

# **Tumorassoziierte Glykosphingolipide in Pankreas- und Kolonkarzinomen: potentielle Targetstrukturen für adjuvante Therapien**

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

genehmigte  
DISSERTATION

von  
Dipl.-Biotech. Ute Distler  
aus Neustadt an der Weinstrasse

**2009**

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Müthing  
2. PD Dr. G. Pohlentz  
3. Prof. Dr. T. Noll



*Meiner Familie*



## Vorbemerkungen

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine externe Doktorarbeit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld. Sie wurde in der Zeit vom 01. Januar 2006 bis zum 27. Februar 2009 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Müthing in der Abteilung Biomedizinische Analytik (Leitung: Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić) am Institut für Medizinische Physik und Biophysik sowie dem Institut für Hygiene (Leitung: Herr Prof. Dr. H. Karch) der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster angefertigt. Die Finanzierung der Arbeit erfolgte durch die „Deutsche Krebshilfe“ (Projekte: DKH 106742 und 108502) und das „Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung Münster“ (Projekt: Me02-23-08). Die Disputation fand am 01. Oktober 2009 statt.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich recht herzlich allen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich im Einzelnen bei folgenden Personen:

Ich danke Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić und Herrn Prof. Dr. H. Karch für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Institut für Medizinische Physik und Biophysik (IMPB) und im Institut für Hygiene der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (WWU) anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. J. Müthing (Institut für Hygiene der WWU Münster) gilt mein Dank für die intensive Betreuung, die vielfältige Unterstützung sowie für seine fachliche Beratung und Diskussionsbereitschaft, die für das Entstehen dieser Arbeit von wesentlicher Bedeutung gewesen sind. Auch für sein Engagement bei der Erstellung von Veröffentlichungen und die Bereitstellung der zur Durchführung der immunchemischen Analysen benötigten Arbeitsmaterialien möchte ich mich bedanken.

Ich danke Herrn Dr. med. A. Mellmann (Institut für Hygiene der WWU Münster) für die Teilfinanzierung meiner Arbeit aus seinem Projekt. Bei Herrn PD Dr. A. W. Friedrich und bei Frau PD Dr. M. Bielaszewska (beide Institut für Hygiene der WWU Münster) möchte ich mich für das zur Verfügung gestellte Shiga Toxin 1 bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. N. Senninger (Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster) und Herrn Prof. Dr. med. J. Haier (Leiter des Molekularbiologischen Labors) danke ich für die Möglichkeit, Teile dieser Arbeit im Molekularbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie durchführen zu können. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Haier für die Bereitstellung von Kolon- und Pankreaskarzinomgewebeproben sowie den jeweiligen Kontrollproben bedanken. Auch für die zur Verfügung gestellten Arbeitsmaterialien zur Durchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie und für die Durchsicht von Teilen dieser Arbeit bin ich ihm sehr verbunden.

---

Bei den Herren PD Dr. Christian Pilarsky, PD Dr. med. Robert Grützmann und Dr. med. Axel Denz (Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden) möchte ich mich für die bereitgestellten Pankreaskarzinom- und die jeweiligen Kontrollgewebeproben bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. A. Schmidt (Direktor des Instituts für Infektiologie der WWU Münster) gilt mein Dank für die Bereitstellung des Immunfluoreszenzmikroskops in seiner Arbeitsgruppe. Frau Lilo Greune bin ich für die Einweisung in die Immunfluoreszenzmikroskopie sehr dankbar.

Herrn PD Dr. G. Pohlentz danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn PD Dr. K. Dreisewerd (beide IMPB der WWU Münster) für die Einführung in die IR-MALDI-o-TOF-MS sowie seine Unterstützung bei Untersuchungen mit dem genannten massenspektrometrischen Verfahren.

Bei Herrn Prof. Dr. T. Noll (Technische Fakultät der Universität Bielefeld) möchte ich für die Übernahme des Drittgutachtens bedanken.

Allen Mitarbeitern des IMPB, des Instituts für Hygiene sowie des Molekularbiologischen Labors der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie danke ich für das exzellente Arbeitsklima und für die Unterstützung im Labor. Insbesondere möchte ich mich bei Marcel, Josefine, Henning, Jamal und Trollo für die Korrekturlesung von Teilen der vorliegenden Arbeit bedanken. Vor allen Dingen Henning und Marcel, mit denen ich gemeinsam begonnen habe, am IMPB zu arbeiten, danke ich für die vielen lustigen und netten Stunden und nicht zuletzt auch für ihre Hilfsbereitschaft zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt mein ganz besonderer Dank für ihre mentale Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Rückhalt.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt vorab publiziert beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht:

### **Erschienene Publikationen:**

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.*  
Anal Chem **79**:5793-5808.

Distler U, Hülsewig M, Souady J, Dreisewerd K, Haier J, Senninger N, Friedrich AW, Karch H, Hillenkamp F, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2008.  
*Matching IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry with the TLC overlay binding assay and its clinical application for tracing tumor-associated glycosphingolipids in hepatocellular and pancreatic cancer.*  
Anal Chem **80**:1835-1846.

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

Meisen I, Distler U, Müthing J, Berkenkamp S, Dreisewerd K, Mathys W, Karch H, Mormann M. 2009.  
*Direct coupling of HPTLC with UV-spectroscopy and IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry for the analysis of cyanobacterial toxins.*  
Anal Chem **81**:3858-3866.

Müthing J, Distler U. 2009.  
*Advances on the compositional analysis of glycosphingolipids combining thin-layer chromatography with mass spectrometry.*  
Mass Spectrom Rev:Epub ahead of print (DOI:10.1002/mas.20253).

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

### **Eingereichte Publikationen:**

Müsken A, Souady J, Dreisewerd K, Zhang W, Distler U, Miller-Podraza H, Karch H, Müthing J.  
*Application of TLC-IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry to structural analysis of bacteria-binding glycosphingolipids selected by affinity detection.*

**Nationale Tagungsbeiträge:**

Distler U, Pohlentz G, Dreisewerd K, Zamfir A, Berkenkamp S, Haier J, Senninger N, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2006.

*Identification and structural characterization of tumor-associated glycosphingolipids in human colon cancers by combined thin-layer chromatography immunostaining and mass spectrometry.*  
Poster, 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Mainz, Deutschland.

Distler U, Souady J, Hülsewig M, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2007.

*HPTLC immunodetection coupled with IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry for the high sensitivity structural detection and characterization of glycosphingolipids.*  
Poster, 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Bremen, Deutschland.

Rohlfing A, Müthing J, Pohlentz G, Distler U, Peter-Katalinić J, Berkenkamp S, Dreisewerd K. 2007.

*Highly accurate IR-MALDI-MS analysis of HPTLC-separated phospholipid mixtures directly from the plate.*  
Poster, 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Bremen, Deutschland.

Distler U, Pohlentz G, Dreisewerd K, Haier J, Senninger N, Peter-Katalinić J, Karch H, Müthing J. 2008.

*Shiga toxin receptors – potential targets in cancer therapy?*  
Int J Med Microbiol **298**:Suppl 45.  
Poster, 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden, Deutschland.

Dreisewerd K, Distler U, Soltwisch J, Yew JY, Souady J, Hülsewig M, Rohlfing A, Schweppe H, Norberg AL, Dybvik AI, Schute V, Steiner K, Draude F, Pirkl A, Ibáñez A, Pohlentz G, Mormann M, Kravitz EA, Peter-Katalinić J, Hillenkamp F, Müthing J, Berkenkamp S. 2009.

*Features of UV and IR-laser orthogonal time-of-flight mass spectrometry.*  
Vortrag, 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Konstanz, Deutschland.

**Internationale Tagungsbeiträge:**

Distler U, Pohlentz G, Dreisewerd K, Zamfir A, Berkenkamp S, Haier J, Senninger N, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2006.

*UV-MALDI-TOF-, nanoESI-QTOF- and IR-MALDI-o-TOF-mass spectrometry of tumor-associated glycosphingolipids Gb3Cer (CD77) and IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s) in human colon carcinoma.*  
Poster, 17<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference (IMSC), Prag, Tschechien.

Rohlfing A, Müthing J, Pohlentz G, Distler U, Peter-Katalinić J, Berkenkamp S, Dreisewerd K. 2006.

*Highly accurate IR-MALDI-MS analysis of phospho- and glycolipid mixtures directly from HPTLC plates.*  
Poster, 17<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference (IMSC), Prag, Tschechien.

Distler U, Souady J, Hülsewig M, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2007.  
*HPTLC immunodetection coupled with IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry for the high sensitivity structural detection and characterization of glycosphingolipids.*  
Poster und Kurzvortrag, 2<sup>nd</sup> Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, Dubrovnik, Kroatien.

Distler U, Pohlentz G, Dreisewerd K, Haier J, Senninger N, Peter-Katalinić J, Karch H, Müthing J. 2008.  
*Globotriaosylceramide (Gb3Cer) as potential candidate for targeted therapies in colorectal cancer.*  
Poster, 19<sup>th</sup> Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, the „Belgian Working Group for Glycosciences“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, Wageningen, Niederlande.

Souady J, Distler U, Hülsewig M, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2009.  
*Identification and characterization of tumor-associated gangliosides by HPTLC coupled to IR-MALDI-o-TOF MS.*  
Poster, Sanibel Conference on Mass Spectrometry - Lipidomics and Lipids in Mass Spectrometry. St. Petersburg, FL, USA.

**Inhaltsverzeichnis**

**VORBEMERKUNGEN ..... I**

**DANKSAGUNG.....II**

**INHALTSVERZEICHNIS.....VII**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....X**

**1 EINLEITUNG.....1**

1.1 PANKREASTUMOREN .....2

    1.1.1 *Klassifikation und stadienabhängige Prognose*.....3

    1.1.2 *Ätiologie*.....6

    1.1.3 *Diagnostik*.....7

    1.1.4 *Therapiemöglichkeiten*.....7

1.2 KOLONTUMOREN .....9

    1.2.1 *Klassifikation und stadienabhängige Prognose*..... 10

    1.2.2 *Ätiologie*..... 12

    1.2.3 *Diagnostik*..... 13

    1.2.4 *Therapiemöglichkeiten*..... 13

1.3 GLYKOSPHINGOLIPIDE (GSL) ..... 15

1.4 GSL UND MALIGNEN TRANSFORMATION ..... 21

1.5 LEKTINE UND TOXINE..... 22

    1.5.1 *Mistlektin I (ML-I)*..... 22

    1.5.2 *rViscumin* ..... 25

    1.5.3 *ML-I/rViscumin-Rezeptoren*..... 26

    1.5.4 *Shiga Toxin 1 (Stx1)*..... 27

    1.5.5 *Stx1-Rezeptoren* ..... 29

1.6 INFRAROT-MATRIX-UNTERSTÜTZTE-LASER-DESORPTIONS/IONISATIONS-  
ORTHOGONAL-FLUGZEIT-MASSENSPEKTROMETRIE (IR-MALDI-o-TOF-MS) ..... 30

1.7 ZIELSETZUNG ..... 34

**2 MATERIAL UND METHODEN ..... 36**

2.1 MATERIAL ..... 36

    2.1.1 *Chemikalien*..... 36

    2.1.2 *Tumor- und Kontrollproben*..... 36

        2.1.2.1 *Pankreas*..... 36

        2.1.2.2 *Kolon*..... 39

        2.1.2.3 *Leber* ..... 40

    2.1.3 *GSL-Referenzen*..... 41

2.1.4	<i>Antikörper</i> .....	43
2.1.5	<i>Toxine und Lektine</i> .....	44
2.2	<b>METHODEN</b> .....	45
2.2.1	<i>Reinigung der Glasgefäße</i> .....	45
2.2.2	<i>GSL-Extraktion aus humanen Geweben</i> .....	45
2.2.3	<i>Alkalische Hydrolyse</i> .....	46
2.2.4	<i>Dialyse</i> .....	46
2.2.5	<i>Dünnschichtchromatographie (DC)</i> .....	47
2.2.6	<i>Orcinfärbung</i> .....	48
2.2.7	<i>DC-Overlay-Assay</i> .....	49
2.2.7.1	Fixierung des Kieselgels durch Plexigum-Beschichtung.....	49
2.2.7.2	Overlay-Assay mit Antikörpern.....	49
2.2.7.3	Overlay-Assay mit Toxinen und Lektinen.....	52
2.2.7.4	Auswertung der Overlay-Assay Daten.....	54
2.2.8	<i>Immunfluoreszenzmikroskopie</i> .....	55
2.2.9	<i>IR-MALDI-o-TOF-MS</i> .....	57
2.2.10	<i>Statistische Auswertung</i> .....	59
2.2.10.1	Vorzeichentest.....	59
2.2.10.2	Mediantest.....	61
2.2.10.3	Rangkorrelation $\tau$ nach Kendall.....	62
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>66</b>
3.1	DC-IR-MALDI-O-TOF-MS.....	66
3.1.1	<i>Nachweis von immundetektierten GSL</i> .....	68
3.1.2	<i>Nachweis von Toxin- und Lektin-bindenden GSL</i> .....	76
3.1.3	<i>Nachweis von tumorassozierten GSL aus Geweberohextrakten</i> .....	80
3.2	TUMORASSOZIIERTE GSL IN PANKREAS- UND KOLON-TUMOREN.....	84
3.2.1	<i>CD75s-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen</i> .....	86
3.2.2	<i>iso-CD75s-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen</i> .....	92
3.2.3	<i>Gb3Cer/CD77-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen</i> .....	98
3.2.4	<i>Gb3Cer/CD77-Expressionsanalyse in humanen Kolonkarzinomen</i> .....	104
3.3	STATISTISCHE ANALYSE.....	110
3.3.1	<i>CD75s-1 und iso-CD75s-1-Gangliosidexpression in humanen Pankreaskarzinomgeweben</i> .....	110
3.3.2	<i>Gb3Cer/CD77-Expression in humanen Pankreas- und Kolonkarzinomgeweben</i> .....	113
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>115</b>
4.1	DC-IR-MALDI-O-TOF-MS.....	115
4.2	TUMORASSOZIIERTE GSL IN PANKREAS- UND KOLON-TUMOREN.....	118
4.2.1	<i>CD75s-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen</i> .....	119
4.2.2	<i>iso-CD75s-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen</i> .....	123
4.2.3	<i>Gb3Cer/CD77-Expressionsanalyse in humanen Pankreas- und Kolonkarzinomen</i> .....	124
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>128</b>

---

<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>130</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>152</b>
7.1	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	152
7.2	TUMOR- UND KONTROLLPROBEN .....	153
7.2.1	<i>Pankreas</i> .....	154
7.2.2	<i>Kolon</i> .....	155
7.2.3	<i>Leber</i> .....	155
7.3	GSL-REFERENZEN .....	156
7.4	ANTIKÖRPER.....	157
7.5	TNM-KLASSIFIKATION UND STAGING DER HEPATOZELLULÄREN KARZINOME (HCC).....	158
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>160</b>
	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>162</b>

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
A	<i>active</i> (Toxinuntereinheit)
$\alpha$	Standardabweichung
AK	Antikörper
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATTC	<i>American type culture collection</i>
B	<i>binding</i> (Toxinuntereinheit)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA2	<i>breast cancer, type 2</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CA	<i>carbohydrate antigen</i>
ca.	<i>circa</i>
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
Cer	Ceramid
CTB	Choleratoxin B-Untereinheit
Cys	Cystein
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dichlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>deleted in colon cancer</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPC4	<i>deleted in pancreatic carcinoma, locus 4</i>
DTAF	Dichlorotriazinylamino Fluoreszein
e	Elementarladung
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTM	Europäische Gruppe für Tumormarker
$E_{kin}$	kinetische Energie
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Er:YAG	Erbium:Yttrium-Aluminium-Granat
Er:YSSG	Erbium:Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet
ESI	<i>electrospray ionization</i> ; Elektrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et aliis</i>
f	Freiheitsgrad
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i>
FOBT	<i>fecal occult blood test</i>
FT	<i>Fourier transform</i> ; Fourier-Transformation

---

G	Grading
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
Gb	Globo
GD1a	IV <sup>3</sup> Neu5Ac,II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer
GD1b	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg4Cer
GD2	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg3Cer
GD3	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Lc2Cer
GEM	<i>GSL-enriched microdomain</i>
Gg	Ganglio
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GM1	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer
GM2	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg3Cer
GM3	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Lc2Cer
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GQ1b	IV <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> ,II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg4Cer
GSL	Glykosphingolipid(e)
GT1a	IV <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> ,II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer
GT1b	IV <sup>3</sup> Neu5Ac,II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg4Cer
H	Wasserstoff
H <sub>0</sub>	Nullhypothese
HA	Hämagglutinin
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HCl	Wasserstoffchlorid; Salzsäure
Her-2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGG	Humane Granulozyten-Ganglioside
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
HPTLC	<i>high-performance thin-layer chromatography</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Dihydrogensulfat; Schwefelsäure
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
ICR	<i>ion cyclotron resonance</i> ; Ionencyclotronresonanz
Ig	Immunglobulin
IR	infrarot
IUPAC-IUB	<i>Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry</i>
<i>k</i>	Prüfgröße
<i>K</i>	Kennwert (bei der Berechnung von Kendalls $\tau$ )
kDa	Kilodalton
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
<i>K-ras</i>	<i>Kirsten Rat Sarcoma</i>
KRK	kolorektales Karzinom
<i>L</i>	Länge
Lc	Lacto
LCA	<i>leukocyte common antigen</i>
LD	letale Dosis
LSI	<i>liquid secondary ion</i> ; Flüssigkeits-Sekundärionen
<i>m</i>	Masse
$\mu$	Erwartungswert

---

$\tilde{\mu}$	Median
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> ; Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Monohexosylceramid
ML-I	Mistellektin I
MLA	Mistellektin A-Untereinheit
MLB	Mistellektin B-Untereinheit
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
<i>n</i>	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
n. d.	nicht detektiert
Nd:YAG	Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NH	Amid-
nLc	Neolacto
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OH	Hydroxyl-
o-TOF	<i>orthogonal</i> -TOF
<i>P</i>	Wahrscheinlichkeit
P	P-Wert
p. A.	<i>pro analysi</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PECAM-1	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Diphosphopentoxid
ppm	<i>parts per million</i>
(p)TNM	(p: postoperativ); T: Tumor; N: Nodi (regionäre Lymphknoten); M: Metastasen
Q-TOF	<i>quadrupole</i> -TOF
R	Resektion
RCL	<i>Ricinus communis</i> -Lektin
rE	relative Einheit
RIP	Ribosomen-inaktivierendes Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> ; Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<i>S</i>	Svedberg; Summe (bei der Berechnung von Kendalls $\tau$ )
$\sigma$	Standardabweichung
$\sigma^2$	Varianz
SI	<i>secondary ion</i> ; Sekundärionen

---

SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid; Kieselgel
<i>src</i>	<i>sarcoma</i>
ST6Gal I	β-Galactosid α2,6-Sialyltransferase
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx(1)	Shiga Toxin (1)
<i>t</i>	Zeit
Tis	Carcinoma in situ
TOF	<i>time of flight</i> ; Flugzeit
Tyr	Tyrosin
<i>U</i>	Beschleunigungsspannung
Ü	Überstand
UICC	<i>Union Internationale contre le Cancer</i>
UpM	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i>
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewicht pro Volumen
<i>v</i>	Geschwindigkeit
v/v	<i>volume per volume</i> ; Volumen pro Volumen
v. Chr.	vor Christus
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VisalbCBA	<i>Viscum album</i> chitinbindendes Agglutinin
VAA-I	<i>Viscum album</i> Agglutinin I
X	kann nicht beurteilt werden
<i>X</i>	Zufallsvariable (Statistik)
<i>Y</i>	Zufallsvariable (Statistik)
Yes	<i>Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>z</i>	Ladung
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid
$\tilde{x}$	empirischer Median
$\chi^2$	Prüfgröße (Chi <sup>2</sup> )

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich SI-Einheiten verwendet.



# 1 EINLEITUNG

Unter dem Begriff Tumor versteht man die Neubildung (Neoplasie) von Körpergewebe, die gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) verlaufen kann. Benigne Tumoren zeichnen sich durch lokal begrenztes Wachstum ohne Infiltration in das angrenzende Gewebe aus. Im Gegensatz dazu ist die Fähigkeit von Zellen, in das benachbarte Gewebe einzudringen und in entfernten Organen Absiedlungen (Metastasen) auszubilden, ein eindeutiges Kriterium für Malignität [WEINBERG, 2007]. Krebs ist die Bezeichnung für maligne Tumore [PSCHYREMBEL, 2007] und ist mittlerweile nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen [OECD, *Organisation for Economic Co-operation and Development*, 2006]. Die Differenzierung eines Tumors richtet sich nach dem ursprünglichen Zelltyp. Karzinome, welche sich aus dem Epithel ableiten, sind am weitesten verbreitet. Sie sind verantwortlich für über 80% der Todesfälle, die auf Krebs zurückzuführen sind. Bei Sarkomen zum Beispiel handelt es sich um maligne Neoplasien des Binde- und Stützgewebes. Die Begriffe Leukämie und Lymphom bezeichnen Tumore hämatogenen Ursprungs [WEINBERG, 2007].

Im Jahr 2007 starben weltweit 7,9 Millionen Menschen an Krebs, was 13% aller Todesfälle entspricht. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO, *World Health Organization*) soll die Zahl der Todesfälle, welche auf Krebs zurückzuführen sind, auf bis zu 12 Millionen im Jahr 2030 steigen [WHO, 2008]. Allein in Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Krebs auf über 430.000 geschätzt [ROBERT KOCH-INSTITUT, 2008]. All diese Fakten verdeutlichen den dringenden Bedarf an neuen und effektiveren Therapiestrategien. Hierbei rücken Zelloberflächenstrukturen immer mehr in den Mittelpunkt der Tumorforschung. Insbesondere die Glykostrukturen auf Proteinen und Lipiden sind von besonderem Interesse, da es sich bei ihnen oftmals um Targetstrukturen von Antikörpern und zytotoxischen Lektinen sowie auch anderen Toxinen handelt. Gegenüber gesunden Zellen ist das Glykoexpressionsmuster in Tumorzellen sehr häufig verändert. Somit könnte man sich im Rahmen einer adjuvanten Therapie eine Überexpression zu Nutze machen und in selbigem Fall zytotoxische Substanzen einsetzen, welche bevorzugt die Tumorzellen angreifen. Da jedoch nicht alle Patienten, die an einem bestimmten Tumortyp erkrankt sind, das gleiche Expressionsmuster zeigen, tritt die Individualtherapie immer mehr in den Vordergrund. In der vorliegenden Arbeit soll die Expression von Glykosphingolipiden, die von potentiell therapeutischen Interesse sind, in Tumoren des Gastrointestinaltraktes analysiert werden.

## 1.1 PANKREASTUMOREN

Das Pankreas (Bauchspeicheldrüse) stellt nach der Leber die zweitgrößte Drüse des Verdauungssystems dar. Es handelt sich um ein 12-20 cm langes, 3-5 cm breites und 1-3 cm dickes Organ, welches im Retroperitonealraum (hinter dem Bauchfell/Peritoneum) des oberen Abdomens lokalisiert ist und sowohl als exokrine als auch endokrine Drüse fungiert [POUR *et al.*, 1994]. Das exokrine Pankreas ist eine rein seröse Drüse, die pro Tag mehr als einen Liter Verdauungssaft produziert. Es besteht aus so genannten Azinuszellen, welche über 90% des Pankreasvolumens ausmachen. Sie sind verantwortlich für die Produktion von alkalischem Sekret und Verdauungsenzymen, wie zum Beispiel Lipase, Amylase, Chymotrypsin und Elastase, welche über das Pankreasgangsystem (Ductus pancreaticus) in das Duodenum (Zwölffingerdarm) abgegeben werden (exokrine Funktion). Die endokrine Funktion des Pankreas besteht im Wesentlichen in der Regulation der Glucose-Homöostase durch die Hormone Insulin, Glucagon und Somatostatin, welche in den Langerhans-Inseln gebildet und direkt in das Blut überführt werden [POUR *et al.*, 1994; LEHNERT UND WERDAN, 2006].

