aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen etabliert. Die 15 Pankreaskarzinomzelllinien wiesen eine starke Varianz hinsichtlich ihrer Sensitivitäten gegenüber Stx2 auf. Die zellschädigende Wirkung von Stx2 reichte von extrem hohen Sensitivitäten mit CD_{50} -Werten im pg/ml-Bereich über eine relative Stx2-Unempfindlichkeit mit CD_{50} -Werten im $\mu\text{g/ml}$ -Bereich bis hin zur faktischen Resistenz, da bei einigen Zelllinien die Viabilität nicht unter 50 % sank und somit kein CD_{50} -Wert bestimmt werden konnte. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen dem Tumorgewebe (Primärtumor *versus* Metastasen und deren Zielgewebe) oder dem Differenzierungsgrad und der Stx2-Sensitivität festgestellt werden.

Am sensitivsten reagierte die Aszitesmetastasen-Zelllinie AsPC-1 auf Stx2. Bereits bei der niedrigsten eingesetzten Stx2-Konzentration von 0,1 pg/ml lag nur noch eine Viabilität um die 50 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen vor, wobei jedoch kein eindeutiger CD_{50} -Wert bestimmt werden konnte. Der niedrigste CD_{50} -Wert mit $9,4 \times 10^{-1}$ pg/ml wurde bei der Lebermetastasen-Zelllinie Pa-Tu-8988T ermittelt. Diese Sensitivität ist durchaus mit der Stx2-Sensitivität von den eigentlichen primären Zielzellen von Stx, den glomerulären mikrovaskulären Endothelzellen (engl.: *glomerular*

microvascular endothelial cells, GMVECs), vergleichbar. Für GMVECs wurde ein CD_{50} -Wert von $3,7 \times 10^{-1}$ pg/ml bestimmt (Betz *et al.*, 2012). Auch die Primärtumor-Zelllinie Pa-Tu-8902 zeigt mit einem CD_{50} -Wert von $9,7 \times 10^0$ pg/ml eine ähnlich hohe Sensitivität gegenüber Stx2. Der zytotoxischen Effekt von Stx2 auf das Gehirngewebe wurde mit Hilfe von humanen mikrovaskulären Gehirn-Endothelzellen (engl.: *human brain microvascular endothelial cells*, HBMECs) untersucht, bei denen der CD_{50} -Wert für eine Stx2-Konzentration von $3,8 \times 10^2$ pg/ml bestimmt wurde (Betz *et al.*, 2012). Verozellen (Nierenepithelzelllinie der Grünen Meerkatze) wurden eingehend hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Stx untersucht, da Stx aus EHEC aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung auf Verozellen entdeckt und zunächst Vero Toxine genannt wurden (Karmali, 1989). Der CD_{50} -Wert von Verozellen wurde für eine Stx2-Konzentration von $7,2 \times 10^1$ pg/ml ermittelt werden (Bauwens *et al.*, 2010). Eine vergleichbare Sensitivität weisen SU.86.86-Zellen (CD_{50} -Wert von $9,4 \times 10^1$ pg/ml) auf, während sich die CD_{50} -Werte der Zelllinien BxPC-3 und MIA PaCa-2 mit $4,5 \times 10^5$ pg/ml bzw. $6,8 \times 10^5$ pg/ml in einem ähnlichen Konzentrationsbereich bewegen wie der CD_{50} -Wert von $2,6 \times 10^5$ pg/ml der makrovaskulären Zelllinie EA.hy 926 (Fusion aus der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 und humanen Nabelschnurendothelzellen) (Bauwens *et al.*, 2010).

5.2 Stx-Rezeptoren und Glykosyltransferasen in humanen Pankreaskarzinomzelllinien

5.2.1 Gb3Cer-Gehalt und Expression der $\alpha 1,4$ -Galaktosyltransferase

Mit Hilfe der RT-PCR wurde in allen Pankreaskarzinomzelllinien die Expression der Glykosyltransferase $\alpha 1,4$ -GalT nachgewiesen. Diese katalysiert den Transfer einer Galaktose auf das Laktosylceramid und ermöglicht so die Biosynthese von Gb3Cer. Um eine Aussage über die relative Expressionsstärke der $\alpha 1,4$ -GalT in einzelnen Zelllinien treffen zu können, wurden jeweils identische RNA-Mengen eingesetzt. Die RT-PCR ließ die höchste $\alpha 1,4$ -GalT-Expression in der Lebermetastasen-Zelllinie SU.86.86 erkennen,

während die niedrigste Expression bei MIA PaCa-2, einem Primärtumorabkömmling, bestimmt wurde.

Mittels HPTLC, Immundetektion und anschließender densitometrischer Quantifizierung wurde der höchste Gb3Cer-Gehalt in der Aszitesmetastasen-Zelllinie AsPC-1 nachgewiesen. Der geringste Gb3Cer-Gehalt wurde bei der Lebermetastasen-Zelllinie S2-028 detektiert. Der Vergleich der α 1,4-GalT-Expression und des Gb3Cer-Gehalts ließ schon „nach Augenschein“ erkennen, dass eine hohe α 1,4-GalT-Expression nicht zwingend einen hohen Gb3Cer-Gehalt bedingt. Es muss berücksichtigt werden, dass die Biosynthese von Gb3Cer einen komplexen Vorgang darstellt, an dem zahlreiche Enzyme beteiligt sind. Die *de novo* Biosynthese von GSL beginnt mit der Synthese des Ceramids am ER durch die Serin-Palmitoyltransferase, die 3-Ketosphingandinreduktase und die Sphingandin-*N*-Acyltransferase. Anschließend wird entweder ein Galaktose- oder ein Glukosemolekül durch entsprechende Synthasen an das Ceramid gebunden. Im Fall der Gb3Cer-Synthese erfolgt nun die sequenzielle Übertragung von zwei Galaktosemolekülen, zunächst in β 1,4-Verknüpfung durch die β 1,4-GalT und anschließend in α 1,4-Verknüpfung durch α 1,4-GalT (siehe Abbildung 3) (Sandhoff & Kolter, 2003). Demzufolge kann trotz hoher Genexpression bei Verlusten der Funktion bzw. Aktivität einer dieser Glykosyltransferasen oder einem Mangel an essentiellen Komponenten, wie z. B. an aktivierten Monosacchariden oder an Vorläuferstrukturen (GlcCer und/oder Lc2Cer), kein bzw. nur geringfügig Gb3Cer synthetisiert werden.

5.2.2 Gb4Cer-Gehalt und Expression der β 1,3-N-Acetylgalaktosaminyltransferase

Die β 1,3-GalNAcT-Expression wurde mittels RT-PCR, mit Ausnahme der Primärtumor-Zelllinie MIA PaCa-2, in allen Panreaskarzinomzelllinien nachgewiesen. Hierbei konnte die stärkste Expression bei PANC-1 (Primärtumor), die schwächste bei MPanc-96 (Lymphknotenmetastase) festgestellt werden. Der höchste Gb4Cer-Gehalt wurde dagegen in der Lebermetastasen-Zelllinie Pa-Tu-8988T detektiert, während sowohl in HPAF-II-Zellen (Aszitesmetastase) als auch in MIA PaCa-2-Zellen gar kein Gb4Cer nachgewiesen werden konnte. Zwar ist die β 1,3-GalNAcT-Expression in HPAF-II relativ schwach, aber dennoch eindeutig nachweisbar (siehe Abbildung 16). Für EA.hy 926-

Zellen wurde gezeigt, dass bei geringer oder fehlender β 1,3-GalNAcT-Expression kein Gb4Cer synthetisiert werden und dadurch Gb3Cer akkumulieren kann (Schweppe *et al.*, 2008). Jedoch konnte bei den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien, analog zu dem Vergleich von α 1,4-GalT-Expression und Gb3Cer-Gehalt, kein Zusammenhang zwischen β 1,3-GalNAcT-Expression und Gb4Cer-Gehalt beobachtet werden.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays wurde deutlich, dass keine Korrelation zwischen dem Gehalt an Stx-Rezeptoren und der Sensitivität der Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber Stx2 besteht. Stx2 hatte beispielsweise den zweithöchsten zytotoxischen Effekt mit einem CD_{50} -Wert von 0,94 pg/ml auf die Lebermetastasen-Zelllinie PaTu-8988T, wohingegen sich PANC-1-Zellen (Primärtumorabkömmling) als resistent erwiesen (Tabelle 13). Allerdings wurde in Pa-Tu-8988T-Zellen nur ein relativ geringer Gehalt an Stx-Rezeptoren festgestellt, während die Zelllinie PANC-1 einen höheren GSL-Gehalt aufwies (Tabelle 16) (Storck *et al.*, 2012). Offensichtlich ist ein hoher Rezeptor-Gehalt allein nicht ausschlaggebend für eine Zellschädigung. Es wurde postuliert, dass einige Zellen dazu in der Lage sind, Stx entweder zu den Lysosomen zu transportieren und dort zu degradieren oder diese wieder ausschleusen können (Sandvig & Van Deurs, 1996). Somit stellt sich die Frage, welche der Pankreaskarzinomzelllinien eventuell über derartige Mechanismen verfügen.