Die Neoplasien des Pankreas umfassen Tumoren mit duktalem, azinärem, endokrinem und nicht zuzuordnendem Phänotyp abhängig von ihrer Herkunft aus dem exokrinen oder endokrinen Pankreas. Endokrine Tumoren treten sehr selten auf. Bei lediglich 3% aller Pankreasneoplasien handelt es sich um endokrine Tumoren. Sie kommen gleichermaßen häufig bei Männern und Frauen bevorzugt im Alter zwischen dem 3.-6. Lebensjahrzehnt vor. Endokrine Pankreastumoren sind meist hochdifferenzierte Neoplasien, welche sich entweder benigne verhalten oder als langsam wachsende und metastasierende Karzinome in Erscheinung treten. Zu ihnen zählen zum Beispiel das Insulinom, das Gastrinom, das VIPom (Überproduktion des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP)) sowie das Glucagonom [COLOMBO-BENKMANN UND SENNINGER, 2005; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007]. Bei 85% aller Pankreasneoplasien handelt es sich um duktales Adenokarzinome des exokrinen Pankreas, welche vom Pankreasgangsystem ausgehen. Weitere Tumore des exokrinen Pankreas sind zum Beispiel das Azinuszellkarzinom, das sich vom azinären Drüsenepithel ableitet, sowie seröse und muzinöse Zystadenokarzinome [NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007].

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorproben handelt es sich ausschließlich um duktales Adenokarzinome des exokrinen Pankreas. Sie treten vorwiegend im Erwachsenenalter zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr auf. Patienten unter 40 Jahren erkranken nur selten an diesem Karziom [COLOMBO-BENKMANN UND SENNINGER, 2005]. In

Deutschland lag die Inzidenzrate im Jahr 2004 bei 15,7 pro 100.000 Einwohner [ROBERT KOCH-INSTITUT, 2008]. Die Geschlechtsrelation (männlich/weiblich) beträgt in westlichen Ländern 1,6:1 und in Entwicklungsländern 1,1:1 [NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007]. Das Pankreaskarzinom stellt die fünfthäufigste Todesursache bei Malignomen in der westlichen Welt dar. Die mediane Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt ungefähr 6 Monate. Weniger als 5% der Patienten überleben die ersten fünf Jahre. Somit ist das Pankreaskarzinom unter den soliden Tumorentitäten die mit der schlechtesten Prognose [LEHNERT UND WERDAN, 2006; JEMAL *et al.*, 2008]. Die Hauptursache hierfür liegt in der Ineffektivität der Diagnose- und Therapieansätze sowie der Aggressivität der Erkrankung, welche sich durch ein ausgeprägtes lokal invasives Wachstum sowie eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierungsfähigkeit auszeichnet [GHANEH *et al.*, 2007].

### 1.1.1 Klassifikation und stadienabhängige Prognose

Für die Wahl einer differenzierten sowie individualisierten Therapie, welche der speziellen Situation des Patienten und seines Tumors angepasst ist, ist eine exakte standardisierte Klassifikation maligner Tumore unerlässlich. Wichtig ist hierbei, dass die Klassifikation eine verlässliche Auskunft sowohl über die Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose und dessen biologisches Verhalten als auch über die voraussichtliche Prognose liefert. Seit 1943 gibt es mit dem so genannten TNM-System eine international einheitliche Beschreibung der anatomischen Ausbreitung von Tumoren vor der Therapie. Das TNM-System wird von der UICC (*Union Internationale contre le Cancer*) sowie von nationalen TNM-Komitees betreut und weiterentwickelt. Man unterscheidet zwischen einer klinischen (TNM) und einer pathologischen Klassifikation (pTNM). Hierbei beschreibt T die Ausdehnung des Primärtumors, N das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M das Auftreten von Fernmetastasen. In Tabelle 1-1 ist die (p)TNM-Klassifikation von Tumoren des exokrinen Pankreas beschrieben. Hierbei ist anzumerken, dass bei der Bestimmung von (p)N nach regionärer Lymphadenektomie mindestens 10 oder mehr regionäre Lymphknoten histologisch untersucht werden müssen, um bei negativem Befund einen Tumor (p)N0 klassifizieren zu können. Werden weniger als 10 regionäre Lymphknoten histologisch begutachtet, ist der pN-Kategorie in Klammern die Zahl befallener und untersuchter regionärer Lymphknoten obligat zuzusetzen, um somit die Verlässlichkeit der Klassifikation anzuzeigen, zum Beispiel pN0 (0/7) oder pN1 (1/5) [SOBIN AND WITTEKIND, 2002; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007].

**Tabelle 1-1: TNM/pTNM-Klassifikation der Tumoren des exokrinen Pankreas.<sup>1</sup>**

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
(p)TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
(p)T0	kein Anhalt für Primärtumor
(p)Tis	Carcinoma in situ (nichtinvasiv, intraepithelial)
(p)T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
(p)T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
(p)T3	Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior
(p)T4	Tumor infiltrierte Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior
<b>N</b>	<b>regionäre Lymphknoten</b>
(p)NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
(p)N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
(p)N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
(p)MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
(p)M0	keine Fernmetastasen
(p)M1	Fernmetastasen

<sup>1</sup> SOBIN AND WITTEKIND, 2002; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007.

Basierend auf der (p)TNM-Klassifikation lassen sich die Tumoren in verschiedene Stadien gruppieren. Die Stadiengruppierung ist in Tabelle 1-2 dargestellt. Liegen pathologische pTNM-Kategorien vor, so spricht man von definitiver sonst von klinischer Stadiengruppierung.

**Tabelle 1-2: Stadiengruppierung der Tumoren des exokrinen Pankreas.<sup>1</sup>**

	(p)M0		(p)M1
	(p)N0	(p)N1	
(p)Tis	Stadium 0	-	-
(p)T1	Stadium IA	Stadium IIB	Stadium IV
(p)T2	Stadium IB		
(p)T3	Stadium IIA		
(p)T4	Stadium IIB	Stadium III	

<sup>1</sup> SOBIN AND WITTEKIND, 2002; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007.

Neben der anatomischen Beurteilung eines Tumors spielt auch die histomorphologische Charakterisierung des malignen Gewebes eine wichtige Rolle. Hierbei liefert insbesondere der Grad der Zelldifferenzierung innerhalb des Tumorgewebes, welcher mittels pathologischer Untersuchung bestimmt und auch als Grading (G) bezeichnet wird, essentielle Informationen für Prognose und Therapie. Bei unterschiedlich differenzierten Arealen richtet sich die Einordnung des Tumors nach dem ungünstigsten Differenzierungsgrad. Die verschiedenen Gruppierungen des vierstufigen Gradings sind in Tabelle 1-3 aufgelistet [NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007].

**Tabelle 1-3: Grading maligner Tumoren.<sup>1</sup>**

Grad (G)	Differenzierung
1	gut differenziert
2	mäßiggradig differenziert
3	schlecht differenziert
4	undifferenziert

<sup>1</sup> JUNGINGER *et al.*, 2002; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007.

Zum Zeitpunkt der Diagnose gilt das TNM-Stadium als einer der besten prognostischen Indikatoren. Die stadienabhängige Prognose beim Pankreaskarzinom ist in Tabelle 1-4 dargestellt.

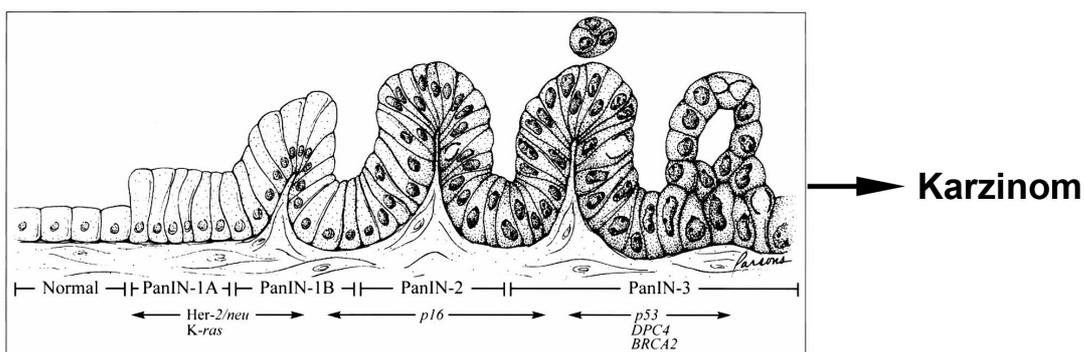
**Tabelle 1-4: Pankreaskarzinom – Stadienverteilung und Prognose.**

UICC-Stadium	Anteil der Patienten	natürlicher Verlauf	medianes Überleben unter Therapie
I	< 5%	?	11-18 Monate
II	10-30%	?	9-13 Monate
III	10-50%	63-122 Tage	4-6 Monate
IV	50-70%	63-122 Tage	4-6 Monate

<sup>1</sup> LEHNERT UND WERDAN, 2006.

## 1.1.2 Ätiologie

Verschiedene Risikofaktoren werden mit dem Auftreten eines Pankreaskarzinoms assoziiert. Während der Zusammenhang zwischen Alter, Übergewicht, Nikotinkonsum und Pankreaskarzinom als gesichert gilt [LÖHR *et al.*, 2003; LOWENFELS AND MAISONNEUVE, 2005; ADLER *et al.*, 2008], wird der Einfluss von Alkohol, Kaffee, fettreicher Ernährung sowie weiterer exogener Risikofaktoren eher kontrovers diskutiert [LÖHR *et al.*, 2003; LOWENFELS AND MAISONNEUVE, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006; ADLER *et al.*, 2008; HART *et al.*, 2008]. Auch bei Vorliegen einer langjährigen chronischen oder hereditären Pankreatitis (Entzündung der Bauchspeicheldrüse) besteht ein erhöhtes Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Patienten mit einem Diabetes mellitus (Typ 2) weisen sogar eine Verdopplung des Karzinomrisikos auf [LÖHR *et al.*, 2003; LOWENFELS AND MAISONNEUVE, 2005; ADLER *et al.*, 2008]. In den letzten Jahren lieferte die Molekulargenetik in Anlehnung an das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Karzinome (vergleiche Einleitung, Abschnitt 1.2.2) wichtige Hinweise für die Pathogenese duktaler Pankreaskarzinome. Verschiedene zeitlich nacheinander auftretende Mutationen in Protoonkogenen beziehungsweise Tumorsuppressorgenen führen über so genannte PanIN (pankreatische intraepitheliale Neoplasien; *pancreatic intraepithelial neoplasia*)-Läsionen schlussendlich zum Karzinom (Abbildung 1-1) [HRUBAN *et al.*, 2000; LÖHR *et al.*, 2003; LOWENFELS AND MAISONNEUVE, 2005; GHANEH *et al.*, 2007].



**Abbildung 1-1: Progressionsmodell für Pankreaskarzinome.**

Aus gesundem, duktalem Epithelgewebe entwickelt sich über mehrere, histologisch charakterisierte Vorstufen (PanIN) ein invasives Karzinom. Verschiedene Genmutationen gehen mit der fortschreitenden Meta- und Dysplasie einher. Im frühen Stadium tritt eine Überexpression des Protoonkogens *Her-2/neu* (*human epidermal growth factor receptor 2*) sowie eine Punktmutation im *K-ras*-Onkogen auf. Wenig später kommt es zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p16*, gefolgt von dem Verlust der Tumorsuppressorgene *p53*, *DPC4* (*deleted in pancreatic carcinoma, locus 4*) und *BRCA2* (*breast cancer, type 2*) im späten Stadium [modifiziert nach HRUBAN *et al.*, 2000].

### 1.1.3 Diagnostik

Zurzeit fehlen sowohl verlässliche Tumormarker, welche eine Diagnose in einem frühen und somit heilbaren Stadium ermöglichen, als auch effektive Therapieansätze, die die Prognose der Patienten deutlich verbessern. CA 19-9 (*carbohydrate antigen 19-9*), auch als Sialyl Lewis A bezeichnet, gilt als etablierter Tumormarker, der Einsatz in der Praxis findet und sich bisher gegenüber anderen Markern, wie zum Beispiel CEA (*carcinoembryonic antigen*), CA 50 (*carbohydrate antigen 50*) und DU-PAN-2 durchgesetzt, hat [BOECK *et al.*, 2006; GHANEH *et al.*, 2007; KANNAGI, 2007; EUROPÄISCHE GRUPPE FÜR TUMORMARKER (EGTM), 2008]. Allerdings sind erhöhte CA19-9-Konzentrationen nicht spezifisch für Adenokarzinome des Pankreas, sondern treten auch bei anderen Malignomen des Gastrointestinaltraktes und Beschwerden, wie zum Beispiel Pankreatitis, Zirrhose, Gelbsucht etc., auf [DUFFY, 1998; GHANEH *et al.*, 2007; EGTM, 2008]. Obwohl sich CA19-9 somit nicht zur Primärdiagnostik eignet [LEHNERT UND WERDAN, 2006; ADLER *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2009], wird CA19-9 in der interdisziplinären Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie als präoperativ nützlich empfohlen, da man es zur Verlaufskontrolle nutzen kann [LÖHR *et al.*, 2003]. Auch bei fortgeschrittenem Tumorstadium dient der CA19-9-Spiegel als Indikator für das Ansprechen eines Patienten auf eine Therapie und somit für die voraussichtliche Prognose [BOECK *et al.*, 2006; GHANEH *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2009]. Zur Primärdiagnostik muss weiterhin auf bildgebende Verfahren zurückgegriffen werden [LEHNERT UND WERDAN, 2006; GHANEH *et al.*, 2007; ADLER *et al.*, 2008].

### 1.1.4 Therapiemöglichkeiten

Aufgrund der Aggressivität des Pankreaskarzinoms, der Ineffizienz der Diagnosemethoden und dem späten Auftreten von Symptomen befindet sich die Krankheit zum Zeitpunkt der Diagnose bei den meisten Patienten schon im fortgeschrittenen Stadium, so dass die chirurgische Resektion, bei welcher es sich um die einzig potentiell kurative Therapieoption handelt, für lediglich 10-20% der Patienten infrage kommt [ALEXANDER *et al.*, 1999; LEHNERT UND WERDAN, 2006; GHANEH *et al.*, 2007]. Hierbei ist bei Patienten im Stadium I nach operativer Entfernung des Tumors mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 25% zu rechnen [LEHNERT UND WERDAN, 2006]. Innerhalb der adjuvanten Therapieansätze in Form von Radio- und Chemotherapie werden die besten klinischen Ergebnisse derzeit durch Kombinationstherapien mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin erzielt, welches 5-

Fluorouracil (5-FU) Ende der 1990er Jahre als bevorzugtes Chemotherapeutikum ablöste [BURRIS *et al.*, 1997; NEOPTOLEMOS *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2004; PIPAS *et al.*, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006; GHANEH *et al.*, 2007; BOECK *et al.*, 2007; ADLER *et al.*, 2008; SULTANA *et al.*, 2008]. Allerdings führen auch diese Therapieansätze zu keiner signifikanten Verbesserung der Prognose für die Patienten. Ähnlich wie die anderen angewendeten Radio- und Chemotherapien stellen sie häufig nur einen palliativen Therapieansatz dar. Die Ineffektivität der Radio- und Chemotherapieprotokolle ist vor allen Dingen auf die hochgradige Resistenz des duktales Adenokarzinoms gegenüber dem Großteil der eingesetzten Therapeutika zurückzuführen [GHANEH *et al.*, 2007]. Ein weiteres Problem stellt die unzureichende Spezifität der konventionellen Radio- und Chemotherapeutika dar. Somit werden neben den malignen Zellen oftmals auch gesunde Zellen angegriffen. Zudem findet in vielen Fällen keine vollständige Eliminierung der Tumorzellen statt. Dies hat zur Folge, dass die residuellen Tumorzellen zur Bildung von Metastasen und Rezidiven führen können und somit für einen Krankheitsrückfall nach Standardtherapie verantwortlich sind. In den vergangenen Jahren wurden aus diesem Grund neue, alternative Therapiestrategien auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf so genannte (ziel)gerichtete Therapien (*targeted therapies*) gelegt, welche unter Einsatz von monoklonalen Antikörpern, Toxinen oder Inhibitoren spezifisch in Signaltransduktions- und Stoffwechselwege von Krebszellen eingreifen [LI *et al.*, 2004; MIMEAULT *et al.*, 2005; GHANEH *et al.*, 2007]. In klinischen Studien wurden zum Beispiel mit den monoklonalen Antikörpern Cetuximab und Bevacizumab (Avastin), die gegen die Zelloberflächenmoleküle EGFR (*epidermal growth factor receptor*) beziehungsweise VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet sind, erste Erfolge erzielt [MENDELSON *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2004; XIONG, 2004; XIONG *et al.*, 2004; MIMEAULT *et al.*, 2005; KINDLER *et al.*, 2005]. Sowohl EGFR als auch VEGF werden in Pankreaskarzinomen überexprimiert und eignen sich somit als molekulare Targets für Antikörper-basierte Therapien [KORC *et al.*, 1992; SEO *et al.*, 2000; GHANEH *et al.*, 2007].

## 1.2 KOLONTUMOREN

Der Dickdarm gliedert sich bei einer Länge von circa 110 cm in folgende vier Abschnitte: aufsteigender (ascendens), transversaler (transversum), absteigender (descendens) und sigmoidaler (sigmoideum) Kolon. Im Dickdarm findet vor allen Dingen die Resorption von Wasser, Elektrolyten sowie kurzkettigen Fettsäuren statt. Des Weiteren zersetzen Darmbakterien Ballaststoffe und versorgen den Organismus mit Vitamin K. Auf den Dickdarm folgt der ca. 15 cm lange Mastdarm (Rektum), welcher der Zwischenspeicherung des Kots, das heißt der unverdaulichen und unverträglichen Nahrungsreste, dient [BURDA, 2005].

Aufgrund embryologischer sowie biologischer Gemeinsamkeiten werden Kolon- und Rektumkarzinome in der Literatur oft gemeinsam behandelt. Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt weltweit bei Männern und Frauen die vierthäufigste Krebserkrankung dar. Allein im Jahr 2007 starben ungefähr 677.000 Menschen an einem Kolon- oder Rektumkarzinom [WHO, 2008]. Die Inzidenzrate ist hierbei in den Industrienationen, in welchen es sich bei dem KRK um die zweithäufigste Krebserkrankung handelt, weitaus höher als in den Entwicklungsländern [WEITZ *et al.*, 2005]. In Deutschland erkrankten jährlich über 37.000 Männer und ca. 36.000 Frauen an einem KRK. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 69 und bei Frauen bei 75 Jahren. Der Darmkrebs stellt hierzulande nach dem Lungenkrebs bei Männern und dem Brustdrüsenkrebs bei Frauen die zweithäufigste Ursache der krebsbedingten Todesfälle dar [ROBERT KOCH-INSTITUT, 2008]. Während bei dem KRK im frühen Stadium gute Aussichten auf eine Heilung bestehen, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten, welche zum Zeitpunkt der Diagnose Fernmetastasen aufweisen, lediglich 10% [JEMAL *et al.*, 2008].

Bei 80-85% aller Kolon- und 85-90% aller Rektumkarzinome handelt es sich um Adenokarzinome. Weitere Karzinome des Kolons und Rektums sind zum Beispiel das muzinöse Adenokarzinom, das hoch aggressive Siegelringzellkarzinom, das Plattenepithelkarzinom sowie Karzinome endokrinen Ursprungs [JUNGINGER *et al.*, 2002]. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Adenokarzinome des Kolons untersucht.

### 1.2.1 Klassifikation und stadienabhängige Prognose

Die TNM-Klassifikation sowie die Stadiengruppierung von Kolonkarzinomen nach der UICC sind in Tabelle 1-5 und Tabelle 1-6 dargestellt. Zur Beurteilung der Lymphknotenmetastasierung ((p)N) müssen mindestens 12 regionäre Lymphknoten histologisch untersucht werden, um bei negativem Befund einen Tumor als pN0 einzustufen. Werden weniger als 12 regionäre Lymphknoten untersucht, ist dem Befund die Zahl der untersuchten Lymphknoten in Klammern zuzusetzen, um die Verlässlichkeit der Klassifikation anzuzeigen, zum Beispiel pN0(0/2) oder pN1(1/9).

**Tabelle 1-5: TNM/pTNM-Klassifikation für kolorektale Karzinome.<sup>1</sup>**

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
(p)TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
(p)T0	kein Anhalt für Primärtumor
(p)T1	Tumor infiltriert Submukosa
(p)T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
(p)T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
(p)T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
<b>N</b>	<b>regionäre Lymphknoten</b>
(p)NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
(p)N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
(p)N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
(p)N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
(p)MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
(p)M0	keine Fernmetastasen
(p)M1	Fernmetastasen

<sup>1</sup> SOBIN AND WITTEKIND, 2002; JUNGINGER *et al.*, 2002.

**Tabelle 1-6: Stadiengruppierung von kolorektalen Tumoren.<sup>1</sup>**

	(p)M0			(p)M1
	(p)N0	(p)N1	(p)N2	
(p)T1	Stadium I	Stadium IIIA	Stadium IIIC	Stadium IV
(p)T2		Stadium IIIB		
(p)T3	Stadium IIA			
(p)T4	Stadium IIB			

<sup>1</sup> SOBIN AND WITTEKIND, 2002; JUNGINGER *et al.*, 2002.

Analog zur histologischen Charakterisierung der Pankreaskarzinome wird das vierstufige Grading nach den Vorgaben der UICC [JUNGINGER *et al.*, 2002] auch zur Beschreibung des Differenzierungsgrades von Kolonkarzinomen verwendet (vergleiche Tabelle 1-3). Ebenfalls gilt, dass bei dem Vorliegen verschiedener Differenzierungsgrade die Einordnung nach dem ungünstigsten Differenzierungsgrad, ohne Berücksichtigung quantitativer Verhältnisse, erfolgt.

Auch beim Kolonkarzinom ist das TNM-Stadium bei Diagnosestellung der beste prognostische Indikator. Die geschätzten 5-Jahres-Überlebensraten für die verschiedenen UICC-Stadien sind in Tabelle 1-7 aufgelistet.

**Tabelle 1-7: Stadienabhängige Prognose beim Kolonkarzinom.<sup>1</sup>**

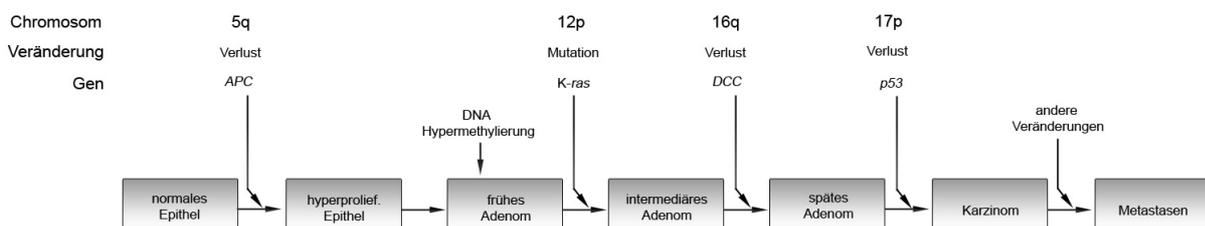
UICC-Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
I	T1: 97%; T2: 90%
IIA	78%
IIB	63%
IIIA/IIIB	66%
IIIC	37%
IV	4%

<sup>1</sup> LEHNERT UND WERDAN, 2006.

## 1.2.2 Ätiologie

Im Großteil der Fälle handelt es sich um sporadische KRK (88-94%), bei deren Entstehung sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Etwa 20% der Patienten besitzen eine familiäre Prädisposition an einem KRK zu erkranken, ohne hierbei die Kriterien für ein hereditäres KRK zu erfüllen [LYNCH AND DE LA CHAPELLE, 2003; WEITZ *et al.*, 2005]. Den wichtigsten Risikofaktor für das Entstehen eines KRK stellt das Auftreten beziehungsweise Vorhandensein von neoplastischen Darmpolypen dar, wobei das Risiko mit der Anzahl und der Größe der Adenome steigt. Die Pathogenese des sporadischen KRK ist durch eine histologisch und makroskopisch nachweisbare Progression (Adenom-Karzinom-Sequenz) charakterisiert, welche mit spezifischen molekularen Veränderungen (Multistep-Karzinogenese) einhergeht (Abbildung 1-2) [FEARON AND VOGELSTEIN, 1990; VOGELSTEIN AND KINZLER, 2004; GEIBLER UND GRAEVEN, 2005]. Als exogene Risikofaktoren für das Auftreten eines sporadischen KRK gelten Alter, fleisch- und fettreiche Ernährung, niedriger Konsum an Ballaststoffen, Übergewicht, mangelnde Bewegung, Rauchen, Alkoholabusus, entzündliche Darmerkrankungen sowie ein vorausgegangenes KRK [ALEXANDER *et al.*, 1999; WEITZ *et al.*, 2005; GEIBLER UND GRAEVEN, 2005].

Bei ca. 5-10% der Fälle handelt es sich um hereditäre KRK. Die beiden Hauptformen stellen das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis (HNPCC, *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP, *familial adenomatous polyposis*) dar [LYNCH AND DE LA CHAPELLE, 2003; WEITZ *et al.*, 2005].



**Abbildung 1-2: Progressionsmodell für KRK (Adenom-Karzinom-Sequenz) nach Fearon und Vogelstein [1990].**

Die Tumorgenese des KRK geht mit einer Akkumulation genetischer und chromosomaler Veränderungen einher. Der Übergang vom normalen zum hyperproliferativen Epithel ist gekennzeichnet durch einen Verlust der Heterozygotität des Tumorsuppressorgens *APC* (*adenomatous polyposis coli*) auf Chromosom 5q. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Hypermethylierung der DNA, gefolgt von einer Aktivierung des *K-ras*-Onkogens. Das Stadium eines späten Adenoms wird durch einen Verlust des Tumorsuppressorgens *DCC* (*deleted in colon cancer*) eingeleitet. Der Übergang zum malignen Karzinom ist gekennzeichnet durch einen Verlust des Tumorsuppressorgens *p53* [FEARON AND VOGELSTEIN, 1990; GEIBLER UND GRAEVEN, 2005].

### 1.2.3 Diagnostik

Die wichtigste diagnostische Modalität ist die totale Koloskopie (Endoskopische Dickdarmuntersuchung/Darmspiegelung), welche gleichzeitig die histologische Sicherung durch Entnahme einer Biopsie ermöglicht oder auch eine Polypektomie (Entfernung der Darmgeschwülste bei der Koloskopie mit einer Schlinge) gestattet. Sie stellt das Gold-Standard-Verfahren zur Detektion von KRK dar [ALEXANDER *et al.*, 1999; SCHULMANN *et al.*, 2002; GEIBLER UND GRAEVEN, 2005; WEITZ *et al.*, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006; SCHMIEGEL *et al.*, 2008].

Ähnlich wie beim Pankreaskarzinom haben aufgrund des Fehlens verlässlicher Tumormarker serologische Untersuchungen für die Primärdiagnostik keine Bedeutung [ALEXANDER *et al.*, 1999]. Als nützlichster und am besten untersuchter Marker für Karzinome des Kolons und Rektums gilt das CEA. Aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität eignet es sich jedoch weder für Screeningtests noch zur Diagnostik. Allerdings kommt das CEA als prognostischer Marker sowie bei der Verlaufsbeobachtung kurativ operierter Patienten zum Einsatz. Auch zur Überwachung der Therapie bei fortgeschrittener Krankheit dient das CEA als aussagekräftiger Marker [GOLDSTEIN AND MITCHELL, 2005; GEIBLER UND GRAEVEN, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006; DUFFY *et al.*, 2007; EGTM, 2008]. Die Europäische Gruppe für Tumormarker (EGTM, *European Group on Tumour Markers*) empfiehlt in ihren Richtlinien jedoch keine der weiteren, in der Literatur als Serummarker vorgeschlagenen Strukturen wie zum Beispiel CA 19-9 oder CA 242 zur Prognoseeinschätzung oder für den Einsatz in der Verlaufskontrolle [DUFFY *et al.*, 2007]. Als Screeningverfahren wird auch der fäkale Okkultbluttest (FOBT, *fecal occult blood test*) angewendet. Allerdings besteht beim Hämokkult-Test ebenfalls der Nachteil sowohl in der geringen Sensitivität als auch in der geringen Spezifität. So kann selbst bei negativem Hämokkult-Befund ein KRK nicht ausgeschlossen werden [SCHULMANN *et al.*, 2002; GEIBLER UND GRAEVEN, 2005; DUFFY *et al.*, 2007; SCHMIEGEL *et al.*, 2008].

### 1.2.4 Therapiemöglichkeiten

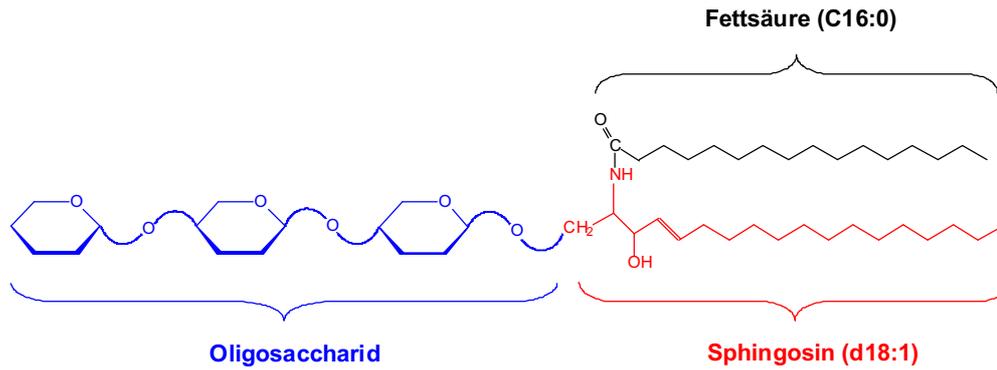
Die vollständige Resektion des KRK ist die unabdingbare Voraussetzung zur Heilung des Patienten [ALEXANDER *et al.*, 1999; WEITZ *et al.*, 2005; GEIBLER UND GRAEVEN, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006]. Im Frühstadium ist in vielen Fällen eine radikale onkologisch-chirurgische Therapie nicht nötig, so dass die Patienten endoskopisch und chirurgisch mittels

minimal invasiver Therapieverfahren behandelt werden können. Nach der Resektion des Tumors gelten sie zu 95% als geheilt und bedürfen keiner spezifischen Nachsorge außer einer Kontrollkoloskopie 3 bis 6 Monate nach der Operation [GEIBLER UND GRAEVEN, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006]. Allerdings werden aufgrund unzuverlässlicher Screeningverfahren und dem späten Auftreten von Symptomen etwa 95% aller KRK erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und bedürfen der radikalen chirurgischen Therapie [GEIBLER UND GRAEVEN, 2005]. Hierbei gelten die Stadien II und III als kurativ angebar. Für Patienten mit metastasierendem KRK (Stadium IV), welche meist nicht mehr kurativ resektabel sind, kommen in der Regel lediglich palliative Therapieansätze in Frage [ALEXANDER *et al.*, 1999; WEITZ *et al.*, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006]. Selbst nach einer R0-Resektion (vollständige Entfernung des Tumors) eines KRK treten bei bis zu zwei Dritteln der Patienten lokale, regionäre oder weiter entfernte Metastasen auf [GEIBLER UND GRAEVEN, 2005]. Aus diesem Grund wird die chirurgische Therapie zunehmend Teil eines multimodalen Therapiekonzepts, um residuelle Tumorzellen zu eliminieren und somit das Auftreten von Rezidiven sowie Metastasen zu verhindern beziehungsweise in einigen Fällen bereits bestehende Metastasen erfolgreich zu therapieren [GEIBLER UND GRAEVEN, 2005]. Solche interdisziplinären Ansätze umfassen neben der chirurgischen Resektion verschiedene, meist 5-FU- und Oxaliplatin- basierte, Chemo- sowie Radiotherapieprotokolle [GEIBLER UND GRAEVEN, 2005; WEITZ *et al.*, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006; MANO AND DUHOUX, 2008; WOLPIN AND MEYER, 2008; SCHMIEGEL *et al.*, 2008]. Wie bei den Pankreaskarzinomen rücken auch zur Behandlung des KRK (ziel)gerichtete Therapien immer mehr ins Zentrum des Interesses. So konnte vor allen Dingen im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit bei zusätzlicher Gabe der monoklonalen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab im Rahmen einer adjuvanten Chemotherapie eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens beobachtet werden [WEITZ *et al.*, 2005; LEHNERT UND WERDAN, 2006; DE GRAMONT *et al.*, 2006; BERNOLD AND SINICROPE, 2006; KLEIN AND GOTTFRIED, 2007].

### 1.3 GLYKOSPHINGOLIPIDE (GSL)

Johann Ludwig Wilhelm Thudichum (1829-1901), ein deutscher Mediziner, dessen Interesse für die Biochemie bei Arbeiten im Labor von Julius Liebig, dem führenden Chemiker seiner Zeit, geweckt wurde, kann als „Vater der Sphingolipidforschung“ angesehen werden. Thudichum war der erste Wissenschaftler, der bei seinen Arbeiten verschiedene Lipide wie Cerebrosid, Sphingosin, Sphingomyelin sowie Ceramid aus humanen Gehirnen isolierte und benannte [DEBUCH AND DAWSON, 1965; YAMAKAWA, 1996]. Seit ihrer Entdeckung vor über hundert Jahren, wurde eine Vielzahl an Glykosphingolipiden (GSL) charakterisiert und ihr qualitativer sowie quantitativer Anteil in verschiedenen Organen und Geweben von Vertebraten bestimmt [YU AND SAITO, 1989].

Bei den GSL handelt es sich um amphipathische Moleküle, die sich aus einem hydrophilen Oligosaccharidpart und einer hydrophoben Komponente, dem Ceramid, zusammensetzen [LOCHNIT *et al.*, 2001; MAGGIO *et al.*, 2006; HAKOMORI, 2008]. In den meisten Vertebraten bildet das langkettige, einfach ungesättigte Aminodiol Sphingosin (2-Amino-4-octadecen-1,3-diol), welches auch als 4-Sphingenin (d18:1) bezeichnet wird, das Rückgrat des Ceramids. Die Aminogruppe am C2-Atom des Sphingosins ist über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft, deren Länge und Sättigung variiert (Abbildung 1-3). Die substituierte Fettsäure besteht meist aus 14 (C14) bis 26 (C26) Kohlenstoffatomen. In humanen Geweben finden sich vorwiegend Ceramide mit C16- oder C24-Fettsäuren. Der Kohlenhydratteil ist glykosidisch an die primäre Hydroxylgruppe am C1-Atom des Sphingosins gebunden. Man unterscheidet zwischen ungeladenen, neutralen GSL und negativ geladenen Sulfatiden sowie Gangliosiden. Ganglioside besitzen mindestens eine Sialinsäure, entweder *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) oder eines ihrer Derivate, in ihrer Oligosaccharidkette.



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der GSL-Grundstruktur.**

GSL setzen sich aus einem hydrophilen Oligosaccharid- und einem lipophilen Ceramidpart zusammen. Das Ceramid besteht aus einem langkettigen Aminoalkohol, dem Sphingosin, welches amidartig mit einer Fettsäure verknüpft ist. Während die Länge der Fettsäure meist zwischen 16 bis 24 Kohlenstoffatomen variiert, stellt das Sphingosin innerhalb einer Spezies einen relativ konstanten Molekülpart dar.

Die Biosynthese der GSL beginnt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit dem Aufbau des Ceramids, dessen Glykosylierung im Anschluss schrittweise im Golgi-Apparat erfolgt [LLYOD AND FURUKAWA, 1998; SANDHOFF AND KOLTER, 2003; YU *et al.*, 2004; VAN ECHTEN-DECKERT AND GURAVI, 2008]. Aufgrund von Strukturunterschieden in der Oligosaccharidkette lassen sich die GSL im Wesentlichen in vier Familien einteilen: die Ganglio-, Globo-, Lacto- und Neolactoserie. Vertreter der vier Serien, welchen alle eine gemeinsame Vorläuferstruktur, das Lactosylceramid, zugrunde liegt, sind in Tabelle 1-8 dargestellt. Die Benennung erfolgt nach den Vorgaben der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur (IUPAC-IUB *Joint Commission on Biochemical Nomenclature*) [CHESTER, 1999]. Der Name enthält hierbei:

- 1) die Bezeichnung der Strukturfamilie, das heißt Globo (Gb), Ganglio (Gg), Lacto (Lc) oder Neolacto (nLc)
- 2) die Anzahl der Monosaccharideinheiten
- 3) sowie das Suffix „Ceramid“ (Cer)

Tabelle 1-8: Strukturen von neutralen GSL der Ganglio-, Globo-, Lacto- und Neolactoserie<sup>1</sup>.

Struktur	Trivialname	Symbol	Abkürzung
Glcβ1Cer	Glucosylceramid	GlcCer	-
Galβ4Glcβ1Cer	Lactosylceramid	Lc2Cer	-
<b>Ganglioserie</b>			
GalNAcβ4Galβ4Glcβ1Cer	Gangliotriaosylceramid	Gg3Cer	Gg3
Galβ3GalNAcβ4Galβ4Glcβ1Cer	Gangliotetraosylceramid	Gg4Cer	Gg4
GalNAcβ4Galβ3GalNAcβ4Galβ4Glcβ1Cer	Gangliopentaosylceramid	Gg5Cer	Gg5
<b>Globoserie</b>			
Galα4Galβ4Glcβ1Cer	Globotriaosylceramid	Gb3Cer	Gb3
GalNAcβ3Galα4Galβ4Glcβ1Cer	Globotetraosylceramid	Gb4Cer	Gb4
Galβ3GalNAcβ3Galα4Galβ4Glcβ1Cer	Globopentaosylceramid	Gb5Cer	Gb5
<b>Lactoserie</b>			
GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer	Lactotriaosylceramid	Lc3Cer	Lc3
Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer	Lactotetraosylceramid	Lc4Cer	Lc4
Galβ3GlcNAcβ3Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer	Lactohexaosylceramid	Lc6Cer	Lc6
Galβ3GlcNAcβ3Galβ3GlcNAcβ3Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer	Lactooctaosylceramid	Lc8Cer	Lc8
<b>Neolactoserie</b>			
Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer	Neolactotetraosylceramid	nLc4Cer	nLc4
Galβ4GlcNAcβ3Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1Cer	Neolactohexaosylceramid	nLc6Cer	nLc6

<sup>1</sup> Nomenklatur nach den Vorgaben der IUPAC-IUB [CHESTER, 1999].

Die Nomenklatur für neutrale GSL wird auch für Ganglioside angewandt. Hierbei werden analog zu den neutralen GSL der Name der GSL-Familie sowie die Anzahl der Zucker angegeben. Des Weiteren werden die Sialinsäure sowie deren Bindungsstelle in der Oligosaccharidkette benannt. Römische Ziffern geben hierbei innerhalb der Kohlenhydratkette die Position des Zuckers an, an den die Sialinsäure gebunden ist. Arabische Hochzahlen definieren im jeweiligen Zucker das C-Atom, mit welchem die Sialinsäure verknüpft ist. Die Benennung der Ganglioside der Ganglioserie erfolgt in der Literatur meist nach Svennerholm [SVENNERHOLM, 1963] (Tabelle 1-9).

Tabelle 1-9: Strukturen von GM3, GD3 sowie von Gangliosiden der Ganglio- und Neolactoserie.

Struktur <sup>1</sup>	Abkürzung <sup>2</sup>
II <sup>3</sup> Neu5Ac-Lc2Cer	GM3
II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Lc2Cer	GD3
<b>Ganglioserie</b>	
II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg3Cer	GM2
II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer	GM1
II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg3Cer	GD2
IV <sup>3</sup> Neu5Ac,II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer	GD1a
II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg4Cer	GD1b
IV <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> ,II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer	GT1a
IV <sup>3</sup> Neu5Ac,II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg4Cer	GT1b
IV <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> ,II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Gg4Cer	GQ1b
<b>Neolactoserie</b>	
IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer	IV <sup>3</sup> nLc4
IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer	IV <sup>6</sup> nLc4
VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer	VI <sup>3</sup> nLc6
VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer	VI <sup>6</sup> nLc6

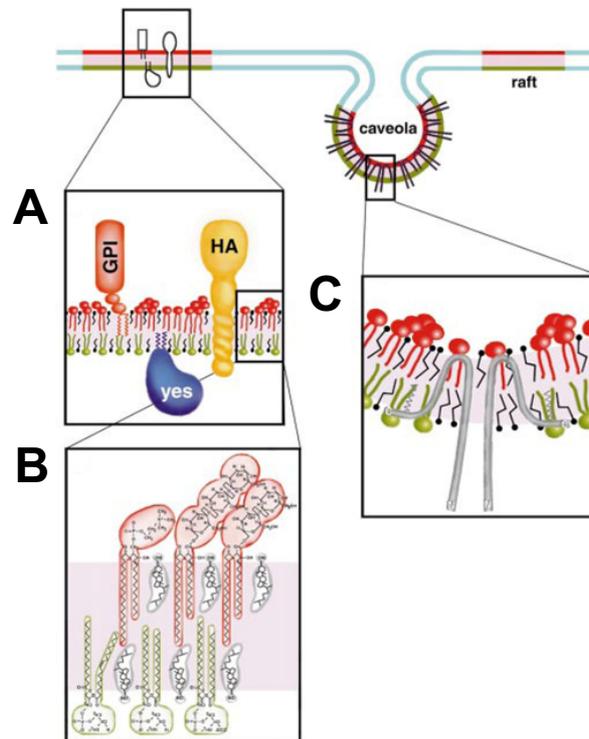
<sup>1</sup> Die Grundstrukturen der Ganglio- und Neolactoserie sind in Tabelle 1-8 dargestellt. Die Nomenklatur erfolgt nach den Vorgaben der IUPAC-IUB [CHESTER, 1999].

<sup>2</sup> Die Abkürzungen der Ganglioserien-Ganglioside erfolgen nach der Originalbezeichnung von Svennerholm [SVENNERHOLM, 1963].

GSL kommen bei Säugetierzellen ubiquitär in der exoplasmatischen Seite von Zellmembranen vor [LEDEEN *et al.*, 1982]. Ihr Lipidpart ist hierbei in der Plasmamembran verankert, während die Oligosaccharidkomponente in den Extrazellularraum ragt [SONNINO, 2006a,b]. GSL in Membranen von Zellorganellen oder Granula weisen auch auf einen intrazellulären GSL-Pool hin [HAKOMORI, 1990; GILLARD *et al.*, 1993].

GSL sind meist mit so genannten Lipid-Rafts (*raft*, engl. für Floß) assoziiert (Abbildung 1-4). Bei den Lipid-Rafts handelt es sich um Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen in Zellmembranen [SIMONS AND IKONEN, 1997]. Der Aufbau der Lipid-Doppelschicht in den Lipid-Rafts ist asymmetrisch: GSL, Sphingomyelin und Cholesterol reichern sich auf der exoplasmatischen Seite der Membran an („GSL-Cholesterol Rafts“), während auf der zytoplasmatischen Seite Glycerolipide und Cholesterol zu finden sind. In beiden Fällen füllt das Cholesterol die Lücken zwischen den Acylresten aus. Häufig sind funktionale Membranproteine, wie zum Beispiel Tyrosin-Kinasen der *src*-Familie, GPI

(Glycosylphosphatidylinositol)-verankerte Proteine, Caveoline etc., mit den *Rafts* assoziiert. Aufgrund der überwiegend gesättigten Fettsäurereste der Sphingolipide sind die Lipid-*Rafts* stärker geordnet und dichter gepackt als die Umgebung. Sie “schwimmen“ wie Flöße in der zweidimensionalen Flüssigkeit der Membranen [SIMONS AND IKONEN, 1997; LUNDQUIST AND TOONE, 2002].



**Abbildung 1-4: Organisation von *Rafts* und Caveolae in der Plasmamembran (Modell nach Simons und Ikonen [1997]).**

Die Lipid-*Rafts* (rot) sondern sich von anderen Regionen (blau) der Lipid-Doppelschicht, in welchen ungesättigtes Phosphatidylcholin auf der exoplasmatischen Seite die vorherrschende Spezies darstellt, ab. (A) Lipid-*Rafts* enthalten sowohl Proteine, welche sich über einen GPI-Anker auf der exoplasmatischen Seite an die *Rafts* anlagern, als auch Proteine, welche über einen Acylrest auf der zytosomatischen Seite an die Membran gebunden sind (hier: das zu den Src-Kinasen gehörige Protein Yes), oder Proteine, welche über Transmembranregionen mit den *Rafts* assoziiert sind, wie zum Beispiel das Hämagglutinin (HA) von Influenzaviren. (B) Die Lipid-Doppelschicht in den *Rafts* ist asymmetrisch aufgebaut, wobei sich GSL (rot) und Sphingomyelin (rot) auf der exoplasmatischen und Glycerolipide (zum Beispiel Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin) (grün) auf der zytosomatischen Seite anreichern. Cholesterin ist auf beiden Seiten zu finden und füllt den Raum unter den Kopfgruppen der Sphingolipide beziehungsweise zwischen den ineinandergreifenden Acylketten auf der zytosomatischen Seite aus. (C) *Raft*-assoziierte Caveoline bilden Membraneinstülpungen, so genannte Caveolae, aus, welche sowohl bei der Transzytose als auch bei Signaltransduktionsprozessen eine wichtige Rolle spielen [SIMONS AND IKONEN, 1997].

Die GSL-Clusterung in den „GSL-Cholesterin *Rafts*“ bewirkt, dass die Oligosaccharidketten der GSL eine starke Bindeaktivität gegenüber ihren Liganden aufweisen [LUNDQUIST AND TOONE, 2002]. Hakomori *et al.* [1998] führten den Begriff der „GSL-enriched microdomain“

(GEM) für GSL-Cluster in Zellmembranen, welche eine funktionale Rolle bei der Zellinteraktion und –adhäsion spielen [SORICE *et al.*, 2004], ein. Dabei wird angenommen, dass lediglich GSL-Cluster und nicht einzelne GSL als Antigene und Rezeptoren für Liganden fungieren. In der Literatur bezeichnen die Begriffe „*glycosignaling domain*“ und „*glycosynapse*“ (Glykosynapse) Membrandomänen, in welchen die GSL auf verschiedene Weise an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt sind [HAKOMORI, 2002a].

Als Zelloberflächenmoleküle spielen GSL eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Erkennungsprozessen sowie bei der Aktivierung oder Inhibierung von Membran-assoziierten Proteinen wie Rezeptoren, Signalvermittlern (Transducern) oder Transportern [HAKOMORI *et al.*, 1998]. Man unterscheidet hierbei im Wesentlichen zwischen der Interaktion von GSL mit komplementären Rezeptoren auf benachbarten Zellen („*trans recognition*“; *trans*-Erkennung) und der Regulierung der Proteinaktivität in der gleichen Membran („*cis regulation*“; *cis*-Regulierung) [HAKOMORI, 1990; SCHNAAR, 1991].

Die GSL-vermittelte Zellerkennung kann sowohl durch die Interaktion von GSL mit ihren Protein- beziehungsweise Lektin-Liganden [LOPEZ AND SCHNAAR, 2006] als auch durch GSL-GSL-Interaktionen erfolgen [HAKOMORI, 2004; TODESCHINI AND HAKOMORI, 2008]. GSL spielen zum Beispiel eine wichtige Rolle in der frühen Embryogenese, der Entwicklung des zentralen Nervensystems, bei der Zell-Zell-Interaktion zwischen Leukozyten und dem vaskulären Endothel sowie bei der transmembranen Signaltransduktion [FEIZI, 2000a,b; LOCHNIT *et al.*, 2001; SCHNAAR, 2004].

Nicht nur im gesunden Organismus sind GSL in Zell-Erkennungsprozesse involviert. Vielmehr spielen sie auch eine entscheidende Rolle bei Infektionsprozessen, da ihr Oligosaccharidteil aufgrund seiner Exposition in den Extrazellularraum sowohl Viren als auch Bakterien und bakteriellen Toxinen als Rezeptor dient [LOCHNIT *et al.* 2001]. Influenzaviren, zum Beispiel, exprimieren Hämagglutinine, welche terminal sialylierte Ganglioside, wie IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer oder IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer, binden. Über diese Protein-Gangliosid-Interaktion haften sich die Viren an ihre Wirtszellen [MÜTHING *et al.*, 1993; MILLER-PODRAZA *et al.*, 2000; HIDARI *et al.*, 2007]. Bei einem Großteil der bisher charakterisierten Bakterienrezeptoren auf Wirtszellen handelt es sich um GSL. Sie ermöglichen die spezifische Adhäsion von Bakterien an das Epithel des Wirtes, was eine wichtige Voraussetzung für den Kolonisations- sowie Infektionsprozess darstellt [KARLSSON, 1989]. So zählen P-Fimbrien, welche an GSL der Globoserie binden, zu den Virulenzfaktoren von uropathogenen *Escherichia coli*-Stämmen [ROBERTS *et al.*, 1994; STROUD *et al.*, 1998; GODALY *et al.*, 1998].