Auch die Lokalisation in der Zellmembran kann sich auf die Zytotoxizität von Stx2 auf humane Zellen auswirken. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf die Organisation von GSL-Rezeptoren in *lipid rafts*, die die Zytotoxizität von Stx beeinflusst. Zur vollen Entfaltung der Zytotoxizität von Stx müssen GSL offenbar in Form von Clustern vorliegen, die eine hohe Bindungsaffinität gewährleisten, einen effizienten retrograden Transport nach Bindung an den Rezeptor und so die Inhibition der Proteinbiosynthese ermöglichen (Sandvig *et al.*, 1992; Jacewicz *et al.*, 1994; Sandvig & van Deurs, 1994). Dass die Anreicherung des zellulären Rezeptors Gb3Cer in *lipid rafts* in der Tat die Voraussetzung für eine effektive Bindung, den anschließenden intrazellulären retrograden Transport von Stx und dessen Zytotoxizität darstellt, konnte von Falguières *et al.* (2001) für HeLa-Zellen und von Smith *et al.* (2006) für Vero Zellen gezeigt werden.

Neben GSL akkumuliert auch Cholesterol in *lipid rafts*, welches *lipid raft*-assoziiertes Gb3Cer maskieren und so die Rezeptorerkennung durch das Stx einschränken bzw. verhindern kann (Mahfoud *et al.*, 2010). Allerdings liegt Gb3Cer nicht in allen Zellen *lipid raft*-assoziiert vor. In GMVECs, den wesentlichen Zielzellen für Stx in der Niere, liegen die Stx-Rezeptoren nicht mit Mikrodomänen assoziiert vor und zeigen dennoch eine extrem hohe Sensitivität gegenüber Stx2 (Betz *et al.*, 2012). Nichtsdestotrotz könnte die Lokalisation von Stx-Rezeptoren durch Isolierung von Mikrodomänen als DRMs (engl.: *detergent-resistant membranes*) in dem Kollektiv der 15 Pankreaskarzinomzelllinien, *lipid raft*-assoziiert oder nicht *lipid raft*-assoziiert, zukünftig für ein genaueres Verständnis der Stx-Rezeptor-Wechselwirkung und der zytotoxischen Wirkung von Stx beitragen.

5.2.3 Funktionalität von verschiedenen Gb3Cer- und Gb4Cer-Lipoformen

Für die detaillierte strukturelle Analyse von Stx-Rezeptoren hat sich die Massenspektrometrie als das am besten geeignete Verfahren erwiesen. Mit Hilfe der direkten Kopplung von HPTLC und IR-MALDI-o-TOF MS kann die Komposition der verschiedenen GSL-Spezies nachgewiesen werden. Dabei kann eine hohe Sensitivität bis zu einem Nanogramm erzielt werden (Distler *et al.*, 2008), da eine vorherige Probenpräparation entfällt, die den Verlust von Probenmaterial bedeuten würde (Meisen *et al.*, 2004, 2005). Bei optimierter Extraktion von GSL aus dem Kieselgel eignet sich auch die nanoESI-Q-TOF MS zu der Identifizierung der in Pankreaskarzinomzelllinien enthaltenen GSL-Spezies. Anschließende CID-Experimente dienen der exakten Strukturbestimmung der Oligosaccharid- und der Ceramidkomponenten.

Die Hauptkomponenten der Stx-Rezeptoren in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien stellten die Gb3Cer- bzw. Gb4Cer-Spezies mit C16:0-, oder C24:1/24:0-Fettsäuren dar. Als Nebenkomponten wurden GSL-Spezies mit C22:0-Fettsäuren detektiert sowie nur geringfügig auftretende Komponenten mit C23:0- und C25:0-Fettsäuren. Gb3Cer-Varianten mit C18:0-Fettsäure waren ausschließlich mittels nanoESI-Q-TOF MS nachweisbar.

Bei dem Vergleich beider Methoden ist zu beachten, dass die Präsenz des Ionensignals m/z 1062,63 unterschiedlichen Gb3Cer-Spezies zugeordnet werden kann. Bei der IR-MALDI-o-TOF MS wird dieses Signal eher dem $[M+K]^+$ -Ion von Gb3Cer (d18:1, C16:0) zugewiesen, da mit dem Laser spezifisch die untere Bande der Spezies mit C16-Fettsäure ionisiert wird. Dagegen wird für die Analyse mit Hilfe der nanoESI-Q-TOF MS die gesamte immungefärbte Region von der HPTLC-Platte extrahiert und untersucht, so dass die Gb3Cer-Spezies mit hydroxylierter Fettsäure (Gb3Cer (d18:1, C16:0-OH)) zusammen mit den anderen Varianten analysiert und als Natriumaddukt bei m/z 1062,63 detektiert werden konnten. Es wurde beobachtet, dass eine Hydroxylierung in der Fettsäure des Ceramids von Gb3Cer die Bindungsaffinität von Stx erhöhen kann (Binnington *et al.*, 2002; Bergan *et al.*, 2012). Doch vermeintliche Hydroxylierungen ergeben nicht automatisch auch eine hohe Stx-Zytotoxizität, wie die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen. Gb3Cer-Spezies, die auf Hydroxylierungen schließen lassen, wurden vor allem in den Zelllinien HPAF-II, AsPC-1, Capan-1, BxPC-3 und MPanc-96 nachgewiesen. Davon zeigten jedoch nur Zellen von BxPC-3 einen konstanten Verlust in ihrer Vitalität, während Stx kaum eine Wirkung auf die Vitalität der Zelllinien HPAF-II und MPanc-96 zeigte. Die Vitalität von Capan-1-Zellen nahm erst bei relativ hohen Stx2-Konzentrationen ab und der Einfluss von Stx2 auf Zellen von AsPC-1 ist äußerst schwer zu beurteilen, da bereits bei der geringsten applizierten Stx2-Konzentration eine Vitalität von $\sim 50\%$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen vorlag und dieser Wert weitestgehend konstant blieb (Storck *et al.*, 2012). Diese unterschiedlichen Reaktionen von Zelllinien mit (vermutlich) hydroxylierten Gb3Cer-Spezies erlauben keine eindeutige Aussage über eine verstärkende Wirkung von Stx bzw. eine Bekräftigung dieser Theorie (Binnington *et al.*, 2002).

Neben den bereits genannten Faktoren, die sich auf die zytotoxische Wirkung von Stx auswirken, könnten auch die verschiedenen Gb3Cer-Lipoformen involviert sein. Stx weisen variierende Bindungsaffinitäten zu unterschiedlichen Lipoformen auf (Kiarash *et al.*, 1994), allerdings wurde gezeigt, dass die Bindungsaffinität ebenfalls durch die Präsentation von unterschiedlichen Gb3Cer-Spezies erhöht wird (Pellizzari *et al.*, 1992). Die untersuchten Karzinomzelllinien des Pankreas' ließen eine gewisse Diversität an enthaltenen Gb3Cer-Spezies erkennen, jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen dem

Gehalt einer bestimmten Gb3Cer-Spezies und einer erhöhten Stx2-Zytotoxizität festgestellt werden.

Anhand von Astrozytom-Zelllinien und der Hep-2-Zelllinie wurde weiterhin postuliert, dass Rezeptoren mit kurzkettiger, vorwiegend C16-Fettsäure im Ceramid mit einem effizienten retrograden Transport assoziiert sein sollen (Arab & Lingwood, 1998; Raa *et al.*, 2009). Die vorliegenden Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays und der strukturellen Rezeptorcharakterisierung mittels Massenspektrometrie weisen jedoch darauf hin, dass das Vorkommen der Gb3Cer-Spezies (d18:1, C16:0) allein nicht für die Sensitivität einer Zelllinie verantwortlich ist. Die Zelllinie HPAF-II könnte diese Hypothese bestätigen, da sie nur im geringen Maße Gb3Cer-Spezies mit C16-Fettsäuren exprimiert und nur bei hohen Stx-Konzentrationen ihre Vitalität einbüßt. Auch die Zelllinien Pa-Tu-8988T und SU.86.86 könnten diese Hypothese aufgrund des hohen Gehalts an kurzkettigen Fettsäuren in den Gb3Cer-Molekülen bei gleichzeitiger extremer Sensitivität gegenüber Stx2 bekräftigen. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Zelllinien wie S2-007 und S2-028 trotz hoher Mengen an Gb3Cer-Spezies (d18:1, C16:0) ebenfalls als relativ widerstandsfähig gegenüber Stx2 erwiesen. Dagegen wurde bei einigen Zelllinien, wie beispielsweise Hs 766T, trotz hoher Anteile an Gb3Cer-Rezeptoren mit langkettiger Fettsäure (~ 62 %) eine starke Stx2-bedingte Zytotoxizität beobachtet (Storck *et al.*, 2012).