Auch das humanpathogene Bakterium *Helicobacter pylori*, das für eine Reihe von gastroduodenalen Erkrankungen, darunter Gastritis und das Ulkus (Magengeschwür), verantwortlich ist und das mit malignen Erkrankungen wie dem Magenkrebs oder dem MALT-Lymphom (MALT, *mucosa associated lymphoid tissue*) in Verbindung gebracht wird, nutzt GSL-Rezeptoren, um sich an die Epithelzellen des Magens zu haften und selbige zu kolonisieren. Es konnten verschiedene GSL-Rezeptoren identifiziert werden; entsprechend unterscheidet man zwischen Sialinsäure-abhängigen und Sialinsäure-unabhängigen *Helicobacter pylori*-Stämmen [MILLER-PODRAZA *et al.*, 2005; JOHANSSON *et al.*, 2005; ASPHOLM *et al.*, 2006]. Beispiele für bakterielle Toxine, die an GSL binden, sind das Cholera toxin [CHINNAPEN *et al.*, 2007], das Botulinumtoxin [YOWLER AND SCHENGRUND, 2004; FUJINAGA, 2006] und Shiga Toxine [LINGWOOD, 1996; MÜTHING *et al.*, 2009].

#### 1.4 GSL UND MALIGNEN TRANSFORMATION

Im Wesentlichen zeigen alle humanen sowie tierischen Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen auf ihrer Oberfläche ein anomales Glykoexpressionsmuster, welches auf eine Veränderung der Glykoprotein- und Glykolipidzusammensetzung in der Zellmembran zurückzuführen ist [FEIZI, 1985; HAKOMORI, 1996; HAKOMORI AND ZHANG, 1997; KANNAGI *et al.*, 2008]. Bei vielen tumorassoziierten Zelloberflächenantigenen (das heißt Zelloberflächenantigene, die eine erhöhte Expression im Tumor zeigen) handelt es sich um GSL. So lässt sich jeder Tumor durch die Akkumulation spezifischer GSL-Spezies charakterisieren [HAKOMORI, 1989]. Die abnorme Akkumulation von GSL in bestimmten Tumoren korreliert mit einer veränderten Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion [HAKOMORI, 1996]. Zum Beispiel verstärken die Ganglioside GM3 und GD3 die Integrin-abhängige Adhäsion, welche den Tumorzellen die Invasion in das Gewebe ermöglicht [CHERESH *et al.* 1987; ZHENG *et al.*, 1993]. Auch das Loslösen einzelner Zellen aus dem Tumorverband und die damit verbundene Einzelinvasion beziehungsweise Metastasierung scheint durch GSL, wie beispielsweise GM3 oder Lewis Y-Strukturen, begünstigt zu werden [HAKOMORI, 1996]. Durch ihre Assoziation mit Transducern in den Glykosynapsen der Zellmembran spielen tumorassoziierte GSL zudem eine Rolle bei transmembranen Signaltransduktionsprozessen, welche für das Tumorwachstum, die Tumordinvasion und die Metastasierung essentiell sind [HAKOMORI, 1992; HAKOMORI, 1996; HAKOMORI, 2002a]. Monosialo-Gb5Cer im Komplex mit CD9 erhöht sehr stark die motilen und invasiven Eigenschaften, wie dies an

Brustkrebszellen gezeigt werden konnte [HAKOMORI AND HANDA, 2002; STEELANT *et al.*, 2002]. Im Gegensatz dazu scheinen die Motilität und die invasiven Eigenschaften von Zellen inhibiert zu werden, sobald GM3 als Komplex mit CD9 oder CD82 vorliegt [ONO *et al.*, 1999; HAKOMORI, 2002b]. Kakugawa *et al.* [2002] fanden einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Menge an Lc2Cer und einer verminderten Apoptoserate, welche durch eine verstärkte Bcl-2- und einer verminderten Caspase-Expression hervorgerufen wird. Auch wenn die GSL auf dem Gebiet der Tumorforschung im Vergleich zu populären Themen wie Onkogene, Tumorsuppressorgene, Wachstumsfaktoren, Apoptose, etc. noch ein Schattendasein führen, wird deutlich, dass ihr Einfluss auf die Tumorgenese eine wichtige Rolle spielt und bislang unterschätzt worden ist. Es scheint jedoch ein Umdenken stattzufinden; weltweit ist in den letzten Jahren eine Zunahme an Forschungsgruppen, die sich mit der Analyse von GSL beschäftigen, zu verzeichnen.

## 1.5 LEKTINE UND TOXINE

Bei Lektinen handelt es sich um Proteine oder Glykoproteine, die Kohlenhydratstrukturen erkennen und an diese spezifisch und reversibel binden. Sie kommen bei fast allen Lebewesen vor, sowohl bei Pflanzen, Tieren und Menschen, als auch bei Viren und Bakterien. Unter den Lektinen findet sich eine große Gruppe mit toxischen Eigenschaften [FRANZ, 1990]. Der Begriff Toxin bezeichnet eine biogene Substanz, welche Organismen schädigt, indem sie in die physiologischen Stoffwechselabläufe eingreift. Toxine stellen eine Teilmenge der Gifte dar und können wie diese zu akuten oder chronischen Vergiftungen oder anderen Krankheitsbildern führen [SCHLEE UND KLEBER, 1991]. Ähnlich wie monoklonale Antikörper sind Toxine und Lektine in den letzten Jahren immer mehr ins Interesse der Tumorforschung gerückt, da sie aufgrund ihrer hohen Bindespezifität an zelluläre Rezeptoren potentielle Kandidaten für den Einsatz (ziel)gerichteter Therapien darstellen.

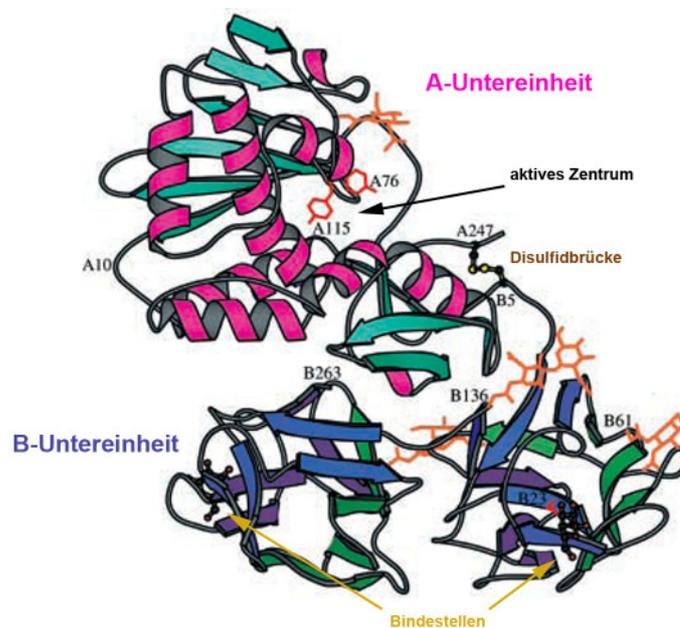
### 1.5.1 Mistellektin I (ML-I)

Bei Viscumin, welches auch als Mistellektin I (ML-I) oder *Viscum album* Agglutinin I (VAA-I) bezeichnet wird, handelt es sich um ein Lektin aus den Blättern und Stengeln der Weißen Mistel (*Viscum album* L.) [OLSNES *et al.*, 1982; BARBIERI *et al.*, 1993]. Seit jeher wird der in

Europa heimischen Weißen Mistel, die zur Familie der Mistelgewächse (*Viscaceae*; Ordnung der Sandelholzartigen (*Santalales*)) gehört, eine Zauber- sowie Heilwirkung nachgesagt [LUTHER, 1982; LUTHER UND BECKER, 1987]. So galt sie bereits in der antiken Mythologie als magisches Verbindungsglied zwischen der Welt der Götter und jener der Menschen [VERGIL UND NORDEN, 1976]. In keltisch-gallischen und germanischen Mythen und Sagen, wie der Edda, spielt die Mistel ebenfalls eine Rolle [YOUNG, 1965]. Auch als Heilpflanze findet die Mistel bereits seit dem Altertum gegen eine Vielzahl von Krankheiten Verwendung [OLSNES *et al.*, 1982]. Schon Hippokrates (460-377 v. Chr.) empfahl Extrakte aus der Mistel gegen die „Milzsucht“. Der Grundstein für den Einsatz von Präparaten aus der Mistel in der Krebstherapie wurde vor über achzig Jahren von Rudolph Steiner, dem Begründer der Anthroposophie, gelegt [KIENLE, 1999; STAUDER AND KREUSER, 2002]. Seither ist die Aufklärung der Inhaltsstoffe von Mistelpflanzen, insbesondere der Weißen Mistel, und deren zytotoxischen, tumorhemmenden sowie immunmodulatorischen Wirkungen ins Zentrum der Forschung gerückt. Bis dato konnten zahlreiche Inhaltsstoffe aus der Mistel isoliert, identifiziert und zum Teil pharmakologisch charakterisiert werden. Die Mistel enthält mehrere verschiedene Gruppen biologisch aktiver Substanzen, die nachweislich Wirkung auf Tumorzellen und/oder Immunzellen entfalten, wie die Mistellektine I bis III, VisalbcBA (*Viscum album* chitinbindendes Agglutinin), Viscotoxine, Oligo- und Polysaccharide und Flavinoide [LUTHER, 1982; BEUTH, 1997].

Franz *et al.* gelang es 1977 zum ersten Mal mittels Affinitätschromatographie an fixierten Plasmaproteinen ein Mistellektin mit agglutinierenden und zytotoxischen Eigenschaften zu isolieren [FRANZ *et al.*, 1977]. Wenige Jahre später konnten drei Lektine, die sich in ihrem Molekulargewicht, ihrem Glykosylierungsgrad und ihrer Bindespezifität unterscheiden, jedoch alle zur selben Proteinfamilie gehören, aus der europäischen Mistel isoliert werden [FRANZ *et al.*, 1981]. In allen drei Fällen handelt es sich um hoch toxische Substanzen mit hämagglutinierenden Eigenschaften. Sie werden als Mistellektin I, II, und III (ML-I, ML-II, ML-III) bezeichnet und gehören zu den Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (Typ II RIP), die sich aus einer enzymatisch aktiven A- (A, *active*) und einer zellbindenden B-Kette (B, *binding*) zusammensetzen. Hierbei ist die A-Kette über eine Disulfidbrücke kovalent mit der B-Untereinheit verbunden [STIRPE *et al.*, 1980; FRANZ, 1986; DIETRICH *et al.*, 1992; BARBIERI *et al.*, 1993; KRAUSPENHAAR *et al.*, 1999; NIWA *et al.*, 2003]. Mitte der 1990er Jahre wurde ein weiteres Mistellektin (VisAlbcBA) isoliert, das Homologie zu den chitinbindenden Pflanzenproteinen aufweist, sich jedoch von den Typ II RIP stark unterscheidet [PEUMANS *et al.*, 1996; STOEVA *et al.*, 2001].

Unter den verschiedenen Substanzen, welche in Extrakten aus der Mistel gefunden wurden, konnte Viscumin beziehungsweise ML-I als die Hauptkomponente der biologisch aktiven Bestandteile identifiziert werden [HAJTO *et al.*, 1989; BEUTH *et al.*, 1997; MENGS *et al.*, 2002]. Es stellt das bisher am besten charakterisierte Mistellektin dar. Im Gegensatz zu ML-II und ML-III, welche als Monomere vorliegen, tritt das ca. 60 kDa große Glykoprotein vor allen Dingen in hohen Konzentrationen als nicht-kovalentes Dimer (A-B)<sub>2</sub> (ca. 115 kDa) auf [FRANZ *et al.*, 1981; OLSNES *et al.*, 1982; LUTSCH *et al.*, 1984; NIWA *et al.*, 2003]. Die B-Untereinheit (MLB; 34 kDa) von ML-I, welche sich in zwei homologe  $\beta$ -Domänen faltet, besitzt sowohl eine C-terminale als auch eine N-terminale Zuckerbindestelle, über die das Lektin an seinen zellulären Rezeptor binden kann [SOLER *et al.*, 1998; KRAUSPENHAAR *et al.*, 1999; NIWA *et al.*, 2003] (siehe Abbildung 1-5). In vielen Studien wurde berichtet, dass es sich beim ML-I um ein *D*-Galactose-spezifisches Lektin handelt [FRANZ *et al.*, 1981; STIRPE *et al.*, 1982; KRAUSPENHAAR *et al.*, 1999; NIWA *et al.*, 2003]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass MLB bevorzugt an  $\alpha$ 2-6 sialylierte Gal $\beta$ 4GlcNAc-Zuckerstrukturen, welche sowohl auf Glykoproteinen als auch auf Gangliosiden der Neolactoserie zu finden sind, bindet [MÜTHING *et al.*, 2004].



**Abbildung 1-5: Ribbon-Darstellung von ML-I.**

Die enzymatisch aktive A-Untereinheit und die zellbindende B-Untereinheit sind über eine Disulfidbrücke (Cys 247A und Cys 5B) kovalent miteinander verknüpft. Die Zuckerstrukturen des Glykoproteins sind in braun dargestellt. Tyr 76A und Tyr 115A im aktiven Zentrum (A-Untereinheit) sind rot gekennzeichnet. Die B-Untereinheit besitzt sowohl N- als auch C-terminal eine Zuckerbindestelle, über die das Lektin an seinen zellulären Rezeptor bindet [modifiziert nach NIWA *et al.*, 2003].

Über Rezeptor-vermittelte Endozytose wird ML-I in die Zielzelle aufgenommen. Nach der Internalisierung wird das Lektin zum Golgi-Apparat transportiert, von wo aus es mittels retrograden Transports zum ER gelangt [MOISENOVICH *et al.*, 2002; SANDVIG AND DEURS, 2002a,b]. Im ER wird die Disulfidbrücke zwischen der A- und der B-Untereinheit reduktiv gespalten. Nach Dissoziation der beiden Untereinheiten erfolgt die Translokation der enzymatisch aktiven A-Kette (MLA; 29 kDa), die eine *N*-Glykosidase-Aktivität besitzt, ins Zytosol [AGAPOV *et al.*, 1999; SANDVIG AND DEURS, 2002a]. Dort katalysiert die A-Kette die spezifische Deadenylierung des ersten Adenins A<sub>4324</sub> der hoch konservierten GAGA-Tetraschleife eukaryontischer 28 S rRNA [ENDO *et al.*, 1988; BARBIERI *et al.*, 1993]. Dies hat zur Folge, dass der Elongationsfaktor 2 nicht mehr an die 60 S-Untereinheit der Ribosomen binden kann, was zur Hemmung des Verlängerungsschrittes der Proteinbiosynthese und zur Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) führt [STIRPE *et al.*, 1980; ENDO *et al.*, 1988; BARBIERI *et al.*, 1993; SOLER *et al.*, 1996; NARAYANAN *et al.*, 2005].

Aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung werden Mistelextrakte mit standardisiertem Lektin Gehalt, meist in einer Konzentration von 1 ng/kg Körpergewicht, bei der Therapie von Krebspatienten eingesetzt [BEUTH, 1997; MENGS *et al.*, 2002; STAUDER AND KREUSER, 2002]. Es konnte nachweislich ein Anstieg sowohl in der Zahl als auch in der Aktivität von T-Helferzellen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen sowie Granulozyten verzeichnet werden [HAJTO *et al.* 1989; BEUTH *et al.*, 1992; HAJTO *et al.*, 1997; STAUDER AND KREUSER, 2002; PRYME *et al.*, 2006]. Auch eine erhöhte Freisetzung an Zytokinen geht mit der Applikation von ML-I einher [HAJTO *et al.*, 1990; BOCCI, 1993; STEIN *et al.*, 1998; STAUDER AND KREUSER, 2002]. *In vitro* zeigte das ML-I in hohen Konzentrationen insbesondere gegenüber stark proliferierenden Zellen, wie Embryonal- und Tumorzellen einen zytotoxischen Effekt [JANSSEN *et al.*, 1993; BEUTH *et al.*, 1994; BANTEL *et al.*, 1999; VALENTINER *et al.*, 2002]. Der LD<sub>50</sub>-Wert für ML-I lag bei verschiedenen Tumorzelllinien im Bereich von 1-100 ng/mL [JANSSEN *et al.*, 1993].

### 1.5.2 rViscumin

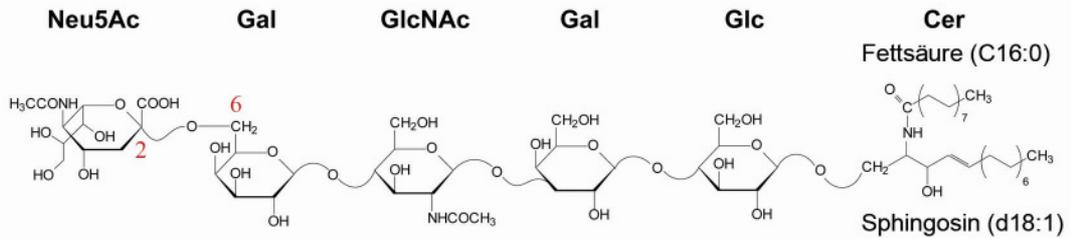
Das ML-I wurde bereits rekombinant hergestellt. Es handelt sich hierbei um ein ca. 55 kDa großes, nichtglykosyliertes Toxin, welches die gleichen biologischen Eigenschaften wie das native ML-I aufweist und auch als Aviscumin bezeichnet wird. Zur Herstellung des rekombinanten Toxins wurden die intronfreien Gensequenzen der einzelnen Ketten (MLA und MLB) jeweils in *Escherichia coli*-Zellen kloniert und in selbigen exprimiert [ECK *et al.*,

1999a,b]. Hierbei fallen die Produkte als unlösliche Proteine in Form von so genannten Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) an. Nach Aufreinigung und Renaturierung werden die A- (ca. 26 kDa) und die B-Kette (ca. 30 kDa) von rViscumin analog zum nativen ML-I über eine Disulfidbrücke reassoziert [ECK *et al.*, 1999a,b]. Das rekombinante Toxin zeigt die gleichen Bindungseigenschaften wie das native ML-I und erkennt somit spezifisch  $\alpha$ 2-6 sialylierte Galactosyl-Epitope (CD75s-Epitope) auf Gangliosiden [MÜTHING *et al.*, 2002].

rViscumin wurde bereits in klinischen Phase I-Studien an Tumorpatienten erfolgreich getestet [SCHÖFFSKI *et al.* 2004; SCHÖFFSKI *et al.* 2005; BERGMANN *et al.* 2008]. Auch in Tiermodellen von Harnblasen- und Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom) konnte ein Anti-Tumor-Effekt von rViscumin nachgewiesen werden [SCHUMACHER *et al.*, 2000; ELSÄSSER-BEILE *et al.*, 2001].

### 1.5.3 ML-I/rViscumin-Rezeptoren

Bei den (r)Viscumin- beziehungsweise ML-I-Rezeptoren handelt es sich um Ganglioside und Glykoproteine, an welche terminal ein Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 4GlcNAc-Rest (CD75s-Epitop) gebunden ist. Bei den GSL ist das CD75s-Epitop auf den Gangliosiden der Neolactoserie zu finden. Der (r)Viscumin/ML-I-Rezeptor IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s-1-Gangliosid) ist in Abbildung 1-6 dargestellt. Auch bei einer Verlängerung der nLc4Cer-Grundstruktur um eine Gal $\beta$ 4GlcNAc-Einheit, aus der das VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (CD75s-2-Gangliosid) hervorgeht, bleibt die Bindungsspezifität der beiden Toxine erhalten. Isomere  $\alpha$ 2-3-sialylierte Strukturen werden von (r)Viscumin sowie von ML-I nicht erkannt [MÜTHING *et al.*, 2002; MÜTHING *et al.*, 2004]. Im Jahre 2005 haben Müthing *et al.* gezeigt, dass  $\alpha$ 2-6-sialylierte Ganglioside, welche vorwiegend auf fötalen Geweben, Granulozyten sowie in geringen Mengen auch auf Monozyten/Makrophagen zu finden sind [NILSSON *et al.*, 1981; MACHER *et al.*, 1982; KIGUCHI *et al.*, 1990; MÜTHING *et al.*, 1993; YOHE *et al.*, 2001], von Tumoren des Gastrointestinaltraktes überexprimiert werden [MÜTHING *et al.*, 2005]. In der Studie wurden Leber-, Magen-, Pankreas- und Kolonkarzinomgewebeproben stichprobenartig auf ihre CD75s-Gangliosidexpression untersucht. Die stärkste Expression an CD75s-Gangliosiden zeigte das Pankreaskarzinomgewebe [MÜTHING *et al.*, 2005].



**Abbildung 1-6: Struktur des (r)Viscumin/ML-I-Rezeptors  $IV^6$ Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)/CD75s-1-Gangliosid.**

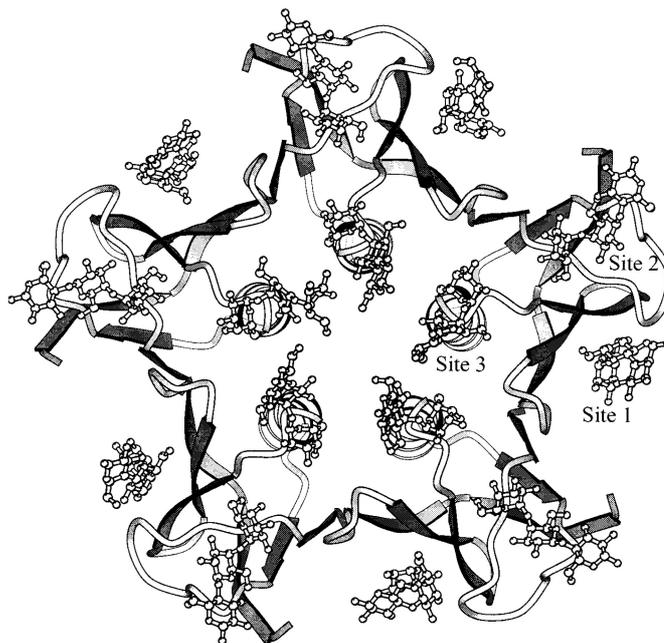
Sowohl (r)Viscumin als auch ML-I binden mit hoher Affinität an das terminale Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 4GlcNAc-Epitop (CD75s-Epitop) von  $IV^6$ Neu5Ac-nLc4Cer/CD75s-1-Gangliosiden. Durch Verlängerung der nLc4Cer-Grundstruktur um eine Gal $\beta$ 4GlcNAc-Einheit geht das  $VI^6$ Neu5Ac-nLc6Cer/CD75s-2-Gangliosid hervor. Isomere  $\alpha$ 2-3-sialylierte Ganglioside der Neolactoserie werden von rViscumin und ML-I nicht erkannt. Im gesunden Humangewebe befindet sich im Ceramidteil von CD75s-Gangliosiden meist entweder eine C16- oder eine C24-Fettsäure. Der Sphingosinpart (d18:1) ist konstant.

### 1.5.4 Shiga Toxin 1 (Stx1)

Neben verschiedenen Spezies der Gattung *Shigella*, produzieren auch enterohämorrhagische *Escherichia coli*-Stämme (EHEC) Shiga Toxine. Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli*-Stämme (STEC) werden meist über kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser aufgenommen und können beim Wirt Diarrhö, hämorrhagische Kolitis sowie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) hervorrufen. Ein Großteil der Fälle von HUS, welches hauptsächlich bei Kleinkindern und Säuglingen auftritt und bei selbigen akutes Nierenversagen auslösen kann, ist auf eine Infektion mit dem Serotyp *Escherichia coli* O157:H7 zurückzuführen [KARMALI *et al.*, 2004; TARR *et al.*, 2005; KARCH *et al.*, 2005].

Bei den Shiga Toxinen, die von EHEC-Stämmen gebildet werden, handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Zytotoxinen mit zwei Hauptgruppen, dem Shiga Toxin 1 und dem Shiga Toxin 2 [MÜTHING *et al.*, 2009]. Aufgrund ihres zytopathischen Effekts auf Verozellen ist in der Literatur auch die Bezeichnung Verotoxin 1 und 2 zu finden [KONOWALCHUK *et al.*, 1977; O'BRIEN *et al.*, 1983; SCOTLAND *et al.*, 1985]. Innerhalb der beiden Hauptgruppen konnten verschiedene Subtypen mit unterschiedlicher Assoziation zum Schweregrad des Krankheitsbildes nachgewiesen werden [MÜTHING *et al.*, 2009]. Shiga Toxine gehören zur AB<sub>5</sub>-Familie der Proteintoxine, welche sich aus einem enzymatisch aktiven (A) sowie einem zellbindenden Pentamer (B<sub>5</sub>) zusammensetzen. Die enzymatisch aktive A-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ungefähr 32 kDa ist nicht-kovalent mit einem Pentamer aus fünf identischen 7,7 kDa schweren B-Untereinheiten assoziiert [SANDVIG *et al.*, 2001].

Über das B-Pentamer bindet das Holotoxin mit hoher Affinität an seinen zellulären Rezeptor, das GSL Globotriaosylceramid (Gb3Cer/CD77). Das B-Pentamer kann bis zu 15 Gb3Cer/CD77-Moleküle auf der Wirtszelle binden [LING *et al.*, 1998] (siehe Abbildung 1-7). Wie auch beim ML-I erfolgt die Aufnahme des Toxins in die Wirtszelle mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose. In Shiga Toxin-sensitiven Zellen gelangt der Toxin-Rezeptor-Komplex mittels retrogradem Transport über frühe Endosomen und die Zisternen des *trans*-Golgi-Netzwerkes zum ER sowie zur Membran des Zellkerns. Sobald das Shiga Toxin das ER erreicht, erfolgt eine proteolytische Spaltung der A-Untereinheit durch die Protease Furin in ein A<sub>1</sub>- und ein A<sub>2</sub>-Fragment. Das bei diesem Prozess freigesetzte A<sub>1</sub>-Fragment, bei welchem es sich um eine *N*-Glykosidase handelt, inhibiert nach Transfer ins Zytosol dort die Proteinbiosynthese, indem es, analog zu ML-I, spezifisch das Adenin A<sub>4324</sub> der 28 S RNA der 60 S ribosomalen Untereinheit entfernt [SANDVIG *et al.*, 2001; MÜTHING *et al.*, 2009]. Durch Blockade der Proteinbiosynthese wird in den Wirtszellen die Apoptose ausgelöst.



**Abbildung 1-7: Ribbon-Darstellung des Stx1-B<sub>5</sub>-Rezeptorkomplexes.**

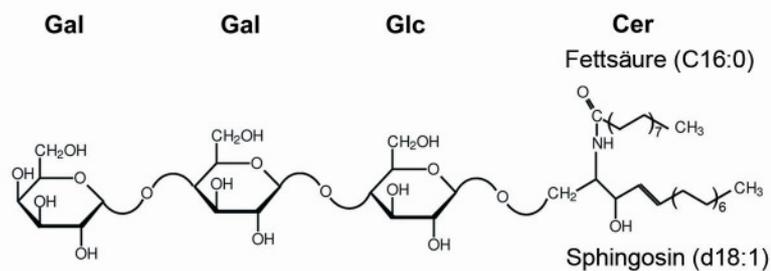
In der Abbildung sind Gb3-Trisaccharide, welche zur Durchführung von Röntgenstrukturanalysen des Stx1-B<sub>5</sub>-Rezeptorkomplexes eingesetzt wurden, im Komplex mit dem B-Pentamer dargestellt. Jede der B-Untereinheiten besitzt drei Zuckerbindestellen, welche spezifisch das Oligosaccharid Gb3 erkennen. Das Holotoxin kann somit insgesamt bis zu 15 Gb3Cer/CD77-Moleküle auf der Wirtszelloberfläche binden [LING *et al.*, 1998].

Der zytotoxische Effekt von Stx1 auf Krebszellen konnte zum Beispiel schon bei Xenograft-Tumoren im Nacktmausmodell gezeigt werden [KOVBASNJUK *et al.*, 2005]. Aber auch für die bildgebende Diagnostik ist Stx1 ein interessanter Kandidat. Janssen *et al.* [2006] konnten

bereits *in vivo* an Mausmodellen zeigen, dass mittels Stx1-Derivaten die gezielte Anreicherung von Kontrastmitteln in Tumoren des Gastrointestinaltraktes möglich ist, wodurch ein Kontrastgewinn zwischen Tumoren und gesundem Gewebe erzielt wird. Somit kann eine Diagnose mit Hilfe bildgebender Verfahren maßgeblich erleichtert werden.

### 1.5.5 Stx1-Rezeptoren

Bei dem Shiga Toxin Rezeptor Gb3Cer/CD77 (siehe Abbildung 1-8) handelt es sich um ein neutrales GSL der Globoserie, an dessen Ceramid das Trisaccharid Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc in  $\beta$ 1-1-Konfiguration gebunden ist [MEISEN *et al.*, 2005; MÜTHING *et al.*, 2009]. Stx1 bindet mit geringer Affinität auch an Gb4Cer, welches aus der Verlängerung von Gb3Cer/CD77 um eine GalNAc-Einheit durch das Enzym  $\beta$ 1,3-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase hervorgeht [MÜTHING *et al.*, 2009].



**Abbildung 1-8: Struktur des Shiga Toxin 1-Rezeptors Gb3Cer/CD77 (d18:1, C16:0).**

Das neutrale GSL Gb3Cer/CD77, bei dem das Trisaccharid Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ 4Glc über das C1-Atom des Sphingosins (d18:1) glykosidisch mit dem Ceramidpart verknüpft ist, stellt den hochaffinen Rezeptor (*high-affinity receptor*) von Stx1 dar. Mit geringer Affinität wird auch Gb4Cer (*low-affinity receptor*), welches aus einer Verlängerung um eine GalNAc-Einheit aus Gb3Cer/CD77 hervorgeht, von Stx1 gebunden [MEISEN *et al.*, 2005]. Im gesunden Humangewebe ist im Ceramid von Gb3Cer/CD77 vorwiegend eine C16- oder eine C24-Fettsäure zu finden. Der Sphingosinpart (d18:1) ist üblicherweise konstant.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Gb3Cer/CD77, das vor allen Dingen auf vaskulären Endothelzellen [MÜTHING *et al.*, 1999; SCHWEPPE *et al.* 2008; MÜTHING *et al.*, 2009] vorkommt und als Marker für B-Zell-Lymphome beziehungsweise B-Zell-Leukämien gilt [GORDON *et al.*, 1983; MURRAY *et al.*, 1985; KALISIAK *et al.*, 1991], auch auf verschiedenen soliden Tumoren wie dem Ovarial- [FARKAS-HIMSLEY *et al.*, 1995], dem Brust- [LACASSE *et al.*, 1999] sowie dem Kolonkarzinom [KOVBASNJUK *et al.*, 2005; FALGUIÈRES *et al.*, 2008] exprimiert wird. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der

Gb3Cer/CD77-Expression und einem invasiven Phänotyp bei Kolonkarzinomen nachgewiesen werden [KOVBASNJUK *et al.*, 2005]. Als natürlicher Ligand von Stx1 ist Gb3Cer/CD77 somit ein interessantes Target für (ziel)gerichtete oder auch Toxin-basierte Therapien, welche in den letzten Jahren immer mehr ins Interesse der Tumorforschung gerückt sind [JOHANNES AND DECAUDIN, 2005].

## **1.6 INFRAROT-MATRIX-UNTERSTÜTZTE-LASER- DESORPTIONS/IONISATIONS-ORTHOGONAL-FLUGZEIT- MASSENSPEKTROMETRIE (IR-MALDI-o-TOF-MS)**

Bei der Massenspektrometrie (MS) handelt es sich um eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht aus drei Hauptkomponenten: der Ionenquelle, dem Analysator, der die erzeugten Analytionen hinsichtlich des Masse/Ladungs-Verhältnisses auftrennt, und einem Detektor. Zur Ionisierung der Probensubstanzen wurde in der vorliegenden Arbeit die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) eingesetzt. Die MALDI stellt eine extrem schonende Ionisierungstechnik dar, die es ermöglicht, auch große, thermisch labile Biomoleküle intakt in die Gasphase zu überführen und dabei fragmentierungsarm zu ionisieren, so dass sie für eine massenspektrometrische Analyse zugänglich sind [KARAS AND HILLENKAMP, 1988]. Bei der MALDI-MS erfolgt zunächst eine Kokristallisation der Analytprobe mit einer geeigneten Matrixsubstanz (in der Regel kleine organische Moleküle), welche typischerweise in einem 1000- bis 10000fachen molaren Überschuss gegenüber den Probenmolekülen eingesetzt wird. Hierdurch wird eine Separation der einzelnen Analytmoleküle bereits in der kondensierten Phase geleistet. Die präparierte Probe wird in der Ionenquelle des Massenspektrometers einem intensiven Laserimpuls von einigen wenigen bis ca. 100 Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Die Grundidee der MALDI besteht nun darin, das Matrixmaterial und die Laserwellenlänge so aufeinander abzustimmen, dass durch eine möglichst starke Absorption des Laserlichtes die Strahlungsenergie hocheffizient in die Matrix eingekoppelt werden kann. Die Einkopplung der Laserenergie über resonante Anregung der Matrixmoleküle führt letztendlich zur Ablation des Matrix-Analytverbundes. Es wird angenommen, dass die Matrixmoleküle auch bei der Ionisierung des Analyten eine wichtige Rolle spielen, indem sie durch Protonentransfer für eine hohe Zahl

an elektrisch geladenen Probemolekülen sorgen. Standardmäßig werden für die MALDI Laser aus dem ultravioletten Spektralbereich eingesetzt. Beispiele hierfür sind Nd:YAG-Laser ( $\lambda = 355 \text{ nm}$  beziehungsweise  $\lambda = 266 \text{ nm}$ ) sowie Stickstofflaser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) mit Impulsdauern zwischen 0,5 und 10 ns (UV-MALDI). Als geeignete Matrixsubstanzen erwiesen sich, je nach Anwendungsgebiet, verschiedene Benzoe- und Zimtsäurederivate wie zum Beispiel 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylbenzoesäure. Bei der UV-MALDI kommen bis dato lediglich Festkörpermatrizes zum Einsatz. Die Einkopplung der Laserenergie erfolgt hierbei über die elektronische Anregung der konjugierten  $\pi$ -Elektronensysteme der Matrixmoleküle [LOTTSPRECHER UND ENGELS, 2006]. Neben UV-Lasern eignen sich aber auch Laser aus dem infraroten Spektralbereich zur Desorption/Ionisation (IR-MALDI). Hierbei wird die Laserenergie je nach Wellenlänge durch Anregung von intramolekularen Streck- oder Biegeschwingungen eingekoppelt. Bei einer Wellenlänge von ca.  $3 \mu\text{m}$  werden zum Beispiel OH- und NH-Bindungen angeregt. Somit eignen sich IR-Laser wie der Er:YAG- ( $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$ ) oder auch der Er:YSSG-Laser ( $\lambda = 2,79 \mu\text{m}$ ) zur Anregung von Flüssigmatrizes wie beispielsweise Glycerin [HILLENKAMP AND PETER-KATALINIĆ, 2007].

Mittels MALDI erzeugte Ionen lassen sich mit verschiedenen massenspektrometrischen Verfahren analysieren. Da bei der MALDI üblicherweise gepulste Ionen erzeugt werden, sind vor allen Dingen solche Verfahren zur Analyse geeignet, mit welchen es möglich ist, pro Laserexposition ein komplettes Massenspektrum aufzunehmen. Neben weiteren Vorteilen wie einer einfachen, robusten Messmethodik und einer vergleichsweise simplen Instrumentierung wird selbiges Kriterium von so genannten Flugzeitmassenspektrometern (TOF-Massenspektrometer, vom engl. *time of flight*) erfüllt. Bei ihnen handelt es sich um das am häufigsten eingesetzte Verfahren zur Analyse von MALDI-Ionen [HILLENKAMP AND PETER-KATALINIĆ, 2007]. Bei der TOF-MS werden die in der Ionenquelle erzeugten Analytionen durch Anlegen eines elektrostatischen Feldes auf eine kinetische Energie von einigen keV beschleunigt und durchlaufen daraufhin eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt werden. Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Werten besitzen – bei gleicher kinetischer Energie – nach der Beschleunigung unterschiedliche Geschwindigkeiten. Hat das Analytion die Masse  $m$  und die Ladung  $z \cdot e$  ( $e$ : Elementarladung), so gilt für seine kinetische Energie  $E_{kin}$  nach Durchlaufen der Beschleunigungsspannung  $U$ :

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U \quad (1)$$

$m$  = Masse des Ions

$v$  = Geschwindigkeit des Ions nach Beschleunigung

$z$  = Ladungszahl

$e$  = Elementarladung

$U$  = Beschleunigungsspannung

Somit lässt sich die Geschwindigkeit  $v$  der Ionen wie folgt berechnen:

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

Die Gesamtflugzeit  $t$  ergibt sich aus der Geschwindigkeit  $v$ , mit welcher ein Ion die Strecke  $L$  entsprechend der Länge der feldfreien Driftstrecke des Flugrohrs passiert hat:

$$t = \frac{L}{v} \quad (3)$$

Setzt man (2) in (3) ein, so ergibt sich:

$$t = \frac{L}{\sqrt{2zeU}} \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

beziehungsweise:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2$$

Dies bedeutet, dass das Verhältnis von Molekülmasse und Ladung proportional zu dem Quadrat der Flugzeit ist. Anhand der gemessenen Flugzeit lässt sich somit bei der TOF-MS die jeweilige Molekülmasse bestimmen [LOTTSPREICH UND ENGELS, 2006].

Der MALDI-Prozess selbst stellt jedoch ein gewisses Problem dar. Ionen gleicher Masse starten hierbei mit einer gewissen Verteilungsbreite der Energie, was auf verschiedene Effekte wie Energie-, Orts- und Zeitunschärfen, abstoßende elektrische Kräfte, Abschirmeffekte sowie Stöße beim Desorptions-/Ionisierungsprozess zurückzuführen ist. Die unterschiedlichen Startenergien von Ionen gleicher Masse tragen zur Verbreiterung der Ionensignale bei der Detektion bei. Die hierdurch hervorgerufene Verschlechterung der Massenauflösung kann jedoch durch den Einsatz von orthogonal-Flugzeitmassenspektrometern (o-TOF-Massenspektrometern) weitgehend kompensiert werden. Bei der o-TOF-MS erfolgt die Laserdesorption nicht, wie sonst üblich, im Hochvakuum, sondern unter einer Stickstoffatmosphäre von ca. 0,1 bis 1 mbar. Der Stickstoff dient hierbei als Stoßgas und bewirkt sowohl eine Abbremsung („Thermalisierung“) als auch eine Stabilisierung der Analytmoleküle (*collisional cooling*). An die Ionenquelle schließt sich ein Quadrupol an, welcher dazu dient, den gepulsten MALDI-Ionenstrahl in einen quasi-kontinuierlichen Strahl umzuwandeln und die Ionen in den TOF-Analysator zu leiten. Dort werden die Ionen senkrecht zu ihrer ursprünglichen Flugbahn extrahiert und nach ihrem  $m/z$  aufgetrennt. Die so erzielte Entkopplung des Ionisierungsprozesses von der Massenanalyse in o-TOF-Massenspektrometern führt neben einer verbesserten Massenauflösung auch zu einer erhöhten Massengenauigkeit gegenüber axial-TOF-Geräten [LOBODA *et al.*, 2003].

## 1.7 ZIELSETZUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine statistisch repräsentative Anzahl an Pankreas- und Kolonkarzinomgeweben mittels immunologischer und massenspektrometrischer Methoden auf die Expression verschiedener GSL, die als Rezeptoren potentieller Antitumormittel von therapeutischem Interesse sind, zu untersuchen. Als Referenz diente hierbei vergleichbares, gesundes Gewebe der betroffenen Organe der jeweiligen Tumorpatienten.

Da lediglich sehr geringe Mengen an Gewebematerial zur Durchführung der GSL-Expressionsanalysen, welche mittels Kombination von Dünnschichtchromatographie (DC) und Immundetektion (DC-Overlay-Assay) erfolgen sollten, zur Verfügung standen, galt es zunächst, die bestehende Analytik zu optimieren. Hierfür sollte die von Dreiswerd *et al.* [2005] beschriebene Methode, bei der die DC direkt mit der IR-MALDI-o-TOF-MS gekoppelt wird, weiterentwickelt werden, um auch immundetektierete Strukturen direkt auf der DC-Platte einer massenspektrometrischen Analyse unterziehen zu können.

Bei den GSL, die von besonderem Interesse waren, handelt es sich um Ganglioside mit dem terminalen Zuckerrest Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 4GlcNAc (CD75s), welche als Rezeptoren des zytotoxischen (r)Viscumins fungieren. Insgesamt sollten 38 Pankreastumore und gesundes Vergleichsgewebe der jeweiligen Patienten mit Hilfe des DC-Overlay-Assays auf ihren Gehalt an IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s-1-Gangliosid) untersucht werden, um festzustellen, ob es sich bei diesen um tumorassoziierte Moleküle handelt. Des Weiteren galt es, die Pankreaskarzinom- und entsprechenden Kontrollgewebe mittels DC-Overlay-Assay auch auf die Expression der isomeren IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer-Strukturen (iso-CD75s-Ganglioside), die terminal eine Sialinsäure in  $\alpha$ 2-3-Konfiguration tragen, zu untersuchen. In beiden Fällen sollten die Ganglioside mittels Immunfluoreszenzmikroskopie im Gewebe lokalisiert werden. Mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen galt es zudem, die immunologisch detektierten Strukturen vollständig zu charakterisieren.

Bei dem dritten Zelloberflächenmolekül, dessen Expression in Pankreaskarzinom- und Kolonkarzinomgeweben untersucht werden sollte, handelt es sich um das neutrale GSL Gb3Cer/CD77, das den hochaffinen Rezeptor des zytotoxischen Stx1 darstellt. Um festzustellen, ob eine Tumorassoziation vorliegt, sollten die Karzinome sowie die zugehörigen Kontrollen der jeweiligen Patienten mit Hilfe des DC-Overlay-Assays analysiert werden.

Analog zu der Vorgehensweise bei den Gangliosidexpressionsanalysen galt es auch in diesem Fall, die im DC-Overlay-Assay gewonnenen Daten mittels fluoreszenzmikroskopischer und massenspektrometrischer Analysen zu verifizieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurden Feinchemikalien der Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co.KG (Karlsruhe), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA), Röhm GmbH + Co.KG (Darmstadt), Riedel-de Haën AG (Seelze) sowie von Dako Germany (Hamburg), Fischer (Saarbrücken), Biomol (Hamburg) und Uniquema (Redcar, UK) verwendet. Alle eingesetzten Feinchemikalien hatten p. A. Qualität. Eine vollständige Auflistung der verwendeten Chemikalien findet sich im Anhang (Abschnitt 7.1). Die Lösungsmittel Chloroform und Methanol (p. A., Merck KGaA, Darmstadt) wurden vor Gebrauch destilliert.

#### 2.1.2 Tumor- und Kontrollproben

##### 2.1.2.1 Pankreas

Insgesamt lagen für die GSL-Expressionsanalysen 42 humane Pankreaskarzinomgewebeproben sowie gesundes Vergleichsgewebe von jedem Patienten vor. Ein Teil der Proben (n = 21 Patienten) wurde von Herrn Prof. Dr. med. Norbert Senninger und Herrn Prof. Dr. med. Jörg Haier (Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster) zur Verfügung gestellt. Die Herren Dr. med. Axel Denz, PD Dr. Christian Pilarsky sowie PD Dr. med. Robert Grützmann (Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden) stellten die restlichen Proben (n = 21 Patienten) bereit. Die Gewebeproben stammen von Pankreaskarzinompatienten, welchen der Primärtumor operativ entfernt wurde. In allen Fällen handelte es sich um duktales Adenokarzinome des exokrinen Pankreas. Die Proben wurden direkt nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Korrespondierende Kontrollproben wurden den jeweiligen Patienten an Gewebestellen, die nicht vom Tumor befallen waren, sich aber in geringer Distanz zum

---

Tumor befanden (etwa 2 cm), entnommen. Die Gewebefeuchtgewichte des zur GSL-Analytik eingesetzten Materials schwankten zwischen 8,5 und 197,5 mg.

Die nachfolgende Tabelle 2-1 enthält die pathologischen Daten der untersuchten Pankreaskarzinomproben. Die Klassifizierung der Tumoren erfolgte nach dem TNM-System der UICC [SOBIN AND WITTEKIND, 2002; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007] (vergleiche Einleitung, Abschnitt 1.1.1). Des Weiteren sind die Gewebefeuchtgewichte der einzelnen Proben aufgelistet.

**Tabelle 2-1: Pathologische Daten der Pankreaskarzinome sowie Feuchtgewichte der gesunden und malignen Pankreasgewebeprobe<sup>1</sup>.**

Patient	pT	pN <sup>2</sup>	pM <sup>2</sup>	UICC- Stage <sup>2</sup>	G <sup>2</sup>	Gewebe feuchtgewicht [mg]	
						Normal	Tumor
1	3	1	0	IIB	3	23,52	31,49
2	3	1	0	IIB	4	47,36	80,46
3	3	1	0	IIB	2	22,87	39,24
4	3	1	0	IIB	2	38,52	59,76
5	3	1	0	IIB	3	27,24	41,64
6	3	1	0	IIB	3	23,90	19,02
7	1	0	0	IA	2	82,07	51,92
8	3	0	0	IIA	3	18,55	26,28
9	3	1	0	IIB	2	63,24	60,49
10	3	0	0	IIA	3	18,21	42,77
11	3	0	0	IIA	2	8,50	45,14
12	3	0	0	IIA	3	17,43	25,74
13	3	1	0	IIB	3	28,37	68,81
14	3	1	1	IV	3	30,77	36,39
15	3	0	0	IIA	2	78,05	63,06
16	3	1	0	IIB	2	36,28	47,59
17	3	1	1	IV	2	77,97	36,35
18	3	1	0	IIB	3	36,29	65,10
19	3	1	0	IIB	3	28,02	69,85
20	3	1	0	IIB	2	19,97	42,97
21	3	0	0	IIA	3	21,92	115,14
22	2	X	X	X	2	197,50	75,80
23	3	1	1	IV	2	44,10	75,40
24	3	1	X	X	3	58,30	85,40
25	3	1	X	X	2	20,20	40,40
26	3	1	0	IIB	X	55,80	74,90
27	2	1	0	IIB	2	110,90	59,10
28	3	0	X	X	2	63,84	53,27
29	4	1(4/8)	X	X	2	143,56	153,00
30	3	1	X	X	2-3	32,53	71,26
31	4	1(9/24)	X	X	2	77,59	119,61
32	3	1	1	IV	2	110,14	153,37
33	3	1(2/20)	X	X	2	27,68	88,33
34	3	1(2/19)	X	X	2	17,97	27,63
35	3	1	X	X	2	60,43	54,65
36	3	1(8/27)	X	X	3	28,35	45,14
37	3	1(2/10)	X	X	3	92,63	40,57
38	3	0(0/17)	X	X	2	12,76	77,90
39	3	0	X	X	3	24,10	32,10
40	3	1	1	IV	1	23,20	27,10
41	3	1(2/8)	0	IIB	3	42,30	59,70
42	3	X	X	X	1-2	13,91	154,01

<sup>1</sup> TNM-Klassifikation, Staging und Grading (G), vergleiche Tabelle 1-1 bis Tabelle 1-3.

<sup>2</sup> X: kann nicht beurteilt werden.

### 2.1.2.2 Kolon

Zur Durchführung der GSL-Expressionsanalysen standen insgesamt 16 Kolonkarzinomgewebeproben sowie gesundes Vergleichsgewebe von jedem Patienten zur Verfügung. Die Proben wurden von Herrn Prof. Dr. med. Norbert Senninger und Herrn Prof. Dr. med. Jörg Haier (Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster) bereitgestellt. Sie stammen von Kolonkarzinompatienten, denen der Primärtumor operativ entfernt wurde. Die Lagerung der Proben, welche direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, erfolgte bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alle Tumorproben sind Adenokarzinome des Kolons. Die Kontrollproben aus gesundem Kolongewebe wurden den jeweiligen Patienten an tumorfreien Stellen des Darms in geringer Distanz (5 cm) zu den Malignomen entnommen. Die Gewebefeuchtgewichte des zur GSL-Analytik eingesetzten Materials lagen zwischen 11,17 und 161,92 mg.

In Tabelle 2-2 sind die pathologischen Daten sowie die Gewebefeuchtgewichte der einzelnen Proben aufgeführt. Die Tumoren wurden hierbei nach dem TNM-System der UICC klassifiziert [SOBIN AND WITTEKIND, 2002; JUNGINGER *et al.*, 2002] (vergleiche Einleitung, Abschnitt 1.2.1).

**Tabelle 2-2: Pathologische Daten der Kolonkarzinome sowie Feuchtgewichte der gesunden und malignen Kolongewebeproben<sup>1</sup>.**

Patient	pT	pN	pM <sup>2</sup>	UICC-Stage <sup>2</sup>	G	Gewebefeuchtgewicht [mg]	
						Normal	Tumor
1	3/4	2	0	IIIC	3	19,56	12,63
2	3	2	1	IV	2	86,08	51,84
3	3	0	0	IIA	3	62,42	24,85
4	4	2	1	IV	3	56,52	47,42
5	2	0	0	I	2	99,51	22,56
6	4	0	0	IIIB	2	58,96	13,78
7	3	1	X	X	3	23,45	95,99
8	2	2	X	X	2	112,10	11,17
9	3	1	X	X	2-3	104,80	14,66
10	3	0	X	X	2	82,32	24,23
11	3	2	1	IV	3	73,21	31,79
12	4	1	1	IV	2	161,79	32,37
13	3	0	0	IIA	2	116,92	157,10
14	1	1	1	IV	2	78,70	71,80
15	4	1	0	IIIB	2-3	52,31	73,87
16	3	0	0	IIA	2	41,22	21,84

<sup>1</sup> TNM-Klassifikation, Staging und Grading (G), vergleiche Tabelle 1-3 bis Tabelle 1-6.