Als weitere mögliche Erklärung für die Resistenz einiger Zelllinien gegenüber Stx2 kann angeführt werden, dass das internalisierte Stx während des retrograden Transports auch zu den Lysosomen gelangen und dort degradiert werden kann (Sandvig *et al.*, 1992). Dieser Vorgang scheint wiederum von der retrograden Sortierung von Gb3Cer-gebundenem Stx und so von der Fettsäurenlänge der Gb3Cer-Moleküle abhängig zu sein (Bergan *et al.*, 2012), was es zukünftig für Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen gilt.

Neueste Untersuchungen berichten außerdem, dass Stx nicht allein über das B-Pentamer Gb3Cer-vermittelt an die Zelle gebunden werden, sondern auch eine gewisse Bindungsaffinität über die A-Untereinheit an TLR4 (engl.: *toll-like receptor 4*) aufweisen (Torgersen *et al.*, 2011; Brigotti, 2012). TLR werden ebenfalls auf der Zelloberfläche exponiert und sind bei der Erkennung von PAMPs (engl.: *pathogen associated molecular patterns*) von Bedeutung. So erkennt TLR4 beispielsweise das LPS (Lipopolysaccharid)

von Pathogenen, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird (Poltorak, 1998). Es gilt weiterhin zu klären, inwieweit diese Bindungsart Einfluss auf den retrograden Transport nimmt und in welchem Ausmaß TLR4 von den Pankreaskarzinomzelllinien exprimiert wird.

Ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Gb3Cer-Lipofomen und der Stx-Sensitivität ist dabei in humanen duktalem Adenokarzinomen des Pankreas nicht erkennbar. Das Vorkommen einer bestimmten Gb3Cer-Spezies konnte keiner speziellen physiologischen/biologischen Funktion in Bezug auf die Stx2-bedingte Zytotoxizität zugeordnet werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass ein komplexes Zusammenspiel verschiedener physiologischer Bedingungen in der Zelle für die Stx-vermittelte Zytotoxizität vorliegt, welches bisher nur in Ansätzen verstanden ist. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um diese molekularen Mechanismen aufzudecken.

5.3 Statistische Analyse

Mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman wurde mathematisch überprüft, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Sensitivität humaner Zelllinien gegenüber Stx2, der Expression der die Synthese der Stx-Rezeptoren katalysierenden Glykosyltransferasen und dem Rezeptor-Gehalt besteht. Für die 15 Zelllinien ist bei Testung auf dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,005$ der kritische Wert von $r_s = 0,654$. Die Ergebnisse konnten mathematisch belegen, dass keine Korrelation zwischen der Stx2-Sensitivität der Zelllinien und deren Gb3Cer-Gehalten ($r_s = 0,201$) besteht und somit weitere, bislang unbekannte Faktoren einen Einfluss auf den zytotoxischen Effekt von Stx2 haben müssen. Auch bei dem Vergleich der Gb3Cer-Gehalte und der Expression der Gb3Cer-Synthase $\alpha 1,4$ -GalT ($r_s = 0,139$) und der Gb4Cer-Gehalte und der Gb4Cer-Synthase $\beta 1,3$ -GalNAcT ($r_s = 0,521$) konnte keine Korrelation festgestellt werden. Das Gleiche gilt für den Vergleich der jeweiligen Gehalte an Gb3Cer und Gb4Cer ($r_s = 0,096$) und der $\alpha 1,4$ -GalT- und $\beta 1,3$ -GalNAcT-Expression ($r_s = 0,164$). Auch der CD_{50} -Wert und die $\alpha 1,4$ -GalT ($r_s = 0,229$) bzw. die $\beta 1,3$ -GalNAcT ($r_s = 0,358$) zeigen keine Korrelation.

Interassanterweise wurde mit einem Korrelationskoeffizienten von $r_s = 0,682$ ein signifikanter Zusammenhang zwischen den CD_{50} -Werten als Maß für die Sensitivität und dem Gb4Cer-Gehalt ermittelt. Da es sich bei Gb4Cer jedoch lediglich um den niedrigaffinen Rezeptor von Stx2 handelt, ist dieses Ergebnis wahrscheinlich für die tatsächliche Stx2-bedingte Zytotoxizität von geringer Bedeutung.

5.4 Shiga Toxine als potentielle Tumor-Therapeutika

In zwei unabhängigen Publikationen wurde bereits gezeigt, dass eine Überexpression von Gb3Cer bei 62 % (Distler *et al.*, 2009) bzw. 78 % (Maak *et al.*, 2011) der humanen adenokarzinoiden Pankreasgeweben im Vergleich zu gesundem Gewebe vorliegt, was auf eine Assoziation dieses Markers mit neoplastischer Transformation in Pankreasgeweben hindeutet. Bei der Untersuchung der Pankreaskarzinomzelllinien MIA PaCa-2 und BxPC-3 wurde ebenso eine eindeutige Gb3Cer-Expression festgestellt, wobei ein höherer Gb3Cer-Gehalt in MIA PaCa-2 als in BxPC3 nachgewiesen wurde (Maak *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse widersprechen den in dieser Dissertation vorgelegten Resultaten, da hier ein höherer Gb3Cer-Gehalt in BxPC-3 als in MIA PaCa-2 detektiert wurde. Diese Diskrepanz kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen werden, die nicht weiter erklärt werden können.

Eine Gb3Cer-Überexpression wurde außerdem auch in anderen Tumorarten nachgewiesen. In primären humanen Ovarialtumoren und daraus hervorgegangenen Metastasen wurde im Vergleich zu den simultan analysierten gesunden Ovarien ein gesteigerter Gehalt an Gb3Cer beobachtet. Zudem wurde bei der Untersuchung von vier unterschiedlichen Brustkrebszelllinien festgestellt, dass drei dieser Zelllinien, die keine Sensitivität gegenüber Stx zeigten, kein Gb3Cer enthielten, während die verbliebene, sensitive Zelllinie Gb3Cer-positiv war (Farkas-Himsley *et al.*, 1995). Auch in humanen Astrozytom- und Meningiomzelllinien wurden die Expression von Gb3Cer und die Sensitivität gegenüber Stx1 detektiert sowie die Schädigung der Tumervaskulatur beschrieben (Arab *et al.*, 1999). Ferner wurde im Mausmodell gezeigt, dass bei Stx1-Zugabe in Astrozytomen Apoptose ausgelöst wird, wodurch auf lange Sicht das

Astrozytom eliminiert wurde und im Nacktmausmodell die Überlebensrate bei Meningiomen signifikant erhöht wurde (Arab *et al.*, 1999; Salhia *et al.*, 2002). Die Überexpression von Gb3Cer und Stx1-induzierte Apoptose trifft auch auf humane Gliomzelllinien zu (Johansson *et al.*, 2006). In (metastasierenden) Kolonkarzinomen wurde ebenfalls eine hohe Gb3Cer-Expression detektiert (Kovbasnjuk *et al.*, 2005; Distler *et al.*, 2009) und ein an StxB gebundener Reporter konnte spezifisch in das Tumorgewebe transportiert werden (Falguières *et al.*, 2008).

Diese beachtliche Anzahl unabhängiger Studien, die eine Gb3Cer-Überexpression in diversen neoplastischen Transformationen belegen, erlauben die ernsthafte Erwägung, Stx oder die StxB-Untereinheit zukünftig für neuartige onkologische Applikationen nutzbar zu machen (Johannes & Römer, 2010; Engedal *et al.*, 2011; Bergan *et al.*, 2012). Weiterhin könnte auch die A-Untereinheit, die die *N*-Glykosidaseaktivität besitzt, in der Tumorbehandlung eingesetzt werden. In Zellkulturmodellen wurde gezeigt, dass ein Fusionsprotein aus VEGF (engl.: *vascular epithelial growth factor*) und StxA bei hoher Expression des VEGFR-2 (VEGF *receptor* 2) zytotoxisch auf humane Pankreaskarzinomzelllinien (AsPC-1 und HPAF-II), nicht aber auf normale Endothelzellen (HUVEC) wirkt (Hotz *et al.*, 2010). Allerdings bedarf es weiterer intensiver Funktionstests, bis effiziente und spezifische Stx-basierte Adjuvanzen konstruiert und in klinischen Studien appliziert werden können, da bisher noch viele einflussnehmende Faktoren und Wirkungsmechanismen des Stx nicht oder nur teilweise aufgeklärt sind.