<sup>2</sup> X: kann nicht beurteilt werden.

### 2.1.2.3 Leber

Zur Etablierung der massenspektrometrischen Analytik von tumorassoziierten GSL aus Geweberohextrakten standen zwei Leberkarzinomgewebeproben und gesundes Vergleichsgewebe zur Verfügung. In beiden Fällen handelte es sich um hepatozelluläre Karzinome (HCC, *hepatocellular carcinoma*). Das HCC ist der häufigste maligne Tumor der Leber; in westlichen Ländern tritt es etwa in 80-90% der Leberkarzinomfälle auf [NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007]. Die Proben stammen aus der Gewebekbank der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster und wurden von Herrn Prof. Dr. med. Norbert Senninger sowie Herrn Prof. Dr. med. Jörg Haier bereitgestellt. Sie wurden Patienten bei der operativen Entfernung ihres Primärtumors entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Die Kontrollproben wurden den beiden Patienten an Gewebestellen, die nicht vom Tumor befallen waren, sich aber in geringer Distanz (5 cm) zum Malignom befanden, entnommen.

Die pathologischen Daten sowie die Gewebefeuchtgewichte der beiden Patientenproben sind in Tabelle 2-3 aufgelistet. Die Klassifikation erfolgte nach dem TNM-System der UICC [SOBIN AND WITTEKIND, 2002; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007] (vergleiche Anhang, Abschnitt 7.5).

**Tabelle 2-3: Pathologische Daten der Leberkarzinome sowie Feuchtgewichte der gesunden und malignen Lebergewebeproben<sup>1</sup>.**

Patient	pT	pN <sup>2</sup>	pM <sup>2</sup>	UICC- Stage <sup>2</sup>	G	Gewebefeuchtgewicht [mg]	
						Normal	Tumor
1	4	X	X	X	3	46,10	263,70
2	3	X	X	X	2	49,50	72,20

<sup>1</sup> TNM-Klassifikation, Staging und Grading (G), vergleiche Anhang Abschnitt 7.5 und Tabelle 1-3.

<sup>2</sup> X: kann nicht beurteilt werden.

### 2.1.3 GSL-Referenzen

Die Benennung der GSL erfolgt in der vorliegenden Arbeit nach den Vorgaben der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur (IUPAC-IUB *Joint Commission on Biochemical Nomenclature*) [CHESTER, 1999]. Ganglioside der Ganglioserie wurden nach Svennerholm [1963] benannt (vergleiche Einleitung, Abschnitt 1.3). In den Abbildungen wird die symbolische Darstellung der Zuckerstrukturen nach Varki [2007] und dem Konsortium für Funktionale Glykomik [RAMAN *et al.*, 2006] verwendet.

**Tabelle 2-4: Auflistung der Hauptkomponenten sowie der GSL-Gesamtkonzentrationen der eingesetzten GSL-Referenzen.**

GSL-Referenz	Hauptkomponenten	Konzentration [µg/µL]	Literatur/Hersteller
Ganglioside aus humanen Granulozyten	GM3(Neu5Ac) IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer	1,5	MÜTHING <i>et al.</i> , 1993
Neutrale GSL aus humanen Erythrozyten	MHC Lc2Cer Gb3Cer Gb4Cer	2,7	MEISEN <i>et al.</i> , 2005
Neutrale GSL aus humanen Granulozyten	Lc2Cer nLc4Cer nLc6Cer nLc8Cer	1,5	DUVAR <i>et al.</i> , 1997; MÜTHING <i>et al.</i> , 2002
Neutrale GSL aus murinen MDAY-D2-Zellen	Lc2Cer Gg3Cer Gg4Cer	2	DUVAR <i>et al.</i> , 1997; MÜTHING <i>et al.</i> , 2002
Humane Hirnganglioside	GM1 GD1a GD1b GT1b	2	Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA

Nach Auftrennung der Ganglioside sowie der neutralen GSL aus humanen Granulozyten mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Orcinfärbung wurden jeweils die Mengen der Einzelkomponenten densitometrisch bestimmt (vergleiche Material und

Methoden, Abschnitt 2.2.5 (Dünnschichtchromatographie) und Abschnitt 2.2.6 (Orcinfärbung)):

In 10 µg der Gangliosid-Mischung aus humanen Granulozyten befinden sich:

IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0)	0,80 µg
IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	0,39 µg
IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0)	1,95 µg
IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	1,13 µg
VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:1/C24:0)	0,93 µg
VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0)	0,59 µg
VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:1/C24:0)	0,35 µg
VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0)	0,20 µg

10 µg der nGSL-Mischung aus humanen Granulozyten enthalten:

nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0)	0,65 µg
nLc4Cer (d18:1, C16:0)	0,85 µg
nLc6Cer (d18:1, C24:1/C24:0)	0,12 µg
nLc4Cer (d18:1, C16:0)	0,15 µg

## 2.1.4 Antikörper

Tabelle 2-5: Liste der eingesetzten Primärantikörper.

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Isotyp	Klonalität	Klon	Referenz
AK2-6	Neu5Ac $\alpha$ 6Gal $\beta$ 4GlcNAc-R (CD75s)	Huhn	IgY	polyklonal	-	MEISEN <i>et al.</i> , 2003; MÜTHING <i>et al.</i> , 2005
AK2-3	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc-R (iso-CD75s)	Huhn	IgY	polyklonal	-	MEISEN <i>et al.</i> , 2003
anti-Gb3Cer/CD77	Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ -R (CD77)	Huhn	IgY	polyklonal	-	MÜTHING <i>et al.</i> , 1999
anti-nLc4Cer	Gal $\beta$ 4GlcNAc-R	Huhn	IgY	polyklonal	-	MÜTHING <i>et al.</i> , 1999
anti-nLc4Cer	Gal $\beta$ 4GlcNAc-R	Maus	IgM	monoklonal	1B2-1B7	ATCC <sup>1</sup> , Manassas, VA, USA
anti-CTB	Choleratoxin B-Untereinheit (CTB)	Ziege	IgG	polyklonal	-	Calbiochem, Frankfurt
anti-RCL	<i>Ricinus communis</i> -Lektin (RCL)	Kaninchen	IgG	polyklonal	-	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA
anti-Stx1	Shiga Toxin 1 (Stx1)	Maus	IgG1	monoklonal	VT109/ 4-E9b	Sifin, Berlin
anti-(r)Viscumin	rViscumin/Viscumin A-Untereinheit	Maus	IgG1	monoklonal	TA5	TONEVITSKY <i>et al.</i> , 1995
anti-CD14	Lipopolysaccharid-Rezeptor (CD14)	Maus	IgG1	monoklonal	18D11	Immunotools, Friesoythe
anti-CD45	LCA ( <i>leukocyte common antigen</i> ) (CD45)	Maus	IgG1	monoklonal	MEM-28	Immunotools, Friesoythe
anti-CD31	PECAM-1 ( <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i> ) (CD31)	Maus	IgG1	monoklonal	MEM-05	Immunotools, Friesoythe
Isotypenkontrolle	irrelevantes Epitop	Maus	IgG1	monoklonal	203	Immunotools, Friesoythe

<sup>1</sup> American type culture collection.

**Tabelle 2-6: Liste der eingesetzten Sekundäantikörper.<sup>1</sup>**

<b>Sekundäantikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Referenz</b>
Kaninchen anti-Huhn IgY (IgG)	alkalische Phosphatase	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA
Ziege anti-Maus IgG + IgM	alkalische Phosphatase	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA
Kaninchen anti-Ziege IgG	alkalische Phosphatase	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA
Ziege anti-Kaninchen IgG	alkalische Phosphatase	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA
Kaninchen anti-Huhn IgY (IgG)	Dichlorotriazinylamino Fluoreszein (DTAF)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA
Kaninchen anti-Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

<sup>1</sup> In allen Fällen handelt es sich um mittels Affinitätschromatographie aufgereinigte Antikörper.

### 2.1.5 Toxine und Lektine

**Tabelle 2-7: Liste der verwendeten Toxine und Lektine.**

<b>Toxin/Lektin</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Referenz</b>
Choleratoxin B-Untereinheit	CTB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Shiga Toxin 1	Stx1	Dr. M. Bielaszewska, Universität Münster
<i>Ricinus communis</i> -Lektin	RCL	Dr. F. Stirpe, Universität Bologna, Italien
Viscumin	-	Dr. F. Stirpe, Universität Bologna, Italien
rViscumin	-	ECK <i>et al.</i> , 1999a,b

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Reinigung der Glasgefäße

Um mögliche Kontaminationen, die sich vor allen Dingen störend auf die massenspektrometrische Analytik auswirken können, zu vermeiden, wurden die eingesetzten Glasgeräte einer speziellen Reinigung unterzogen:

Gespülte Glaskolben wurden mit Methanol befüllt. Durch fünf- bis zehnminütige Beschallung der mit Methanol befüllten Glaskolben im Ultraschallbad wurden verbliebene Verunreinigungen entfernt.

Die 10 mL-Schraubdeckelröhrchen, welche zur Lagerung der GSL-Rohextrakte verwendet wurden, sowie Schraubdeckelröhrchen, in welchen die Proben für die massenspektrometrischen Analysen aufbereitet wurden, wurden über Nacht mit konzentrierter methanolischer KOH inkubiert. Im Anschluss wurden sie in deionisiertem Wasser abgekocht und dann mit Methanol im Ultraschallbad 20 min beschallt, um verbliebene Verunreinigungen vollständig zu entfernen.

### 2.2.2 GSL-Extraktion aus humanen Geweben

Zur Extraktion der GSL wurden die Gewebeproben zunächst mit Hilfe eines Skalpells auf einer bei  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten Glasplatte zerkleinert und anschließend in Glasröhrchen überführt. Nach gravimetrischer Bestimmung der Feuchtmasse wurden 2 mL Chloroform/Methanol (1/2, v/v) zu der Probe gegeben, das Gewebe mit einem Homogenisator (Polytron<sup>®</sup> PT 1200, Kinematica AG, Littau, Schweiz, Spitzentyp: PT-DA 1205/2) 2 min homogenisiert und im Anschluss 1 min mit dem Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) gemischt. Die am Homogenisator verbliebenen Gewebereste wurden durch zweiminütige Homogenisation in weiteren 2 mL Chloroform/Methanol (1/2, v/v) zerkleinert und nach einminütigem Mischen mit dem Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) der Probe zugegeben. Nach fünfminütiger Beschallung im Ultraschallbad wurde die Probe 2 min bei 3000 UpM (ca. 1160 g) zentrifugiert. Der Überstand (Ü1) wurde in einen 50 mL-Glasspitzkolben überführt, während das Sediment in 4 mL Chloroform/Methanol (1/1, v/v) aufgenommen, 1 min gemischt und anschließend abermals 5 min mit Ultraschall behandelt wurde. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 3000 UpM (ca. 1160 g) wurde der

Überstand (Ü2) zu Ü1 in den Glaskolben gegeben. Es erfolgte eine weitere Extraktion des Sediments mit 4 mL Chloroform/Methanol (2/1, v/v). Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand zu der restlichen Probe (Ü1 und Ü2) in den Glaskolben gegeben. Das Lösungsmittelgemisch wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Heidolph VV 2001, Kehlheim) bei 37°C und 210 UpM verdampft.

### 2.2.3 Alkalische Hydrolyse

Die alkalische Hydrolyse dient der Verseifung störender Phospholipide sowie Triacylglyceride im Lipidextrakt und erfolgte durch einstündige Inkubation der extrahierten Lipide in 4 mL wässriger 1 N NaOH bei 37°C. Unter diesen milden alkalischen Bedingungen bleiben die Amidbindungen der GSL im Gegensatz zu den chemisch instabileren Esterbindungen der Phospholipide und Triacylglyceride intakt. Die Neutralisation der Extrakte erfolgte auf Eis durch Zugabe von 400 µL 10 N HCl.

### 2.2.4 Dialyse

Zur Entfernung von Salzen und Lipidfragmenten wurden die Proben nach der alkalischen Hydrolyse zwei Tage bei 4°C in Dialyseschläuchen der Firma Medicell International Ltd. (London, UK) mit einem molekularen *cut-off* von 12.000-14.000 Da gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Bei den vorliegenden Dialysebedingungen bilden die GSL Mizellen aus, so dass sie die Dialysemembran nicht passieren können und in den Schläuchen verbleiben. Zweimal täglich wurde ein Wasserwechsel durchgeführt.

Nach Beenden der Dialyse wurden die Proben jeweils in 50 mL-Glaskolben überführt und mittels Rotationsverdampfung bei 37°C und 210 UpM eingeeengt. Durch Zugabe von 1 mL Chloroform/Methanol (2/1, v/v) und einminütiger Beschallung im Ultraschallbad wurden die Proben von den Wänden der Glaskolben gelöst und im Anschluss jeweils in ein Glasschraubdeckelröhrchen überführt. Die Chloroform/Methanol-Zugabe wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Chloroform/Methanol-Extrakte in einem Heizblock bei 37°C unter Stickstoffbegasung eingeeengt.

Zur Analyse wurden alle Proben auf die gleiche Konzentration eingestellt, indem jeweils pro mg Feuchtmasse 10 µL Chloroform/Methanol (2/1, v/v) dem GSL-Extrakt zugegeben wurden.

### 2.2.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (DC) stellt die dominierende Methode in der Lipidanalytik dar. So findet neben der Flüssigkeits- und der Gaschromatographie, vor allen Dingen auch die DC Einsatz bei der Auftrennung komplexer Lipidmischungen. Als polare, stationäre Phase dienen bei der Normalphasen-DC meist Kieselgel ( $\text{SiO}_2$ ), Aluminiumoxid ( $\text{Al}_3\text{O}_3$ ) oder Cellulosederivate, welche in Form einer dünnen Schicht (0,1-1 mm) auf eine Glas-, Kunststoff- oder Aluminiumplatte aufgebracht sind. Je nach Fragestellung kommt auch die Umkehrphasen-DC zum Einsatz, bei der mit Kohlenwasserstoffketten derivatisiertes  $\text{SiO}_2$  als stationäre Phase verwendet wird. Als mobile Phase werden für die GSL-Analytik Lösungsmittelgemische aus Chloroform, Methanol und Wasser eingesetzt. In einer speziellen Kammer, in der die Kieselgelplatte nach Auftragung der Proben mit ihrem unteren Rand in das Laufmittel gestellt wird, findet die Chromatographie statt. Infolge der Kapillarkräfte wandert das Laufmittel auf der Kieselgelplatte nach oben und das Lipidgemisch trennt sich entsprechend der Polarität seiner Komponenten auf. Bei der Normalphasen-DC werden zum Beispiel polare Lipide, wie GSL, auf der polaren Kieselgelplatte wesentlich stärker zurückgehalten als unpolare Triacylglyceride. GSL aus humanen Geweben sind meist mit einer C16- oder einer C24-Fettsäure substituiert und treten somit als Doppelbanden im Chromatogramm auf, wobei die polarere Spezies (C16) in der unteren Bande migriert. [PINGOUD UND URBANKE, 1997; LOTTSPREICH UND ENGELS, 2006].

#### **Durchführung:**

In der vorliegenden Arbeit diente die DC zur Auftrennung der GSL aus den Gewebeextrakten sowie aus den GSL-Referenzmischungen. Es wurden Kieselgel 60 beschichtete Glasplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 *high performance thin-layer chromatography* (HPTLC)-Fertigplatten, 10 cm x 10 cm, 0,2 mm Schichtdicke, Merck KGaA, Darmstadt) eingesetzt. Zur Entfernung von Restwasser aus dem Kieselgel wurden die DC-Platten 45 min bei 110°C inkubiert. Bis zum Gebrauch erfolgte die Lagerung der aktivierten Platten über Blaugel (Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator) in einem mit  $\text{P}_2\text{O}_5$  bestückten Exsikkator.

Zur Trennung wurden die GSL-Extrakte mit einem automatischen Probenaufgeber (Linomat IV, CAMAG, Muttenz, Schweiz) auf die jeweilige Platte aufgetragen. Neutrale GSL wurden in Chloroform/Methanol/Wasser (120/70/17, v/v/v) + 20 mg  $\text{CaCl}_2$ /100 mL

(= Laufmittel 1) und Ganglioside in Chloroform/Methanol/Wasser (120/85/20, v/v/v) + 20 mg  $\text{CaCl}_2$ /100 mL (= Laufmittel 2) chromatographiert. Die Laufzeit betrug 20 min.

Bei der Analyse der GSL-Extrakte aus den Geweben wurde direkt nach Aufgabe der Proben auf die DC-Platte ein dreißigminütiger Vorlauf mit Chloroform durchgeführt. Hierdurch chromatographierten die nach der Dialyse in den Extrakten verbliebenen, unpolaren Lipide (zum Beispiel Fettsäuren und Ceramide) vorab vom Probenauftragungspunkt, so dass bei der nachfolgenden Chromatographie der GSL Verdrängungseffekte weitgehend vermieden und somit bessere GSL-Trennungen erzielt werden konnten.

### **2.2.6 Orcinfärbung**

Da Orcin Zucker färbt, eignet es sich sowohl für den Nachweis von neutralen GSL als auch für den Nachweis von Gangliosiden.

Die DC-Platte wurde nach dem Lauf 5 min über  $\text{P}_2\text{O}_5$  im Exsikkator unter Ölpumpenvakuum getrocknet und im Anschluss 15 sec in die Orcinlösung (0,3% (w/v) Orcin (3,5-Dihydroxytoluol-Monohydrat, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) in 3 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) getaucht. Danach wurde die DC-Platte auf einer Heizplatte bei 100°C entwickelt.

Zur Bestimmung der Anteile der Einzelkomponenten in der neutralen GSL- und der Gangliosidmischung aus humanen Granulozyten (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.1.3) wurden die Orcin-gefärbten Banden mit Hilfe eines CD60 Scanners der Firma Desaga (Heidelberg, Deutschland, Software ProQuant<sup>®</sup>, Version 1.06.000) densitometrisch quantifiziert. Die Messung erfolgte im Remissionsmodus bei einer Wellenlänge von 544 nm und einem Lichtstrahl mit einer Spalthöhe von 0,02 mm und einer Spaltbreite von 3 mm.

### 2.2.7 DC-Overlay-Assay

Der DC-Overlay-Assay ist eine einfache, schnelle und sensitive Methode, welche, unter Zuhilfenahme von Antikörpern, Lektinen oder Toxinen, der spezifischen Detektion verschiedener Oligosaccharidstrukturen von GSL dient. Hierbei handelt es sich um ein ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)-ähnliches Verfahren, dessen Durchführung auf der DC-Platte erfolgt. Im Gegensatz zum ELISA, bei welchem der Enzym-katalysierte Chromogenumsatz zum Nachweis des Antigens in wässrigem Milieu stattfindet und photometrisch quantifiziert werden kann, erfolgt die Visualisierung beim DC-Overlay-Assay durch Enzym-katalysierte Umwandlung eines gelösten Chromogens in ein gefärbtes Präzipitat. Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Durchführung der DC-Overlay-Assays bei Raumtemperatur.

#### 2.2.7.1 Fixierung des Kieselgels durch Plexigum-Beschichtung

Da bei der Durchführung des DC-Overlay-Assays, unabhängig vom Detektionssystem, mit wässrigen Lösungen gearbeitet wird, muss zunächst das hydrophile Kieselgel fixiert werden, damit es sich nicht von der Glasplatte ablöst. Hierfür wurden die DC-Platten nach der chromatographischen Trennung der GSL zunächst 40 min über  $P_2O_5$  im Exsikkator über Ölpumpenvakuum getrocknet. Unmittelbar danach erfolgte ca. 45 min die Beschichtung der Platten mit Plexigum (0,5% (w/v) Polyisobutylmethacrylat (Plexigum P28, Röhm, Darmstadt) in wasserfreiem *n*-Hexan) in einer DC-Kammer.

#### 2.2.7.2 Overlay-Assay mit Antikörpern

##### **Puffer und Lösungen:**

In Tabelle 2-8 sind die Lösungen und Puffer, welche im Overlay-Assay eingesetzt wurden, aufgeführt.

**Tabelle 2-8: Lösungen und Puffer für den Overlay-Assay.**

<b>Lösungen und Puffer</b>	<b>Substanzen</b>
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,02% (w/v) NaN <sub>3</sub> in Milli-Q Wasser pH 7,2
Lösung A	1% (w/v) BSA (bovines Serumalbumin, Serva, Heidelberg) 0,02% (w/v) NaN <sub>3</sub> in PBS
Lösung B	0,05% (v/v) Tween 21 (Uniquema, Redcar, UK) 0,02% (w/v) NaN <sub>3</sub> in PBS
Glycinpuffer	0,1 M Glycin 1 mM ZnCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> in Milli-Q Wasser pH 10,4
Substratlösung	0,05% (w/v) BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) in Glycinpuffer

**Antikörper:**

Tabelle 2-9 enthält eine Auflistung der Verdünnungen der im Overlay-Assay verwendeten Antikörper.

**Tabelle 2-9: Verdünnungen der im Overlay-Assay eingesetzten Antikörper.**

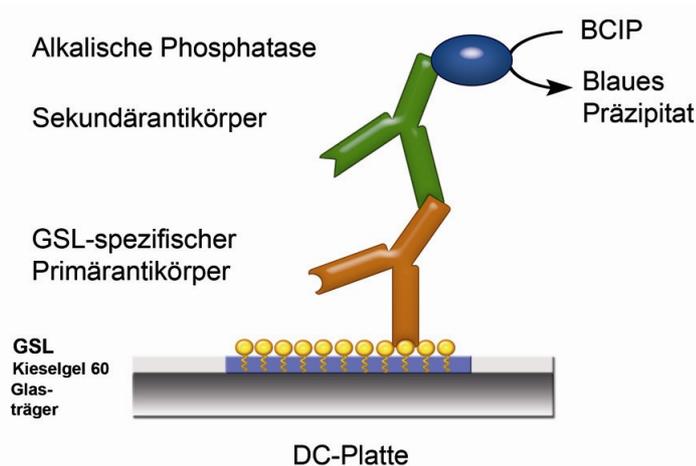
<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung<sup>1</sup></b>
AK2-6 (anti-CD75s)	1:2000
AK2-3 (anti-iso-CD75s)	1:2000
anti-Gb3Cer/CD77	1:2000
anti-nLc4Cer	1:2000
1B2-1B7 (anti-nLc4Cer)	1:10
Kaninchen anti-Huhn IgY (IgG)	1:2000
Ziege anti-Maus IgG + IgM	1:2000

<sup>1</sup> in Lösung A.

**Durchführung:**

Nach der Plexigumbeschichtung wurden die DC-Platten über Nacht bei 37°C mit PBS (80 mL/Platte) inkubiert und anschließend 15 min mit Lösung A abgesättigt. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation der DC-Platten mit dem jeweiligen Primärantikörper, welcher in Lösung A verdünnt wurde (vergleiche Tabelle 2-9). Vor Zugabe des Sekundärantikörpers, an den das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war, wurden die DC-Platten dreimal mit Lösung B gewaschen. Die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper, welcher in einer Verdünnung von 1:2000 in Lösung A auf die DC-Platten gegeben wurde (vergleiche Tabelle 2-9), dauerte 60 min. Im Anschluss wurden die DC-Platten dreimal mit Lösung B und einmal mit Glycinpuffer gewaschen. Dann wurde die Substratlösung auf die DC-Platten gegeben. Die AP setzte das Substrat in ein blaues Präzipitat um. Die Dauer der Färbung variierte in Abhängigkeit von den aufgetragenen GSL-Mengen und den eingesetzten Primärantikörpern. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde Glycinpuffer verwendet. In Abbildung 2-1 ist ein Schema des Antikörper basierten-Overlay-Assays gezeigt.

Zur Evaluation der Ergebnisse der Overlay-Assays wurden die immungefärbten Banden mittels CD60 Scanner (Fa. Desaga) densitometrisch quantifiziert. Die Messung erfolgte im Remissionsmodus bei einer Wellenlänge von 630 nm und einem Lichtstrahl mit den Ausmaßen 0,02 mm x 3 mm.