Sollte die gezielte Anwendung von Stx als zytotoxisches Pharmazeutikum auch nicht direkt realisiert werden können, so ist andernfalls der Einsatz von an StxB-gelabelten Markermolekülen für die Diagnostik von Gb3Cer-positiven Tumorzellen denkbar. In zwei verschiedenen *in vivo* Untersuchungen in murinen Tumormodellen konnten Tumorzellen mit Fluorochrom- bzw. Isotop-markiertem StxB gelabelt werden. Allerdings erfolgte die Tumormarkierung nicht in ausreichender Spezifität, weshalb eine Akkumulation der Signale ebenso in anderen Geweben auftrat und so zu einem erheblichen Hintergrundsignal führte (Janssen *et al.*, 2006; zitiert nach Viel *et al.*, 2008; Bergan *et al.*, 2012). Es bedarf also weiterer Optimierungen, bis derartige Methoden für klinische Behandlungen eingesetzt werden können. Dennoch ist vorstellbar, dass diese Ansätze beispielsweise beim *imaging* Verwendung finden, um möglicherweise eine klare

Abgrenzung von gesundem und neoplastischem Gewebe zu erzielen und so Tumorgewebe chirurgisch distinkter entfernen zu können.

5.5 TOF-SIMS imaging und lipid rafts

Das *ion imaging* mittels TOF-SIMS bietet ein hohes Potential für die Lokalisation von Zelloberflächenstrukturen bekannter m/z -Verhältnisse in Gewebeschnitten und Zellkulturen. Allerdings erweist sich die Tatsache, dass sich ausschließlich Fragmentationen in genügend hoher Intensität detektieren lassen, als problematisch. Für eine hohe laterale Auflösung der Ionenverteilungsbilder sind hohe Ionensignale unabdingbar. Spezifische Signale können zwar beispielsweise eindeutig bestimmten funktionellen Gruppen zugeordnet werden, aber die funktionellen Gruppen können von unterschiedlichen Membrankomponenten abstammen. Aufgrund der polaren Eigenschaften von Cholin konnte es mittels TOF-SIMS gut ionisiert werden und somit durch starke Ionensignale dessen Verteilung in der apikalen Seite der Zellmembran mit hoher Ortsauflösung bestimmt werden. Allerdings kann das detektierte Cholin in Abbildung 30 (siehe Kapitel 4.6) sowohl von PC als auch von SM abstammen. Da PC das dominierende Phospholipid in der untersuchten Zelllinie PANC-1 darstellt (siehe Abbildung 29), kann die Mehrheit der Ionensignale diesem Molekül zugeordnet werden. Dies zeigt, dass immer auch die postulierten Moleküle im Gesamtkontext der Zelle untersucht werden sollten, um eine Abschätzung darüber machen zu können, zu welchen Anteilen die Fragmentationensignale welchem Phospholipid zugeordnet werden können. Die auffälligen Areale der Zellmembran, die weder PC noch SM aufweisen, lässt Spielraum für viele Hypothesen, z. B., ob in diesen Bereichen andere dominierende Moleküle das PC und das SM verdrängen.

Neben ausstehenden Optimierungen hinsichtlich der Probenpräparation, wie z. B. der Generierung von intakten apikalen Membranen, gilt es nun, die Verteilung auch anderer Membrankomponenten, wie beispielsweise Cholesterol als Marker für *lipid rafts*, mittels TOF-SIMS zu bestimmen. Zudem stellt der Nachweis von Verteilungsunterschieden von GSL- oder SM-spezifischen Fragmentationen ein erstrebenswertes Ziel dar. Somit könnte

massenspektrometrisch belegt werden, ob GSL und SM miteinander assoziiert vorliegen und ob diese in Mikrodomänen akkumulieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Shiga Toxine (Stx) gehören zur Familie der Ribosomen-inaktivierenden Proteine und besitzen eine hohe Zytotoxizität. Sie stellen die Hauptvirulenzfaktoren von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* dar, welche blutige Durchfälle, hämorrhagische Kolitis und, durch Schädigungen des Nieren- und cerebralen Gewebes, das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) hervorrufen können. Stx binden mit hoher Affinität an das neutrale Glykosphingolipid (GSL) Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und mit niedriger Affinität an Globotetraosylceramid (Gb4Cer). Die Zytotoxizität der Stx, resultierend aus der Bindung, der anschließenden Internalisierung über Endozytose und Hemmung der Proteinbiosynthese, wird dabei mutmaßlich von dem Ausmaß des Gehalts an Rezeptoren und dem Auftreten verschiedener Rezeptor-Isoformen beeinflusst.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 15 Zelllinien, die sowohl aus Primärtumoren als auch aus diversen Metastasen des humanen duktales Adenokarzinoms des Pankreas' entstammen, zunächst hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Stx2 anhand von Zytotoxizitäts-Assays untersucht. Sechs Zelllinien entstammten Primärtumoren, fünf Zelllinien waren Lebermetastasen und jeweils zwei Zelllinien stellten Aszites- bzw. Lymphknotenmetastasen dar. Die Zytotoxizitäts-Assays ergaben, dass die 15 verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Stx2-vermittelten Zellschädigung aufweisen. Diese reichte von einer extrem hohen Sensitivität bei der Zelllinie Pa-Tu-8988T mit einem CD_{50} -Wert von 0,94 pg/ml über eine relativ hohe Widerstandsfähigkeit bei Capan-2 mit einem CD_{50} -Wert von 5,8 µg/ml bis hin zur faktischen Resistenz gegenüber Stx2, da in einigen Fällen, z. B. bei S2-007-Zellen, selbst bei der höchsten eingesetzten Stx2-Konzentration von 10 µg/ml kein CD_{50} -Wert bestimmt werden konnte.

Mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde anschließend in allen 15 Pankreaskarzinomzelllinien die Expression der Gb3Cer-Synthase α 1,4-Galaktosyltransferase (α 1,4-GalT) und, mit Ausnahme der Zelllinie MIA PaCa-2, die der Gb4Cer-Synthase β 1,3-N-Acetylgalaktosaminyltransferase (β 1,3-GalNAcT) nachgewiesen.

Nach Extraktion der GSL aus den Zellen sowie Trennung der neutralen GSL von den Gangliosiden mittels Anionenaustauschchromatographie wurde der Gehalt an Gb3Cer

und Gb4Cer aller 15 Zelllinien bestimmt. Durch Auftrennung der Fraktion der neutralen GSL mittels Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) und anschließender Immundetektion, die mit Stx2 bzw. mit Gb3Cer- und Gb4Cer-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass sämtliche Zelllinien den hochaffinen Stx-Rezeptor Gb3Cer und die Mehrheit der Zelllinien auch den niedrigaffinen Stx-Rezeptor Gb4Cer synthetisieren. Dieser Befund stimmte, mit Ausnahme der Zelllinie HPAF-II, mit den positiven Ergebnissen der Transkriptionsanalysen hinsichtlich der Expression der α 1,4-GalT und der β 1,3-GalNAcT überein. Auffällig waren die immungefärbten Doppelbanden-Muster beider GSL und die erheblichen Variationen der Zelllinien bezüglich ihres Gb3Cer- und Gb4Cer-Gehalts.

Durch die Anwendung der IR-MALDI-o-TOF Massenspektrometrie (MS) wurden präliminäre Informationen über die Strukturen der Stx-Rezeptoren erhalten. Als Hauptkomponenten wurden Gb3Cer- und Gb4Cer-Varianten mit konstantem Sphingosin (d18:1) sowie C16:0-, C24:1- oder C24:0-Fettsäure nachgewiesen, wobei Spezies mit C16-Fettsäure in der unteren Bande und Spezies mit C24:1- oder C24:0-Fettsäure in der oberen Bande migrierten. Als Minoritäten wurden die GSL-Spezies mit C18:0-Fettsäure in der unteren Bande und solche mit C21:0-, C22:0-, C23:0-, C25:1- oder C25:0-Fettsäure in der oberen Bande detektiert.

Nachfolgende, mit Hilfe der nanoESI-Q-TOF MS durchgeführte detaillierte Strukturaufklärungen bestätigten die bei der IR-MALDI-o-TOF MS postulierten GSL-Varianten, da durch CID-Experimente die für die Oligosaccharidstrukturen spezifischen Fragmentionen-Serien nachgewiesen werden konnten. Selbst Minoritäten, beispielsweise Gb3Cer (d18:1, C25:0), konnten mittels CID strukturell eindeutig identifiziert werden.

Eine Korrelation zwischen der Expression der Glykosyltransferasen bzw. dem GSL-Gehalt in den einzelnen Zelllinien und deren Sensitivität gegenüber Stx2 war nicht zu erkennen. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer bestimmten GSL-Spezies und beispielsweise einer erhöhten zytotoxischen Wirkung von Stx2 auf die Zelllinien bestand ebenfalls nicht. Es muss daher in zukünftigen Arbeiten geklärt werden, inwiefern eine unterschiedliche Verteilung der GSL in Mikrodomänen (*lipid rafts*) der Plasmamembran oder divergierende intrazelluläre retrograde Transportrouten des Stx2 ursächlich für die unterschiedlichen Sensitivitäten verantwortlich sein könnten.

Schließlich wurden exemplarisch TOF-SIMS-Untersuchungen mit der Zelllinie PANC-1 durchgeführt, um über den Nachweis der Cholin-Gruppe erste Hinweise auf die

Verteilung von Phosphatidylcholin (PC) in Zellmembranen zu erhalten. HPTLC-Untersuchungen zur Phospholipidzusammensetzung zeigten, dass PC das dominierende Phospholipid darstellte. TOF-SIMS-Messungen ergaben, dass PC relativ homogen in der Plasmamembran verteilt vorlag.

Abschließend ist festzuhalten, dass Gb3Cer eine vielversprechende Zielstruktur für eine potentielle Adjuvanttherapie bei Pankreaskarzinomen darstellt. Pankreaskarzinomzelllinien könnten als Modelle eingesetzt werden, um die molekularen Mechanismen, die einer Zellschädigung durch Stx zugrunde liegen, aufzuklären und darauf aufbauend Stx-basierte Tumorthérapien zu entwickeln.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams J & Ann Q (1993). Structure determination of sphingolipids by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **12**, 51–85.
- Antão E-M, Wieler LH & Ewers C (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* **1**, 22.
- Arab S & Lingwood CA (1998). Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum/nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. *Journal of Cellular Physiology* **177**, 646–660.
- Arab S, Rutka J & Lingwood C (1999). Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol Res* **11**, 33–39.
- Arlinghaus HF (2008). Possibilities and limitations of high-resolution mass spectrometry in life sciences. *Applied Surface Science* **255**, 1058–1063.
- Bast DJ, Banerjee L, Clark C, Read RJ & Brunton JL (1999). The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. *Mol Microbiol* **32**, 953–960.
- Bauwens A, Bielaszewska M, Kemper B, Langehanenberg P, Von Bally G, Reichelt R, Mulac D, Humpf H-U, Friedrich AW, Kim KS, Karch H & Müthing J (2010). Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* **105**, 515–528.
- Bergan J, Dyve Lingelem AB, Simm R, Skotland T & Sandvig K (2012). Shiga toxins. *Toxicon* **60**, 1085–1107.
- Berman ESF, Fortson SL, Checchi KD, Wu L, Felton JS, Wu KJJ & Kulp KS (2008). Preparation of single cells for imaging/profiling mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**, 1230–1236.
- Betz J, Bauwens A, Kunsmann L, Bielaszewska M, Mormann M, Humpf H-U, Karch H, Friedrich AW & Müthing J (2012). Uncommon membrane distribution of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in toxin-sensitive human glomerular microvascular endothelial cells. *Biological Chemistry* **393**, 133–147.
- Betz J, Bielaszewska M, Thies A, Humpf HU, Dreisewerd K, Karch H, Kim KS, Friedrich AW & Müthing J (2011). Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *Journal of Lipid Research* **52**, 618–634.

-
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G & Karch H (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* **11**, 671–676.
- Binnington B, Lingwood D, Nutikka A & Lingwood CA (2002). Effect of globotriaosyl ceramide fatty acid alpha-hydroxylation on the binding by verotoxin 1 and verotoxin 2. *Neurochem Res* **27**, 807–813.
- Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP & Gyles CL (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* **37**, 497–503.
- Boyd B, Magnusson G, Zhiuyan Z & Lingwood CA (1994). Lipid modulation of glycolipid receptor function. *European Journal of Biochemistry* **223**, 873–878.
- Brigotti M (2012). The Interactions of Human Neutrophils with Shiga Toxins and Related Plant Toxins: Danger or Safety? *Toxins (Basel)* **4**, 157–190.
- Brown JE, Ussery MA, Leppla SH & Rothman SW (1980). Inhibition of protein synthesis by Shiga toxin: activation of the toxin and inhibition of peptide elongation. *FEBS Lett* **117**, 84–88.
- Campbell NA, Reece JB & Markl J (2003). *Biologie*, 6. A. Spektrum Akademischer Verlag.
- Distler U, Hülsewig M, Souady J, Dreisewerd K, Haier J, Senninger N, Friedrich AW, Karch H, Hillenkamp F, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J & Müthing J (2008). Matching IR-MALDI-o-TOF Mass Spectrometry with the TLC Overlay Binding Assay and Its Clinical Application for Tracing Tumor-Associated Glycosphingolipids in Hepatocellular and Pancreatic Cancer. *Analytical Chemistry* **80**, 1835–1846.
- Distler U, Souady J, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Friedrich AW, Karch H, Senninger N, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Schmidt MA, Peter-Katalinić J & Müthing J (2009). Shiga Toxin Receptor Gb3Cer/CD77: Tumor-Association and Promising Therapeutic Target in Pancreas and Colon Cancer ed. Häcker G. *PLoS ONE* **4**, e6813.
- Domon B & Costello CE (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal* **5**, 397–409.
- Dreisewerd K (2003). The desorption process in MALDI. *Chem Rev* **103**, 395–426.

- Dreisewerd K, Müthing J, Rohlfing A, Meisen I, Vukelić Ž, Peter-Katalinić J, Hillenkamp F & Berkenkamp S (2005). Analysis of Gangliosides Directly from Thin-Layer Chromatography Plates by Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Orthogonal Time-of-Flight Mass Spectrometry with a Glycerol Matrix. *Anal Chem* **77**, 4098–4107.
- Engedal N, Skotland T, Torgersen ML & Sandvig K (2011). Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microbial Biotechnology* **4**, 32–46.
- Fahrmeir L, Künstler R, Pigeot I & Tutz G (2007). *Statistik: Der Weg zur Datenanalyse*, 6. überarb. Aufl. Springer.
- Falguières T, Maak M, Von Weyhern C, Sarr M, Sastre X, Poupon M-F, Robine S, Johannes L & Janssen K-P (2008). Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Mol Cancer Ther* **7**, 2498–2508.
- Falguières T, Mallard F, Baron C, Hanau D, Lingwood C, Goud B, Salamero J & Johannes L (2001). Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* **12**, 2453–2468.
- Fantini J, Maresca M, Hammache D, Yahy N & Delézay O (2000). Glycosphingolipid (GSL) microdomains as attachment platforms for host pathogens and their toxins on intestinal epithelial cells: Activation of signal transduction pathways and perturbations of intestinal absorption and secretion. *Glycoconjugate Journal* **17**, 173–179.
- Farkas-Himsley H, Hill R, Rosen B, Arab S & Lingwood CA (1995). The bacterial colicin active against tumor cells in vitro and in vivo is verotoxin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 6996–7000.
- Fletcher JS, Vickerman JC & Winograd N (2011). Label free biochemical 2D and 3D imaging using secondary ion mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* **15**, 733–740.
- Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, An der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A & others (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine* **365**, 1771–1780.
- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD & James MNG (2004). Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **279**, 27511–27517.
- Fraser-Reid BO (2001). *Glycoscience chemistry and chemical biology I - III: with contributions by numerous experts*; Springer.

-
- Garred O, Van Deurs B & Sandvig K (1995). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* **270**, 10817–10821.
- Godaly G, Freund us B, Proudfoot A, Svensson M, Klemm P & Svanborg C (1998). Role of fimbriae-mediated adherence for neutrophil migration across *Escherichia coli*-infected epithelial cell layers. *Mol Microbiol* **30**, 725–735.
- Hakomori S (1990). Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* **265**, 18713–18716.
- Hakomori S (2000). Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconjugate journal* **17**, 143–151.
- Hidalgo M (2010). Pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine* **362**, 1605–1617.
- Hillenkamp F & Karas M (2007). The MALDI process and method. *MALDI MS1785*.
- Hoffmann P, Hülsewig M, Duvar S, Ziehr H, Mormann M, Peter-Katalini c J, Friedrich AW, Karch H & Müthing J (2010). On the structural diversity of Shiga toxin glycosphingolipid receptors in lymphoid and myeloid cells determined by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **24**, 2295–2304.
- Hotz B, Backer MV, Backer JM, Buhr HJ & Hotz HG (2010). Specific targeting of tumor endothelial cells by a shiga-like toxin-vascular endothelial growth factor fusion protein as a novel treatment strategy for pancreatic cancer. *Neoplasia (New York, NY)* **12**, 797.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J & Kern SE (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research* **6**, 2969–2972.
- Jacewicz MS, Mobassaleh M, Gross SK, Balasubramanian KA, Daniel PF, Raghavan S, McCluer RH & Keusch GT (1994). Pathogenesis of *Shigella* diarrhea: XVII. A mammalian cell membrane glycolipid, Gb3, is required but not sufficient to confer sensitivity to Shiga toxin. *J Infect Dis* **169**, 538–546.
- Janssen K-P, Vignjevic D, Boisgard R, Falguières T, Bousquet G, Decaudin D, Doll e F, Louvard D, Tavitian B, Robine S & Johannes L (2006). In vivo Tumor Targeting Using a Novel Intestinal Pathogen-Based Delivery Approach. *Cancer Res* **66**, 7230–7236.
- Johannes L & Römer W (2010). Shiga toxins — from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*; DOI: 10.1038/nrmicro2279.
- Johansson D, Johansson A, Grankvist K, Andersson U, Henriksson R, Bergström P, Br annstr om T & Behnam-Motlagh P (2006). Verotoxin-1 induction of apoptosis in Gb3-expressing human glioma cell lines. *Cancer Biol Ther* **5**, 1211–1217.