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Overlay-Assays mit Antikörpern.**

Bei dem Overlay-Assay handelt es sich um ein ELISA-ähnliches Verfahren auf der DC-Platte. Hierbei wird der primäre Antikörper, der spezifisch gegen die Targetstruktur eines GSLs gerichtet ist, von einem zweiten Antikörper, an den zum Beispiel das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist, erkannt und gebunden. Die Visualisierung erfolgt durch AP-katalysierte Umwandlung eines gelösten Chromogens in ein gefärbtes Präzipitat.

### 2.2.7.3 Overlay-Assay mit Toxinen und Lektinen

#### **Puffer und Lösungen:**

Zur Durchführung des Overlay-Assays mit Toxinen und Lektinen wurden die in Tabelle 2-8 aufgeführten Puffer sowie Lösungen verwendet (vergleiche Material und Methoden, Abschnitt 2.2.7.2 (Overlay-Assay mit Antikörpern)).

#### **Toxine und Lektine:**

In Tabelle 2-10 sind die im Overlay-Assay eingesetzten Toxin- sowie Lektinkonzentrationen aufgelistet.

**Tabelle 2-10: Im Overlay-Assay eingesetzte Toxin- und Lektinkonzentrationen.**

Toxin/Lektin	Konzentration <sup>1</sup> [µg/mL]
CTB	0,25
Stx1	0,2
RCL	1
Viscumin	1
rViscumin	1

<sup>1</sup> in Lösung A.

#### **Antikörper:**

In Tabelle 2-11 sind die Konzentrationen sowie die Verdünnungen der Antikörper, welche im Overlay-Assay eingesetzt wurden, aufgeführt.

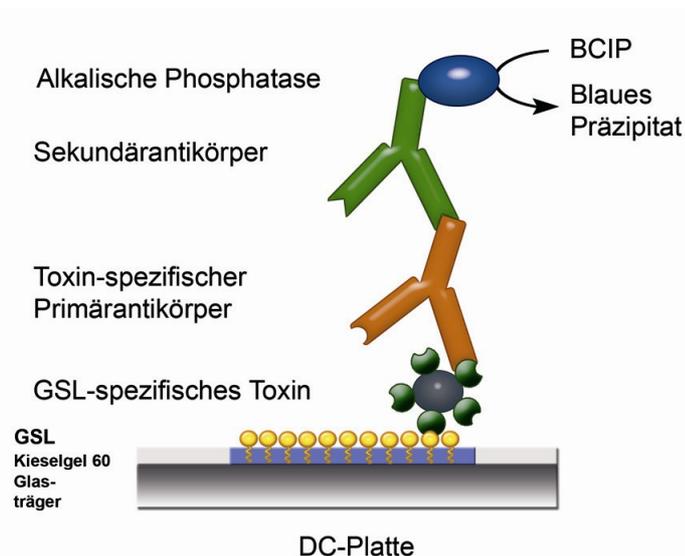
**Tabelle 2-11: Verdünnungen und Konzentrationen der im Overlay-Assay eingesetzten Antikörper.**

Primärantikörper	Verdünnung <sup>1</sup>	Konzentration <sup>1</sup> [µg/mL]
anti-CTB	1:4000	-
anti-Stx1	-	2 µg/mL
anti-RCL	1:200	-
anti-(r)Viscumin	-	1 µg/mL
Kaninchen anti-Ziege IgG	1:2000	
Ziege anti-Kaninchen IgG	1:2000	
Ziege anti-Maus IgG + IgM	1:2000	

<sup>1</sup> in Lösung A.

**Durchführung:**

Die Plexigum-beschichteten DC-Platten wurden über Nacht bei 37°C mit 80 mL PBS pro Platte inkubiert und im Anschluss 30 min mit Lösung A abgesättigt. Danach erfolgte eine eineinhalbstündige Inkubation der DC-Platten mit dem jeweiligen Toxin beziehungsweise Lektin. Die Toxine/Lektine wurden hierbei in Lösung A verdünnt (vergleiche Tabelle 2-10). Vor Zugabe des Primärantikörpers gegen das jeweils eingesetzte Toxin/Lektin wurden die DC-Platten dreimal mit Lösung B gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher in Lösung A verdünnt auf die DC-Platten gegeben wurde (vergleiche Tabelle 2-11), dauerte zwei Stunden. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Lösung B erfolgte die einstündige Inkubation mit dem entsprechenden AP-konjugierten Sekundärantikörper, der jeweils in einer Verdünnung von 1:2000 in Lösung A eingesetzt wurde (vergleiche Tabelle 2-11). Im Anschluss wurden die DC-Platten dreimal mit Lösung B und einmal mit Glycinpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe der Substratlösung. Die Dauer der Färbung variierte in Abhängigkeit von den aufgetragenen GSL-Mengen und den eingesetzten Toxinen/Lektinen. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde Glycinpuffer verwendet. Eine schematische Darstellung des Overlay-Assays mit Toxinen findet sich in Abbildung 2-2.



**Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Overlay-Assays mit Toxinen.**

Die Detektion der Targetstruktur auf der DC-Platte erfolgt mit Hilfe eines GSL-spezifischen Toxins. Der primäre Antikörper, der gegen das Toxin gerichtet ist, wird von einem zweiten Antikörper, an welchen das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist, erkannt und gebunden. Die Visualisierung erfolgt durch AP-katalysierte Umwandlung eines gelösten Chromogens in ein gefärbtes Präzipitat.

#### 2.2.7.4 Auswertung der Overlay-Assay Daten

Zur Evaluation der Overlay-Assay Ergebnisse wurden die densitometrischen Daten der immungefärbten GSL-Banden herangezogen (vergleiche Material und Methoden, Abschnitt 2.2.7.2). Um die Werte der einzelnen Tumorproben miteinander vergleichen und sie entsprechend ihrer GSL-Expression in Gruppen einteilen zu können, wurden von den Extinktionswerten der Tumorgewebeproben die entsprechenden Extinktionswerte des zugehörigen gesunden Gewebes subtrahiert. Die Einteilung der Tumoren in verschiedene Expressionsgruppen entsprechend der errechneten Werte ist in nachfolgender Tabelle 2-12 dargestellt.

**Tabelle 2-12: Einteilung der Tumore in Expressionsgruppen entsprechend ihrer differentiellen GSL-Expression.<sup>1</sup>**

Expressionsgruppe <sup>2</sup>	CD75s-Ganglioside Pankreas	iso-CD75s-Ganglioside Pankreas	Gb3Cer/CD77 Pankreas	Gb3Cer/CD77 Kolon
<b>I</b>	$2000 < x$	$2000 < x$	$4000 < x$	$2000 < x$
<b>II</b>	$400 < x < 2000$	$400 < x < 2000$	$700 < x < 4000$	$200 < x < 2000$
<b>III</b>	$-400 < x < 400$	$-400 < x < 400$	$-700 < x < 700$	$-200 < x < 200$
<b>IV</b>	$x < -400$	$x < -400$	$x < -700$	$x < -200$

<sup>1</sup> errechnete Werte aus  $OD_{\text{Tumor}} - OD_{\text{Gesund}}$ .

<sup>2</sup> **I**: stark erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe; **II**: schwach erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe; **III**: gleiche GSL-Expression im Tumor- und Normalgewebe; **IV**: höhere GSL-Expression im Normalgewebe.

### 2.2.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine weit verbreitete Methode, um die Verteilung von Makromolekülen in Zellen und Geweben zu untersuchen. Sie wurde zur Lokalisation der verschiedenen GSL-Strukturen in gesunden sowie malignen Pankreas- und Kolongeweben eingesetzt. Alle Inkubationsschritte zur Durchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

#### Puffer und Lösungen:

In der nachfolgenden Tabelle 2-13 sind die Lösungen und Puffer, welche zur Durchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet wurden, aufgelistet. Die Zusammensetzung von PBS und Lösung A ist in Tabelle 2-8 beschrieben (vergleiche Material und Methoden, Abschnitt 2.2.7.2 (Overlay-Assay mit Antikörpern)).

**Tabelle 2-13: Lösungen und Puffer für die Immunfluoreszenzmikroskopie.**

Lösungen und Puffer	Substanzen
Blocklösung	3% (w/v) BSA in PBS
DAPI-Gebrauchslösung	1 µg/mL DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dichlorid, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) in PBS

#### Toxine und Lektine:

In Tabelle 2-14 sind die Verdünnungen der zur Immunfluoreszenz eingesetzten Antikörper aufgeführt.

**Tabelle 2-14: Verdünnungen der zur Durchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzten Antikörper:**

Primärantikörper	Verdünnung <sup>1</sup>
AK2-6 (anti-CD75s)	1:50
AK2-3 (anti-iso-CD75s)	1:25
anti-Gb3Cer/CD77	1:15
18D11 (anti-CD14)	1:200
MEM-28 (anti-CD45)	1:200
MEM-05 (anti-CD31)	1:200
203, Isotypenkontrolle	1:200
Kaninchen anti-Huhn IgY (IgG)	1:40
Kaninchen anti-Maus IgG (H+L)	1:250

<sup>1</sup> in Lösung A.

### Durchführung:

Mit Hilfe eines Kryostaten (Modell: HM 505 E, Microm, Walldorf) wurden 4 µm dicke Gefrierschnitte von gesundem sowie malignem Pankreas- und Kolongewebe angefertigt und auf Glasobjekträger (SuperFrost<sup>®</sup>Plus, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Teningen) aufgezogen. Im Anschluss wurden die Schnitte 48 h bei Raumtemperatur getrocknet und 10 min in 3,7% Formaldehydlösung (Fischar, Saarbrücken) fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte 30 min mit Blocklösung abgesättigt und daraufhin erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 50 µL der mit Lösung A verdünnten Primärantikörper auf die Schnitte gegeben (vergleiche Tabelle 2-5 und Tabelle 2-14). Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4°C wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe der Sekundärantikörper (50 µL), welche in Lösung A verdünnt wurden (vergleiche Tabelle 2-14). Zur späteren Detektion mittels Immunfluoreszenz waren der anti-Huhn IgY Antikörper mit DTAF und der anti-Maus IgG Antikörper mit Alexa Fluor<sup>®</sup>568 markiert. Nach einstündiger Inkubation der Schnitte mit den Sekundärantikörpern erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Mittels fünfzehnminütiger Inkubation mit DAPI-Gebrauchslösung wurden die Zellkerne gefärbt. Die Färbung beruht hierbei auf der selektiven Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI an DNA, was mit hoher Spezifität zur Bildung stark fluoreszierender DNA-DAPI-Komplexe führt. DAPI wird von Zellen sehr rasch in die DNA aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Nach Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit *Fluorescence Mounting Medium* (Dako Germany, Hamburg) eingedeckt. Als

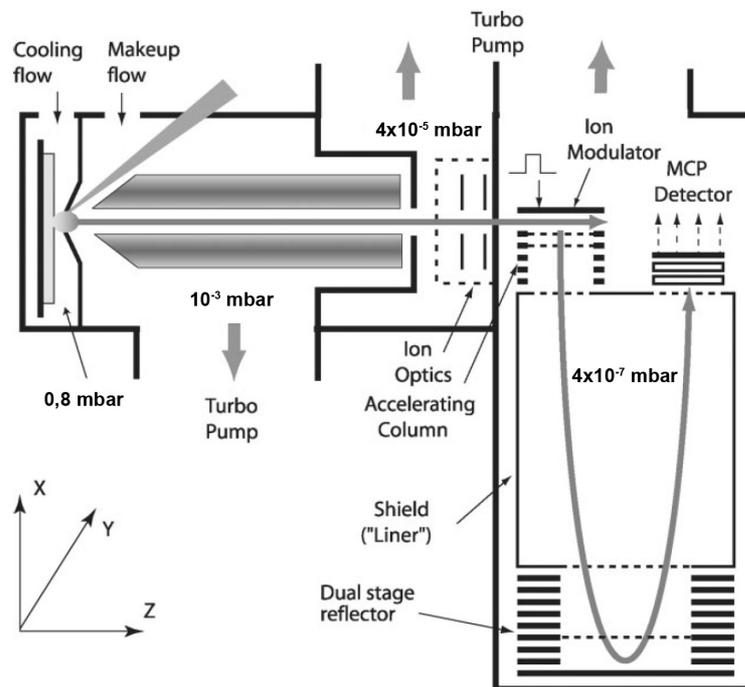
Negativkontrollen dienten Schnitte, die zum einen nur mit dem Sekundärantikörper und zum anderen nur mit Präimmenserum aus Huhn sowie einer Maus IgG1 Isotypenkontrolle anstelle der Primärantikörper inkubiert wurden. Des Weiteren galt es zu zeigen, dass sich die mit den Antikörpern AK2-6 und AK2-3 sowie dem anti-Gb3Cer/CD77-Antikörper detektierten Epitope tatsächlich auf Lipiden befanden. Hierfür wurden vor Durchführung der Immunfärbung die Schnitte jeweils 10 min mit Methanol und Chloroform/Methanol (1/1, v/v) behandelt, um die Lipide aus den Geweben zu extrahieren.

Die Analyse der immungefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axioskop) der Firma Zeiss (Göttingen) bei 400-facher Vergrößerung (Objektiv: Plan-NEOFLUAR, numerische Apertur 0,75). Die Fluoreszenz wurde mit einer CCD-Kamera (AxioCam CCD-Kamera, Zeiss) aufgenommen und mit dem Programm AxioVision (Version 3.1., Zeiss, 1.300 x 1.030 Pixel) dokumentiert. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software Adobe Photoshop (Version 8.0.1, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

### 2.2.9 IR-MALDI-o-TOF-MS

Die massenspektrometrische Analyse der GSL mittels IR-MALDI-o-TOF-MS erfolgte direkt auf der DC-Platte [DREISEWERD *et al.*, 2005]. Hierfür wurde nach Durchführung des Overlay-Assays (vergleiche Material und Methoden, Abschnitt 2.2.7) die DC-Platte 2 Stunden in Ammoniumacetatpuffer (10 mM Ammoniumacetat in Milli-Q Wasser, pH 3,6) inkubiert, da sich dieser Inkubationsschritt positiv auf die Ionisierung der Analyten bei der massenspektrometrischen Analyse auswirkt. Die Entfernung des Plexigums erfolgte durch dreimaliges Eintauchen der DC-Platte in Chloroform. Danach wurde die Platte in kleine ca. 2,5 cm lange und 1 cm breite Stücke geschnitten und mit Hilfe von doppelseitigen Klebestreifen auf dem Probenhalter befestigt. Es wurden mehrere Tropfen Glycerin in Volumina von 0,3 µL direkt auf die immungefärbten Banden gegeben. Die Messung der Proben erfolgte direkt auf der DC-Platte mit Hilfe eines modifizierten o-TOF Prototypen der Firma MDS Sciex (Concord, ON, Kanada), ähnlich dem von Loboda *et al.* [2003] beschriebenen o-TOF Massenspektrometer (siehe Abbildung 2-3). Eine kommerzielle Version des Gerätes (prOTOF 2000) ist mittlerweile bei der Firma Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) erhältlich. Der eingesetzte Prototyp verfügt über eine Massenauflösung von ca. 10.000 und eine Massengenauigkeit von ca. 20 ppm. Zur Ionisierung des Analyten wurde ein Er:YAG-Laser (Bioscope, BiOptics Laser Systems AG, Berlin) eingesetzt. Dieser hat eine Pulsdauer von 100 ns bei einer Wellenlänge von 2,94 µm und regt somit die

Hydroxylgruppen der Glycerinmatrix an. Durch ein zusätzliches Vakuumfenster wird der Infrarotlaser in die Ionenquelle eingekoppelt und mittels plankonvexen Linsen auf die Probe mit einer Fokusgröße von ca. 250  $\mu\text{m}$ -Durchmesser gerichtet. Mit Hilfe einer CCD-Kamera kann die Probe mit einer optischen Auflösung von bis zu 10  $\mu\text{m}$  betrachtet werden. Die Ionisierung des Analyten in der Quelle erfolgte bei einem Druck von ca. 0,8 mbar in einer Stickstoffatmosphäre. Die Beschleunigungsspannung im Massenanalysator betrug 10 kV. Alle Messungen wurden im Positivionenmodus durchgeführt.



**Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des von Loboda *et al.* [2003] beschriebenen MALDI orthogonal-Flugzeitmassenspektrometers.**

Die Laserdesorption erfolgt bei einem Druck von 0,8 mbar unter Stickstoffatmosphäre. Der Stickstoff dient hierbei als Stoßgas zur Abbremsung sowie Stabilisierung der Analytmoleküle beim MALDI-Prozess (*collisional cooling*). Über einen Quadrupol werden die Ionen fokussiert und in den TOF-Analysator geleitet, in welchem sie senkrecht zu ihrer ursprünglichen Flugbahn beschleunigt und nach ihrem  $m/z$  aufgetrennt werden. Die in der Abbildung angegebenen Drücke entsprechen den Drücken, die zur Durchführung der Experimente im Gerät vorlagen [modifiziert nach LOBODA *et al.*, 2003].

### 2.2.10 Statistische Auswertung

Die densitometrischen Daten aus den Overlay-Assays wurden statistisch mit Hilfe des Programms SPSS 14.0.2 (SPSS, Chicago, Illinois, USA) ausgewertet. Mit diesem Programm lassen sich alle gängigen Methoden der klassischen Statistik (parametrische und nicht-parametrische Testverfahren) auf verschiedene Datensätze anwenden. Zur Auswertung der experimentellen Daten wurden unter den verschiedenen nicht-parametrischen Testverfahren der Vorzeichentest und der Mediantest ausgewählt. Zur Beschreibung von Zusammenhängen wurde die Rangkorrelation  $\tau$  nach Kendall berechnet. In allen Fällen wurde das Signifikanzniveau auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Die Tests waren alle zweiseitig.

#### 2.2.10.1 Vorzeichentest

Der Vorzeichentest wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob sich die Expression der untersuchten GSL-Strukturen im Normalgewebe signifikant von der im Tumorgewebe unterscheidet.

Mit Hilfe des Vorzeichentests lassen sich Vergleiche einfachster Art durchführen. Es handelt sich um einen verteilungsfreien Test für verbundene Stichproben der Form

$$(x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$$

der Zufallsvariablen  $X$  und  $Y$ , welche an  $n$  Merkmalsträgern beobachtet werden. Hierbei umfasst der Begriff Merkmalsträger zum Beispiel ein- und dasselbe Individuum, an dem zu verschiedenen Zeitpunkten Messwerte erhoben werden, oder homogene Paare mit möglichst ähnlichen Eigenschaften. Für jedes Beobachtungspaar wird die Differenz aus beiden Merkmalen gebildet. Somit lässt sich jedem Paar ein positives oder ein negatives Vorzeichen zuordnen. Die Nullhypothese geht davon aus, dass etwa gleich viele negative und positive Differenzen vorliegen, und wird wie folgt definiert:

$$H_0: P(X < Y) = P(X > Y) = 0,5$$

Das Testverfahren verläuft folgendermaßen:

- Zunächst erfolgt die Zuordnung des passenden Vorzeichens an jedes Beobachtungspaar. Paare, deren Stichprobenwerte sich nicht unterscheiden, werden nicht berücksichtigt.
- Die Anzahl der positiven und negativen Vorzeichen wird gezählt. Die kleinere Zahl fungiert als Prüfgröße  $k$ .
- Bei Stichproben mit  $n \geq 20$  ist die Prüfgröße  $k$  unter der Nullhypothese asymptotisch normalverteilt mit dem Erwartungswert  $\mu = n \cdot 0,5$  und der Varianz  $\sigma^2 = n \cdot 0,25$  beziehungsweise der Standardabweichung  $\sigma = \sqrt{n \cdot 0,25}$ . Somit lassen sich für  $\alpha = 0,05$  bei einem zweiseitigen Test die Schranken für den Annahmereich wie folgt berechnen:

$$\mu \pm 1,96$$

beziehungsweise

$$n \cdot 0,5 \pm 1,96 \cdot \sqrt{n \cdot 0,25}$$

Falls die Prüfgröße  $k$  innerhalb des Annahmereichs liegt, muß die Nullhypothese beibehalten werden [GRIESEL UND POSTEL, 1990; DULLER, 2008; WEIß, 2008].

Der Vorzeichentest beinhaltet im Prinzip keine Voraussetzungen, nutzt aber auch bei weitem nicht alle Informationen der Stichprobendaten aus. Somit ist seine Teststärke wesentlich geringer als die vergleichbarer Tests (zum Beispiel dem entsprechenden  $t$ -Test oder dem Wilcoxon-Test). Da bei den alternativen Tests mit größerer Trennschärfe verschiedene Voraussetzungen, wie zum Beispiel eine Normal- ( $t$ -Test) oder zumindest eine gleiche Verteilung (Wilcoxon-Test) der Daten, erfüllt sein müssen [GRIESEL UND POSTEL, 1990; WEIß, 2008], wurde aufgrund der schiefen Verteilung der GSL-Expression in den Geweben ein zweiseitiger Vorzeichentest zur Datenauswertung vorgezogen.

### 2.2.10.2 Mediantest

Der Mediantest wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt, um zu überprüfen, ob sich die GSL-Expression in malignen Geweben, welche unterschiedliche klinisch pathologische Merkmale aufweisen, signifikant unterscheidet.

Mit Hilfe des Mediantestes lassen sich zwei unabhängige Stichproben bezüglich eines ordinal skalierten oder eines quantitativen Merkmals vergleichen. Es wird überprüft, ob sich die beiden Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz unterscheiden beziehungsweise ob die (Mess)daten der einen Stichprobe rangmäßig höher ausfallen als die der anderen. Beim Mediantest werden keine gleichen Verteilungsformen der Zufallsvariablen vorausgesetzt. Er kann somit auch eingesetzt werden, wenn die Verteilungen der Stichproben ungleich oder unbekannt sind. Die Nullhypothese lautet:

$$H_0: \tilde{\mu}_1 = \tilde{\mu}_2$$

$\tilde{\mu}_1$ : Median der Stichprobe 1

$\tilde{\mu}_2$ : Median der Stichprobe 2

Das Testverfahren lässt sich folgendermaßen beschreiben:

- Aus den Daten der beiden Stichproben wird der gemeinsame empirische Median  $\tilde{x}$  ermittelt.
- Innerhalb der beiden Stichproben werden die Werte ausgezählt, welche über beziehungsweise unter dem vereinigten Median liegen, und in eine so genannte Vierfeldertafel eingetragen. Entsprechend der nachfolgenden Vierfeldertafel (Tabelle 2-15) werden die Häufigkeiten ermittelt.

**Tabelle 2-15: Vierfeldertafel beim Median-Test.**

	$\leq \tilde{x}$	$> \tilde{x}$	
Stichprobe 1	$a$	$b$	$n_1 = a + b$
Stichprobe 2	$c$	$d$	$n_2 = a + b$
	$a + c$	$b + d$	$n = a + b + c + d$

- Aus den Häufigkeiten wird folgende Prüfgröße  $\chi^2$  (Chi<sup>2</sup>) errechnet:

$$\chi^2 = \frac{n \cdot (ad - bc)^2}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)} \quad (4)$$

Schließlich vergleicht man die Prüfgröße  $\chi^2$  mit theoretischen Werten  $\chi^2_{f;1-\alpha}$ , welche in entsprechenden Tabellen zu finden sind (siehe Tabelle 2-16). Hierbei stellt  $f$  den so genannten „Freiheitsgrad“ und  $\alpha$  das Signifikanzniveau dar. Der Freiheitsgrad bezeichnet die Anzahl der Werte, welche man frei verändern kann ohne das Gesamtergebnis zu verändern. Im Falle des Mediantests ist der Freiheitsgrad  $f$  gleich 1. Liegt der Wert der Prüfgröße innerhalb des Intervalls  $[0, \chi^2_{f;1-\alpha}]$ , wird die Nullhypothese beibehalten [SCHARLAU, 2000; WEIB, 2008].

**Tabelle 2-16: Quantile der Chi<sup>2</sup>-Verteilung.<sup>1</sup>**

Freiheitsgrad $f$	$\chi^2_{f;0,95}$	$\chi^2_{f;0,99}$
1	3,841	6,635
2	5,991	9,210
3	7,815	11,345
4	9,488	13,277
...	...	...

<sup>1</sup> SCHARLAU, 2000; WEIB, 2008.

### 2.2.10.3 Rangkorrelation $\tau$ nach Kendall

Die nicht-parametrische Rangkorrelation  $\tau$  nach Kendall wurde berechnet, um Aussagen über den Zusammenhang zwischen der GSL-Expression in den Geweben und der anatomischen Ausbreitung (TNM) sowie dem histopathologischen Grading (G) der untersuchten Tumore zu treffen. Kendalls  $\tau$  wurde auch verwendet, um die CD75s- und die iso-CD75s-Gangliosidexpression in den Pankreaskarzinomen zu vergleichen.