- Kannagi R, Stroup R, Cochran NA, Urdal DL, Young WW & Hakomori S (1983). Factors Affecting Expression of Glycolipid Tumor Antigens: Influence of Ceramide Composition and Coexisting Glycolipid on the Antigenicity of Gangliosylceramide in Murine Lymphoma Cells. *Cancer Res* **43**, 4997–5005.
- Karch H, Tarr PI & Bielaszewska M (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* **295**, 405–418.
- Karlsson KA (1989). Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem* **58**, 309–350.
- Karmali MA (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **2**, 15–38.
- Kelsen DP, Portenoy R, Thaler H, Tao Y & Brennan M (1997). Pain as a predictor of outcome in patients with operable pancreatic carcinoma. *Surgery* **122**, 53–59.
- Kiarash A, Boyd B & Lingwood CA (1994). Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem* **269**, 11138–11146.
- Konowalchuk J, Speirs JI & Stavric S (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **18**, 775–779.
- Kovbasnjuk O, Mourtazina R, Baibakov B, Wang T, Elowsky C, Choti MA, Kane A & Donowitz M (2005). The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 19087–19092.
- Kurmanova A, Llorente A, Polesskaya A, Garred O, Olsnes S, Kozlov J & Sandvig K (2007). Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 144–149.
- Lea N, Lord JM & Roberts LM (1999). Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology (Reading, Engl)* **145** (Pt 5), 999–1004.
- Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL & Read RJ (1998). Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry* **37**, 1777–1788.
- Loboda AV, Ackloo S & Chernushevich IV (2003). A high-performance matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometer with collisional cooling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 2508–2516.

- Lochnit G, Geyer R, Heinz E, Rietschel ET, Zähringer U & Müthing J (2001). Chemical Biology and Biomedicine: Glycolipids and Glycosphingolipids. In *Glycoscience - Chemistry and Chemical Biology I-III*, ed. Fraser-Reid BO, Tatsuta & Thiem J. Springer, Heidelberg.
- Lottspeich F, Engels JW & Lay SZ (2006). *Bioanalytik*, 2. Aufl. 2006. Nachdruck. Spektrum Akademischer Verlag.
- Lundquist JJ & Toone EJ (2002). The cluster glycoside effect. *Chem Rev* **102**, 555–578.
- Maak M, Nitsche U, Keller L, Wolf P, Sarr M, Thiebaud M, Rosenberg R, Langer R, Kleeff J, Friess H, Johannes L & Janssen K-P (2011). Tumor-Specific Targeting of Pancreatic Cancer with Shiga Toxin B-Subunit. *Molecular Cancer Therapeutics* **10**, 1918–1928.
- Mahfoud R, Manis A, Binnington B, Ackerley C & Lingwood CA (2010). A Major Fraction of Glycosphingolipids in Model and Cellular Cholesterol-containing Membranes Is Undetectable by Their Binding Proteins. *J Biol Chem* **285**, 36049–36059.
- Mees ST, Mardin WA, Sielker S, Willscher E, Senninger N, Schleicher C, Colombo-Benkmann M & Haier J (2009). Involvement of CD40 targeting miR-224 and miR-486 on the progression of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* **16**, 2339–2350.
- Mees ST, Schleicher C, Mardin WA, Senninger N, Colombo-Benkmann M & Haier J (2011). Analyzing miRNAs in ductal adenocarcinomas of the pancreas. *J Surg Res* **169**, 241–246.
- Meisen I, Friedrich AW, Karch H, Witting U, Peter-Katalinić J & Müthing J (2005). Application of combined high-performance thin-layer chromatography immunostaining and nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry to the structural characterization of high- and low-affinity binding ligands of Shiga toxin 1. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 3659–3665.
- Meisen I, Mormann M & Müthing J (2011). Thin-layer chromatography, overlay technique and mass spectrometry: A versatile triad advancing glycosphingolipidomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1811**, 875–896.
- Meisen I, Peter-Katalinić J & Müthing J (2004). Direct analysis of silica gel extracts from immunostained glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **76**, 2248–2255.
- Miller-Podraza H, Johansson L, Johansson P, Larsson T, Matrosovich M & Karlsson KA (2000). A strain of human influenza A virus binds to extended but not short gangliosides as assayed by thin-layer chromatography overlay. *Glycobiology* **10**, 975–982.

-
- Müthing J, Duvar S, Heitmann D, Hanisch F-G, Neumann U, Lochnit G, Geyer R & Peter-Katalinic J (1999). Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated human umbilical vein endothelial cells. *Glycobiology* **9**, 459–468.
- Müthing J, Meisen I, Zhang W, Bielaszewska M, Mormann M, Bauerfeind R, Schmidt MA, Friedrich AW & Karch H (2012). Promiscuous Shiga toxin 2e and its intimate relationship to Forssman. *Glycobiology* **22**, 849–862.
- Müthing J, Schweppe CH, Karch H & Friedrich AW (2009). Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thrombosis and Haemostasis*; DOI: 10.1160/TH08-05-0317.
- Müthing J, Unland F, Heitmann D, Orlich M, Hanisch FG, Peter-Katalinić J, Knäuper V, Tschesche H, Kelm S & Schauer R (1993). Different binding capacities of influenza A and Sendai viruses to gangliosides from human granulocytes. *Glycoconj J* **10**, 120–126.
- Nathanson S, Kwon T, Elmaleh M, Charbit M, Launay EA, Harambat J, Brun M, Ranchin B, Bandin F, Cloarec S, Bourdat-Michel G, Piètrement C, Champion G, Ulinski T & Deschênes G (2010). Acute neurological involvement in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 1218–1228.
- O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW & Formal SB (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**, 694–696.
- O'Brien AO, Lively TA, Chen ME, Rothman SW & Formal SB (1983). *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* **1**, 702.
- Obrig TG (2010). *Escherichia coli* Shiga Toxin Mechanisms of Action in Renal Disease. *Toxins* **2**, 2769–2794.
- Pascher I (1976). Molecular arrangements in sphingolipids Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **455**, 433–451.
- Pellizzari A, Pang H & Lingwood CA (1992). Binding of verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry* **31**, 1363–1370.
- Plattner H & Hentschel J (2011). *Zellbiologie*, 4., neubearbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Poltorak A (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* **282**, 2085–2088.

- Raa H, Grimmer S, Schwudke D, Bergan J, Wälchli S, Skotland T, Shevchenko A & Sandvig K (2009). Glycosphingolipid Requirements for Endosome-to-Golgi Transport of Shiga Toxin. *Traffic* **10**, 868–882.
- Roberts JA, Marklund BI, Ilver D, Haslam D, Kaack MB, Baskin G, Louis M, Möllby R, Winberg J & Normark S (1994). The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 11889–11893.
- Roche N, Ilver D, Angström J, Barone S, Telford JL & Teneberg S (2007). Human gastric glycosphingolipids recognized by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA. *Microbes Infect* **9**, 605–614.
- Rohlfing A, Müthing J, Pohlentz G, Distler U, Peter-Katalinić J, Berkenkamp S & Dreisewerd K (2007). IR-MALDI-MS Analysis of HPTLC-Separated Phospholipid Mixtures Directly from the TLC Plate. *Analytical Chemistry* **79**, 5793–5808.
- Salhia B, Rutka JT, Lingwood C, Nutikka A & Van Furth WR (2002). The Treatment of Malignant Meningioma with Verotoxin. *Neoplasia* **4**, 304–311.
- Sandhoff K & Kolter T (2003). Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **358**, 847–861.
- Sandvig K & Van Deurs B (1994). Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. *FEBS Lett* **346**, 99–102.
- Sandvig K & Van Deurs B (1996). Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiological reviews* **76**, 949–966.
- Sandvig K, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH & Van Deurs B (1992). Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* **358**, 510–512.
- Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S & O'Brien AD (2012). Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *J Clin Microbiol* **50**, 2951–2963.
- Schmitz S (2009). *Der Experimentator: Zellkultur*, 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag.
- Schweppe CH, Bielaszewska M, Pohlentz G, Friedrich AW, Büntemeyer H, Alexander Schmidt M, Kim KS, Peter-Katalinić J, Karch H & Müthing J (2008). Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: relationship of heterogeneity in Gb3Cer/CD77 receptor expression with differential Shiga toxin 1 cytotoxicity. *Glycoconjugate Journal* **25**, 291–304.

-
- Siegel S & Castellan NJJ (1988). *Nonparametric Statistics for The Behavioral Sciences*, 2nd edn. McGraw-Hill Humanities/Social Sciences/Languages.
- Simons K & Sampaio JL (2011). Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a004697–a004697.
- Smith DC, Sillence DJ, Falguières T, Jarvis RM, Johannes L, Lord JM, Platt FM & Roberts LM (2006). The association of Shiga-like toxin with detergent-resistant membranes is modulated by glucosylceramide and is an essential requirement in the endoplasmic reticulum for a cytotoxic effect. *Mol Biol Cell* **17**, 1375–1387.
- Storck W, Meisen I, Gianmoena K, Pläger I, U. Kouzel I, Bielaszewska M, Haier J, Mormann M, Humpf H-U, Karch H & Müthing J (2012). Shiga toxin glycosphingolipid receptor expression and toxin susceptibility of human pancreatic ductal adenocarcinomas of differing origin and differentiation. *Biological Chemistry*; DOI: 10.1515/hsz-2012-0165.
- Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK & O'Brien AD (1986). Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* **53**, 135–140.
- Stroud MR, Stapleton AE & Levery SB (1998). The P histo-blood group-related glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside as a preferred binding receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: isolation and structural characterization from human kidney. *Biochemistry* **37**, 17420–17428.
- Suzuki Y (1994). Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains. *Prog Lipid Res* **33**, 429–457.
- Tesh VL (2010). Induction of apoptosis by Shiga toxins. *Future Microbiol* **5**, 431–453.
- Thompson MR, Steinberg MS, Gemski P, Formal SB & Doctor BP (1976). Inhibition of in vitro protein synthesis by *Shigella dysenteriae* 1 toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **71**, 783–788.
- Torgersen ML, Engedal N, Pedersen A-MG, Husebye H, Espevik T & Sandvig K (2011). Toll-like receptor 4 facilitates binding of Shiga toxin to colon carcinoma and primary umbilical vein endothelial cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **61**, 63–75.
- Vickerman JC (2011). Molecular imaging and depth profiling by mass spectrometry—SIMS, MALDI or DESI? *The Analyst* **136**, 2199.
- Viel T, Dransart E, Nemati F, Henry E, Thézé B, Decaudin D, Lewandowski D, Boisgard R, Johannes L & Tavitian B (2008). In vivo tumor targeting by the B-subunit of shiga toxin. *Mol Imaging* **7**, 239–247.

-
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH & Goggins M (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet* **378**, 607–620.
- Vogelstein B & Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* **10**, 789–799.
- Weissenborn K *et al.* (2012). Neurologic manifestations of E coli infection-induced hemolytic-uremic syndrome in adults. *Neurology* **79**, 1466–1473.
- Weitz B (1998). *Atlas der Anatomie. Organsysteme und Strukturen*. Bechtermünz.
- Wilfinger WW, Mackey K & Chomczynski P (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474–476, 478–481.
- Yoshino T, Watanabe K & Hakomori S (1982). Chemical synthesis of alpha-L-fucopyranosylceramide and its analogues and preparation of antibodies directed to this glycolipid. *Biochemistry* **21**, 928–934.
- Yowler BC & Schengrund C-L (2004). Glycosphingolipids-sweets for botulinum neurotoxin. *Glycoconj J* **21**, 287–293.

8. ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Stx-Untereinheit (<i>active</i>)
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Arg	Arginin
B	Stx-Untereinheit (<i>binding</i>)
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- <i>p</i> -toluidinsalz
BRCA2	<i>breast cancer, type 2</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD ₅₀	<i>cytotoxicity dose 50</i>
Cer	Ceramid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
CL	Cardiolipin
CMF-PBS	<i>calcium- and magnesium- free phosphate buffered saline</i>
Cys	Cystein
Da	Dalton
DPC4	<i>deleted in pancreatic carcinoma, locus 4</i>
DEAE-Sepharose	Diethylaminoethyl-Sepharose
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DRMs	<i>detergent-resistant membranes</i>

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Er:YAG	Erbium:Yttrium-Aluminium-Granat
ESI	Elektrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. für „und andere“)
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
Fuc	Fukose
Fuc-GM1	FucII ³ Neu5AcGg4Cer
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-Galaktosamin
β1,3-GalNAcT	β1,3- <i>N</i> -Acetylgalaktosaminyltransferase
α1,4-GalT	α1,4-Galaktosyltransferase
Gb	Globoserie
Gb3Cer	Globotriaosylceramid
Gb4Cer	Globotetraosylceramid
GD2	II ³ (Neu5Ac) ₂ Gg3Cer
GD3	II ³ (Neu5Ac) ₂ Lc2Cer
GEM	<i>glycolipid-enriched membrane</i>
Glc	Glukose
Gg	Ganglioserie
Gg3Cer	Gangliotriaosylceramid
Gg4Cer	Gangliotetraosylceramid
GlcCer	Glukosylceramid
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-Glukosamin
GM2	II ³ Neu5AcGg3Cer
GMVECs	<i>glomerular microvascular endothelial cells</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol

GSL	Glykosphingolipid
H	Wasserstoff
HBMECs	<i>human brain microvascular endothelial cells</i>
HCl	Wasserstoffchlorid, Salzsäure
HPTLC	<i>high-performance thin layer chromatography</i>
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
H ₂ O _{deion}	deionisiertes Wasser
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
Ig	Immunglobulin
IR	Infrarot
IR-MALDI-o-TOF MS	<i>infrared-matrix-assisted laser desorption/ionization-orthogonal-time-of-flight mass spectrometry</i>
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
K-ras	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
LacCer/Lc2Cer	Laktosylceramid
Lc	Laktoserie
Lc3Cer	Laktotriaosylceramid
Lc4Cer	Laktotetraosylceramid
LPS	Lipopolysaccharid
m	Masse
M	Molekül (bei Ionisation)
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Monohexaosylceramid

MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
nanoESI-Q-TOF MS	<i>nanoelectrospray ionization-quadrupol-time-of-flight mass spectrometry</i>
n. b.	nicht bestimmt
n. d.	nicht detektiert
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetyl-Neuraminsäure
Neu5Gc	5- <i>N</i> -Glykoly-Neuraminsäure
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PanIN	<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PC	Phosphatidylcholin
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
P ₂ O ₅	Diphosphorpentoxid
PS	Phosphatidsäure
rE	relative Einheit
RIP	Ribosomen-inaktivierende Proteine
r _s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
<i>S. dysenteriae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>

SDR	Schraubdeckelröhrchen
SI	Sekundärionen Ionisierung
SIMS	<i>secondary ion mass spectrometry</i>
SM	Sphingomyelin
STEC	Shiga Toxin produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
Stx1	Shiga Toxin 1
Stx2	Shiga Toxin 2
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
TOF	<i>time of flight</i>
UE	Untereinheit
ü. N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
<i>z</i>	Ladung
Zn	Zink
ZnCl ₂	Zinkchlorid

8.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller/Referenz
Accutase™	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Antikörper Anti Gb3Cer, polyklonal aus der Maus	JM06/298-1
Antikörper Anti Gb4Cer, polyklonal aus der Maus	JM06/206
Antikörper Anti-Huhn, IgY, polyklonal aus dem Kaninchen, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, USA
Antikörper Anti-Maus, IgG, polyklonal aus der Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, USA
Antikörper Anti-Stx2, monoklonal, VT135/6-B9	Sifin, Berlin
Agarose	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe
Ameisensäure	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Borsäure	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- <i>p</i> -toluidinsalz)	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe
Bromphenolblauatriumsalz	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe
BSA (bovines Serumalbumin, Fraktion V)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Chloroform, destilliert	Merck KGaA, Darmstadt
CMF-PBS (calcium- und magnesiumfreier Phosphatpuffer)	BioWhittaker® Lonza, Verviers, Belgien
Cardiolipin (aus Rinderherz)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
DEAE-Sepharose CL-6B	GE Healthcare, München
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g/l Glucose ,ohne L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Chemikalie	Hersteller/Referenz
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA (Ethylendiamintriessigsäure)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, 70 %, vergällt	Apotheke, Universitätsklinikum Münster
Ethanol, 99,8 %. unvergällt	J.T. Baker, Philipsburg, USA
Ethidiumbromid	BioRad Laboratories, München
Formaldehyd, 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
FBS (fötales, bovines Serum) Gold	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
L-Glutamin	BioWhittaker [®] Lonza, Verviers, Belgien
Glycerin	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe
Grams Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt
<i>n</i> -Hexan	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol, 100 %	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
KCl (Kaliumchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Riedel-de Haën AG, Seelze
KOH (Kaliumhydroxid)	Merck KGaA, Darmstadt
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Mikropartikel auf Polystyrolbasis	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Molybdänpulver	Merck KGaA, Darmstadt
MoO ₃ (Molybdän(VI)oxid)	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
NaN ₃ (Natriumazid)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
NaCl (Natriumchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller/Referenz
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck KGaA, Darmstadt
Orcin (3,5-Dihydroxytoluol-Monohydrat)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Plexigum P 28 (Polyisobutylmethacrylat)	Röhm, Darmstadt
P ₂ O ₅ (Phosphorpentoxid)	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphatidsäure	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Phosphatidylcholin (aus Rinderherz)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylethanolamin (aus Rinderhirn)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Phosphatidylglycerol (aus Eigelb)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
HCl (Salzsäure)	Merck KGaA, Darmstadt
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)	Merck KGaA, Darmstadt
Sphingomyelin (aus Rinderhirn)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Tris-Base	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe
Triton X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Tween 21	Uniqema, Redcar, UK
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Zinkchlorid	Carl Roth GmbH & CO.KG, Karlsruhe

8.3 Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Autoklav Varioklav E500	H + P Labortechnik, München
Analysenwaage CPA225D	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator MCO-20 AIC	Sanyo Electric Co., Ltd., München
Chromatographiekammern	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Cycler T-Personal combi	Biometra, Göttingen
Densitometer CD60	Desaga, Heidelberg
E-BOX, Geldokumentationsgerät	PEQLAB, Erlangen
Einfrierkammer „Mr Frosty“	Nalgene, Rochester, USA
ELISA Reader Opsys MR	Dynex, Berlin
Er:YAG Laser Bioscope	BiOptics Laser Systems, Berlin
Geldokumentationsgerät ChemiDoc™ XRS	BioRad Laboratories, München
Hämozytometer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
Heizblock Dri-Block DB-3	Techne, Staffordshire, UK
HPTLC <i>Plate Heater</i>	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Kapillarenzieher	Hilgenberg, Malsfeld
Kryotank	Chart, Solingen
Kolbenhubpipette	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Jena
Linomat IV	CAMAG, Muttenz, Schweiz
Membranpumpe	VWR International, West Chester, USA
Mehrkanalpipette Transferpette®-8	Brand, Wertheim
o-TOF Massenspektrometer	MDS Sciex, Concord, Kanada
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pipettierhilfe <i>Pipetboy acu</i>	IBS Integra Bioscience, Zizers, Schweiz

Gerät	Hersteller, Ort
Quadrupol-Flugzeit Massenspektrometer	Micromass/Waters, Manchester, UK
Reinraumwerkbank Mars 1800	ScanLaf, Lyngø, Dänemark
Rotationsverdampfer Laborata 4001 efficient	Heidolph, Schwabach
TOF-SI Massenspektrometer	Physikalisches Institut, WWU Münster
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad 5510	Branson, Dietzenbach
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage MP-300	Chyo, Japan
Wasseraufbereitungssystem Synergy UV	Millipore Corporation, Billerica, USA
Wasserbad SWB 25	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Universal	Hettich, Bäch, Schweiz

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau und Struktur der GSL am Beispiel von Globotriaosylceramid (d18:1, C22:0).....	3
Abbildung 2: Biosynthese neutraler GSL der Globo-, Ganglio-, Lakto- und Neolakto-Serie sowie deren Bezeichnungen nach der IUPAC-IUB.....	4
Abbildung 3: Biosynthese von neutralen GSL der Globo-Serie und zugehörige Strukturen.....	5
Abbildung 4: Aufbau und Struktur von Shiga Toxinen (Stx).....	9
Abbildung 5: Anatomie des Pankreas.....	10
Abbildung 6: Aufbau eines Massenspektrometers mit MALDI-Ionenquelle und orthogonalem Flugzeit-Massenanalysator.....	14
Abbildung 7: Aufbau eines ESI-Q-TOF Massenspektrometers.....	16
Abbildung 8: Aufbau eines TOF-SI Massenspektrometers und Prinzip der Ionisierung.....	18
Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen von Pankreaskarzinomzelllinien bei 10-facher Vergrößerung.....	24
Abbildung 10: Darstellung des Overlay-Assays.....	44
Abbildung 11: Ablauf der direkten Kopplung von HPTLC, Immundetektion und IR-MALDI-o-TOF Massenspektrometrie.....	49
Abbildung 12: Ablauf der Kopplung von HPTLC, Immundetektion, Extraktion der immunpositiven Banden und nanoESI-Q-TOF Massenspektrometrie.....	51
Abbildung 13: Zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Zelllinien aus Primärtumoren des humanen Pankreaskarzinoms.....	56

Abbildung 14: Zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Zelllinien aus Lebermetastasen des humanen Pankreaskarzinoms.....	58
Abbildung 15: Zytotoxische Wirkung von Stx2 auf Zelllinien des humanen Pankreaskarzinoms aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen.	60
Abbildung 16: RT-PCR-Amplifikate der α 1,4-GalT und der β 1,3-GalNAcT aus Zelllinien der Primärtumoren, Lebermetastasen und Aszites- und Lymphknotenmetastasen.....	64
Abbildung 17: Orcinolfärbung von neutralen GSL aus Zelllinien der Primärtumoren, Lebermetastasen und Aszites- und Lymphknotenmetastasen.	68
Abbildung 18: Immundetektion der Stx-Rezeptoren in neutralen GSL-Fractionen der Pankreaskarzinomzelllinien aus Primärtumoren.....	72
Abbildung 19: Immundetektion der Stx-Rezeptoren in neutralen GSL-Fractionen der Pankreaskarzinomzelllinien aus Lebermetastasen.	74
Abbildung 20: Immundetektion der Stx-Rezeptoren in neutralen GSL-Fractionen der Pankreaskarzinomzelllinien aus Aszites- und Lymphknotenmetastasen.	76
Abbildung 21: Semiquantitative Bestimmung der Gb3Cer-Spezies in den Pankreaskarzinomzelllinien mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge.	78
Abbildung 22: Semiquantitative Bestimmung der Gb4Cer-Spezies in den Pankreaskarzinomzelllinien mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge.	80
Abbildung 23: IR-MALDI-o-TOF Massenspektren der Stx2- und Antikörper-detektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Primärtumor-Zelllinie Pa-Tu-8902.	88
Abbildung 24: IR-MALDI-o-TOF Massenspektren der Stx2- und Antikörper-detektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Lebermetastasen-Zelllinie S2-007.	90
Abbildung 25: IR-MALDI-o-TOF Massenspektren der Stx2- und Antikörper-detektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Lymphknotenmetastasen-Zelllinie Hs 766T.	92

Abbildung 26: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von immundetektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Primärtumor-Zelllinie Pa-Tu-8902 und Fragmentierungsschemata. 96

Abbildung 27: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von immundetektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Lebermetastasen-Zelllinie S2-007.....98

Abbildung 28: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von immundetektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies der Lymphknotenmetastasen-Zelllinie Hs 766T.....100

Abbildung 29: Nachweis von Phospholipiden im Gesamtlipidextrakt der Zelllinien Pa-Tu-8902, PANC-1 und Hs 766T.....101

Abbildung 30: *Ion imaging* der apikalen Seite der Plasmamembran von PANC-1-Zellen.....104

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

	Wiebke Storck
Geburtsdatum	29. Januar 1982
Geburtsort	Bielefeld
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Ausbildung

03/2009 – 12/12 **Promotionsstudium der Naturwissenschaften** als externe Arbeit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld am Institut für Hygiene der Universität Münster
Betreuer: Prof. Dr. Thomas Noll, Prof. Dr. Johannes Müthing

Titel der Dissertation: „*Untersuchungen zur Sensitivität von humanen Zellen mit unterschiedlichem Gehalt an Shiga Toxin-Rezeptoren gegenüber Shiga Toxin 2*“

10/2003 - 1/2009 **Studium der Molekularen Biotechnologie**
Universität Bielefeld
Abschluss: **Diplom Biotechnologin**
Betreuer: Prof. Dr. Johannes Müthing

Titel der Diplomarbeit: „*Charakterisierung von Glykosphingolipiden aus humanen Karzinomzelllinien des Pankreas*“

09/2001 – 07/2003 **Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin**
Carl-Severing Berufskolleg, Bielefeld

05/2001 **Allgemeine Hochschulreife**
Friedrich-von-Bodelschwingh Schule, Bielefeld

Sprachen

Englisch	fließend
Französisch	Grundkenntnisse

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig 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.

Ort, Datum

Unterschrift