Der Rangkorrelationskoeffizient  $\tau$  nach Kendall ist ein Maß für die Stärke eines monotonen Zusammenhangs zweier Merkmale. Er setzt lediglich ordinales Skalenniveau der beiden Merkmale  $X$  und  $Y$ , welche miteinander verglichen werden sollen, voraus. Die Voraussetzung der Normalverteilung wird ebenfalls nicht benötigt. Um den Koeffizienten  $\tau$  zu bestimmen,

ordnet man den (Mess)daten beider Merkmale in aufsteigender Reihenfolge Rangplätze zu. Sobald identische Daten wiederholt auftreten, erhalten sie alle den entsprechenden mittleren Rangplatz. Gleiche Merkmalswerte werden auch als Bindungen bezeichnet. Somit erhält man aus den Zufallsgrößen  $X$  und  $Y$  neue Zufallsgrößen  $R(X)$  und  $R(Y)$ , deren Werte die vergebenen Rangplätze sind.

Zur Berechnung von Kendalls  $\tau$  werden nun ausschließlich die ordinalen Informationen (größer/kleiner-Vergleiche) der Rangreihen verwendet. Dies bedeutet, dass jeweils zwei Realisierungen  $(R(x_i), R(y_i))$  und  $(R(x_j), R(y_j))$  des Paares  $(R(X), R(Y))$  miteinander verglichen werden. Für den Kennwert dieser Realisierung gilt:

$$K_{ij} = \left\{ \begin{array}{ll} +1 & \text{falls mit } R(x_i) < R(y_i) \text{ auch } R(x_j) < R(y_j) \text{ oder} \\ & \text{mit } R(x_i) > R(y_i) \text{ auch } R(x_j) > R(y_j) \text{ gilt} \\ -1 & \text{sonst} \end{array} \right\}$$

wobei  $K_{ij} = K_{ji}$ . Wenn die beiden Rangreihen aus  $n$  Werten bestehen, gibt es genau

$\binom{n}{2} = \frac{1}{2}n(n-1)$  solcher Paare  $\{i, j\}$ . Für jedes dieser Paare  $\{i, j\}$  wird die Größe  $K_{ij}$  bestimmt

und aufsummiert:

$$S = \sum_{i=1}^n \sum_{j>i} K_{ij}$$

Für  $S$  gilt:

$$-\frac{1}{2}n(n-1) \leq S \leq \frac{1}{2}n(n-1)$$

Handelt es sich um einen streng monoton wachsenden Zusammenhang, so nimmt  $S$  die obere Grenze an. Im Falle eines streng monoton fallenden Zusammenhangs zwischen  $X$  und  $Y$

erreicht  $S$  die untere Grenze. Falls zwischen den beiden Merkmalen kein Zusammenhang besteht, ist  $S = 0$ .  $S$  kann somit als Kenngröße des Zusammenhangs zwischen  $R(X)$  und  $R(Y)$  eingesetzt werden. Bei der Bestimmung von Kendalls  $\tau$  wird die Summe  $S$  auf den für Korrelationskoeffizienten typischen Bereich  $[-1, 1]$  normiert, indem sie in Relation zu der höchstmöglichen Summe dieser Art  $S_{max}$ , das sich aus  $\frac{1}{2}n(n-1)$  errechnet, gesetzt wird.

Hiermit ist der Kendall'sche Rangkorrelationskoeffizient folgendermaßen definiert:

$$\tau(X, Y) = \frac{S}{\frac{1}{2}n(n-1)} \quad (5)$$

Liegt eine vollständige Rangleichheit vor, nimmt  $\tau$  den Wert 1 an. Bei vollständiger Rangungleichheit gilt dementsprechend  $\tau = -1$ . Unter der Nullhypothese gilt, dass kein Zusammenhang zwischen  $X$  und  $Y$  besteht. Sie lässt sich wie folgt formulieren:

$$H_0: \tau(X, Y) = 0$$

Unter der Nullhypothese geht man davon aus, dass  $\tau(X, Y)$  asymptotisch normalverteilt ist mit einem Erwartungswert  $\mu$  von 0 und der Varianz  $\sigma_\tau^2 = \frac{2(2n+5)}{9n(n-1)}$ .

Sobald Bindungen auftreten, ist eine Korrektur des Rangkorrelationskoeffizienten  $\tau(X, Y)$  notwendig. In diesem Fall kommen der Wert  $x$  beziehungsweise  $y$  mehr als einmal in einer Stichprobe vor und  $b_x$  beziehungsweise  $b_y$  entsprechen der Anzahl von  $x$ - beziehungsweise  $y$ -Werten, welche zu dieser Bindung gehören, das heißt, die Anzahl der mit  $x$  beziehungsweise  $y$  identischen Messwerte. Die Berechnung der Korrekturformel erfolgt gemäß

$$\tau_{bind}(X, Y) = \frac{S}{\sqrt{\left(\frac{1}{2}n(n-1) - T_x\right)\left(\frac{1}{2}n(n-1) - T_y\right)}} \quad (6)$$

wobei

$$T_x = \frac{1}{2} \sum b_x (b_x - 1) \text{ und } T_y = \frac{1}{2} \sum b_y (b_y - 1)$$

sind.

Da in die Berechnung von Kendalls  $\tau$  lediglich die ordinale Information der Rangreihen eingeht, gilt dieses statistische Testverfahren als relativ unempfindlich gegenüber Datenausreißern. Aus diesem Grund wurde Kendalls  $\tau$  dem etwas häufiger angewandten Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman vorgezogen [WALZ, 2004; WEIß, 2008].

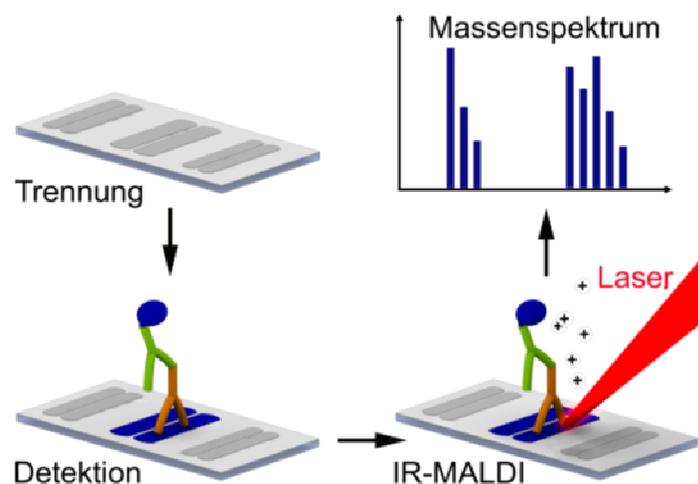
### 3 ERGEBNISSE

Auf der Suche nach tumorassoziierten Glykosphingolipiden (GSL) mit potentiell therapeutischen Hintergrund, galt es sowohl Pankreas- als auch Kolonkarzinomgewebeprobe sowie gesundes Vergleichsgewebe auf die Expression verschiedener GSL-Strukturen zu untersuchen. Teilweise lagen von einigen Gewebeprobe nur wenige Milligramm vor, die zur Analyse eingesetzt werden konnten. Aus diesem Grund musste zunächst die bestehende Analytik optimiert werden, bevor mit den GSL-Expressionsanalysen begonnen werden konnte, um auch noch sehr geringe Probenmengen sowohl immunologisch mit Hilfe der Overlay-Technik als auch strukturell mittels Massenspektrometrie charakterisieren zu können. Meisen *et al.* [2004, 2005] haben eine Methode entwickelt, bei welcher das Kieselgel immungefärbter GSL-Banden nach Entfernung des Plexigum-Fixativs mit Chloroform von der Glasplatte abgekratzt wird. Im Anschluss lassen sich die GSL mit einem definierten Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (30/60/8, v/v/v) aus dem Kieselgel extrahieren und können mittels nanoESI Q-TOF-MS (*nanoelectrospray quadrupole*-TOF-MS) sowie UV-MALDI-TOF-MS strukturell charakterisiert werden. Der Extraktionsschritt ist jedoch meist mit Materialverlust verbunden. Somit fallen geringe Probenmengen, die sich noch schwach mit Hilfe des Overlay-Assays auf der DC-Platte nachweisen lassen, unter die Detektionsgrenze der nanoESI Q-TOF-MS sowie der UV-MALDI-TOF-MS. Deshalb galt es, ein sensitiveres Verfahren zu entwickeln. Hierfür wurde die von Dreisewerd *et al.* [2005] beschriebene Methode, die auf der direkten Kopplung von Dünnschichtchromatographie (DC) und IR-MALDI-o-TOF-MS beruht, weiterentwickelt.

#### 3.1 DC-IR-MALDI-o-TOF-MS

Das seiner Zeit von Dreisewerd *et al.* [2005] entwickelte Verfahren zur massenspektrometrischen Strukturanalyse von GSL direkt auf der DC-Platte beruhte auf dem MS-Nachweis und der Identifizierung von ungefärbten und mit Primulin detektierten GSL, deren Strukturen bekannt waren. In der vorliegenden Arbeit bestand das erste Ziel darin, die DC-Immundetektion mit der IR-MALDI-o-TOF-MS zu kombinieren. Eine schematische Darstellung der Vorgehensweise, immunpositive GSL mittels IR-MALDI-o-TOF-MS direkt

auf der DC-Platte nachzuweisen, ist in Abbildung 3-1 gezeigt. Hierbei wird zunächst nach Durchführung des Overlay-Assays das Plexigum-Fixativ mit Chloroform entfernt. Die DC-Platten werden so zugeschnitten, dass sie in die Ionenquelle des Massenspektrometers passen. Glycerin wird als Flüssigmatrix auf die immungefärbten Banden gegeben. Die Ionisierung des Analyten in der Ionenquelle erfolgt mit Hilfe eines gepulsten IR-Lasers. Die Neuerung besteht nun darin, dass eine Kopplung des DC-Overlay-Assays mit der IR-MALDI-o-TOF-MS möglich ist und die Messung von immungefärbten GSL „*in situ*“ durchgeführt werden kann. Die Strukturanalyse erfolgt ohne Verlust von Probenmaterial direkt auf der DC-Platte unter Umgehung zeitaufwendiger Extraktionsschritte. Durch die Kombination von DC-Immundetektion und IR-MALDI-o-TOF-MS erhält man bei der Analyse von GSL sowohl Informationen über die exakte Konfiguration des Oligosaccharid-Epitops als auch Strukturdaten zur Identifikation der Spezies [DISTLER *et al.*, 2008a].



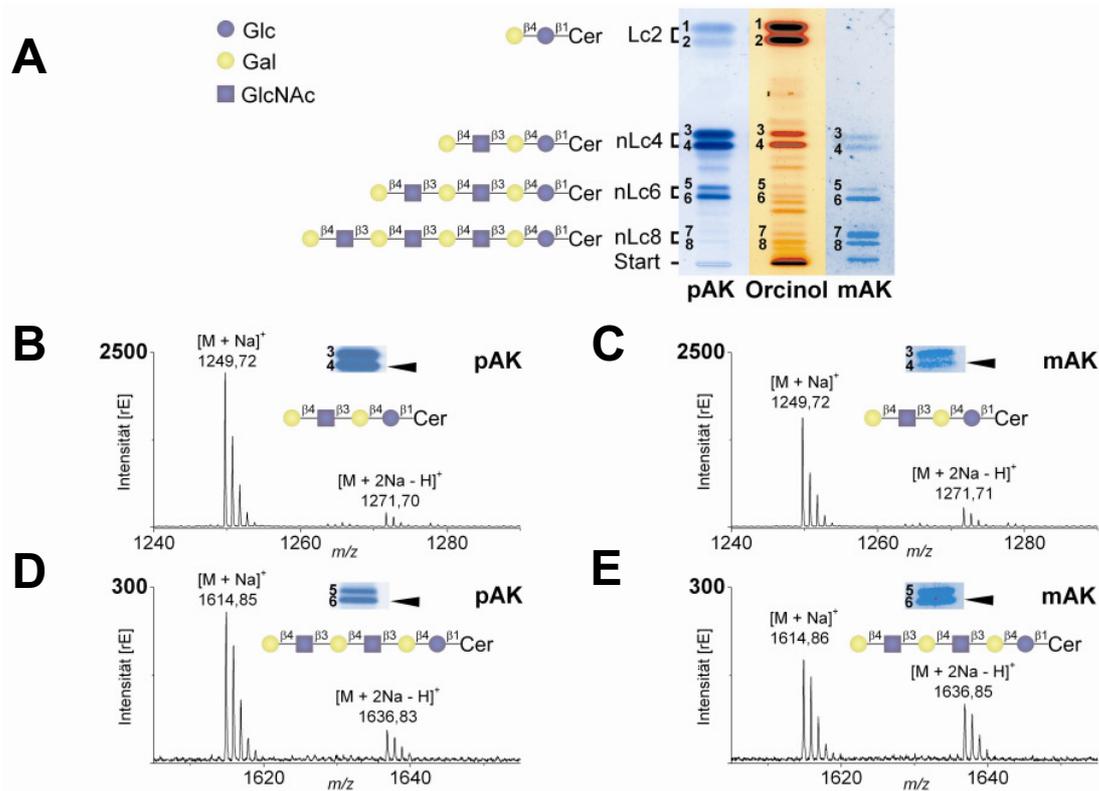
**Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS-Technik zur Charakterisierung von immundetektorierten GSL.**

Nach Trennung der GSL-Mischung mittels DC erfolgt der spezifische Nachweis von GSL gemäß einem ELISA-ähnlichen Verfahren. Der Primärantikörper dient der spezifischen Detektion der Targetstruktur auf der DC-Platte. Mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, an welchen das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist, lässt sich der GSL-Primärantikörperkomplex nach Umsetzung des Substrates (BCIP) visualisieren. Nach der Durchführung des Overlay-Assays wird das Fixativ, welches die MS-Analyse stören würde, mittels Chloroformextraktion entfernt. Nach Auftragen der Flüssigmatrix (Glycerin) wird die DC-Platte in das Massenspektrometer eingebracht. Dort erfolgt zunächst die Desorption und Ionisierung der immundetektorierten GSL direkt aus dem Kieselgel mit Hilfe eines IR-Lasers sowie die anschließende Analyse der Molekülonen im Massenanalysator. Mit Hilfe dieses Kombinationsverfahrens erhält man durch die Kopplung von Antikörperdetektion und Massenspektrometrie sowohl Informationen über die exakte Konfiguration des Oligosaccharid-Epitops als auch Strukturdaten, mit welchen sich die Spezies identifizieren lässt [DISTLER *et al.*, 2008a].

### 3.1.1 Nachweis von immundetektierten GSL

Zunächst wurden neutrale GSL aus humanen Granulozyten mittels DC aufgetrennt und mit Orcinol, einem Reagenz, welches der Detektion von Zuckern dient, angefärbt (siehe Abbildung 3-2A). Die Hauptkomponenten sind Lc2Cer (Banden 1 und 2) sowie die GSL der Neolactoserie nLc4Cer (Banden 3 und 4), nLc6Cer (Banden 5 und 6) und nLc8Cer (Banden 7 und 8) (vergleiche Einleitung, Tabelle 1-8). Die beiden letzteren gehen aus der Verlängerung von nLc4Cer um eine beziehungsweise zwei Gal $\beta$ 4GlcNAc-Einheiten hervor. Da die GSL von Säugern üblicherweise einen konstanten Sphingosinpart (d18:1) besitzen, an welchen jedoch Fettsäuren mit unterschiedlicher Kettenlänge substituiert sind, ergibt sich ein typisches Doppelbandenmuster bei der Auftrennung mittels DC. Hierbei migrieren die Spezies mit den kürzeren Fettsäureketten in der unteren Bande, während die langkettigen, weniger polaren Spezies in der oberen Bande zu finden sind. GSL mit einer C24:0- beziehungsweise einer C24:1-Fettsäure im Ceramidpart werden nicht voneinander getrennt. Beide chromatographieren in der oberen Bande. Der prozentuale Anteil der einzelnen Komponenten aus dem Gesamtgemisch wurde densitometrisch bestimmt (vergleiche Material und Methoden, Abschnitt 2.1.3). Somit lassen sich bei den folgenden Immundetektionen Aussagen über die jeweils eingesetzten Mengen der Einzelkomponenten treffen.

Zur Etablierung der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS von immundetektierten GSL wurden zwei Overlay-Assays durchgeführt. Einer der beiden Assays wurde mit einem polyklonalen Huhn IgY Antikörper (pAK) durchgeführt, während für den anderen ein monoklonaler Maus IgM Antikörper (mAK) zur Detektion der Targetstruktur eingesetzt wurde (vergleiche Material und Methoden, Tabelle 2-5). Wie in Abbildung 3-2A zu sehen ist, bindet der polyklonale Antikörper bevorzugt nLc4Cer und nLc6Cer. Zudem zeigt er eine leichte Kreuzreaktivität mit dem Gal $\beta$ 4Glc-Epitop von Lc2Cer. Der monoklonale Antikörper bindet neben nLc4Cer und nLc6Cer auch sehr stark an nLc8Cer, zeigt aber keine Kreuzreaktivität mit Lc2Cer. Die immungefärbten Analytmoleküle wurden direkt auf der DC-Platte mittels IR-MALDI-o-TOF-MS untersucht. Hierfür wurden im Falle der Immundetektion mit dem polyklonalen Antikörper die Banden 1 bis 8 und im Falle des Overlay-Assays mit dem monoklonalen Antikörper die Banden 3-8 vermessen [DISTLER *et al.*, 2008a]. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. In Abbildung 3-2B-F sind exemplarisch die Messungen der pAK- und mAK- positiven Banden 4 und 6 dargestellt.



**Abbildung 3-2:** (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von immundetektieren neutralen GSL der Neolactoserie.

Neutrale GSL aus humanen Granulozyten wurden mittels DC aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem polyklonalen Huhn IgY (pAK) sowie einem monoklonalen Maus IgM Antikörper (mAK), die beide spezifisch das Epitop Galβ4GlcNAc erkennen. Das zur Durchführung der massenspektrometrischen Analyse auf die DC-Platte aufgetragene Aliquot betrug 3 µg pro Bahn. Strukturen und Abkürzungen der einzelnen GSL, welche von 1-8 durchnummeriert wurden, sind in (A) dargestellt. Die prozentualen Anteile der einzelnen GSL-Spezies des Gesamtgemisches wurden densitometrisch ermittelt (vergleiche Material und Methoden, Abschnitt 2.1.3). Detektierte Molekülionen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der GSL sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. (A) Orcinolfärbung (aufgetragenes Aliquot: 22,5 µg) und DC-Immundetektion (aufgetragenes Aliquot: 0,3 µg). (B) Massenspektrum von pAK-detektiertem nLc4Cer (d18:1, C16:0) (255 ng). (C) Massenspektrum von mAK-detektiertem nLc4Cer (d18:1, C16:0) (255 ng). (D) Massenspektrum von pAK-detektiertem nLc6Cer (d18:1, C16:0) (45 ng). (E) Massenspektrum von mAK-detektiertem nLc6Cer (d18:1, C16:0) (45 ng) [DISTLER *et al.*, 2008a].

Wie in Abbildung 3-2B-E exemplarisch für die pAK- und mAK-gefärbten Banden 4 und 6 von nLc4Cer beziehungsweise nLc6Cer gezeigt, war es möglich, mittels IR-MALDI-o-TOF-MS immundetektierete neutrale GSL der Neolactoserie direkt auf der DC-Platte nachzuweisen. Bei der Messung der pAK-positiven Bande 4 von nLc4Cer wurden ausschließlich einfach geladene, kationisierte nLc4Cer (d18:1, C16:0)-Moleküle bei  $m/z$  1249,72  $[M + Na]^+$  und  $m/z$  1271,70  $[M + 2Na - H]^+$  detektiert (Abbildung 3-2B). Die massenspektrometrische Analyse der mAK-gefärbten Bande 4 von nLc4Cer führte zu demselben Ergebnis (Abbildung 3-2C). Bei der Messung der pAK- und mAK-positiven Bande 3 von nLc4Cer wurden einfach geladene, kationisierte Molekülionen von nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) detektiert (siehe

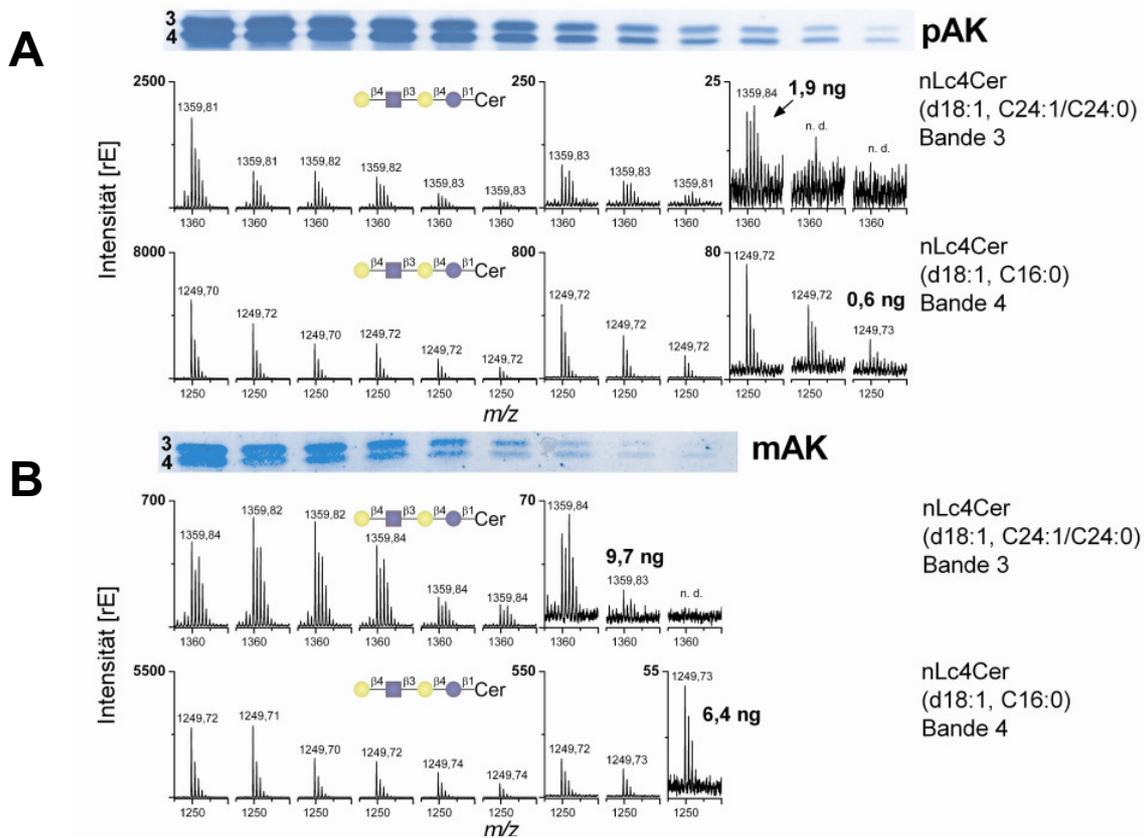
Tabelle 3-1). Die Abbildungen 3-2D und 3-2E zeigen die IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren der nLc6Cer-Spezies in Bande 6 nach Detektion mit dem polyklonalen beziehungsweise monoklonalen Antikörper. In beiden Fällen wurden einfach geladene, kationisierte nLc6Cer (d18:1, C16:0)-Moleküle nachgewiesen. Wie Tabelle 3-1 zu entnehmen ist, konnten bei der Messung der pAK- und mAK- gefärbten Bande 5 von nLc6Cer Molekülonen von nLc6Cer (d18:1, C24:1/C24:0) detektiert werden [DISTLER *et al.*, 2008a].

**Tabelle 3-1: Strukturen und  $m/z$ -Werte der Molekülonen, die bei der Messung von immunpositiven neutralen GSL der Neolactoserie mittels (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS detektiert wurden.<sup>1</sup>**

Bande	Struktur	detektierte Molekülonen	$m/z$ berechnet	$m/z$ detektiert pAK/mAK
1	Lc2Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	996,73	996,74/n.d. <sup>2</sup>
		$[M + 2Na - H]^+$	1018,71	n.d. <sup>2</sup> /n.d. <sup>2</sup>
	Lc2Cer (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	994,72	994,72/n.d. <sup>2</sup>
		$[M + 2Na - H]^+$	1016,70	n.d. <sup>2</sup> /n.d. <sup>2</sup>
2	Lc2Cer (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	884,61	884,60/n.d. <sup>2</sup>
		$[M + 2Na - H]^+$	906,59	906,58/n.d. <sup>2</sup>
3	nLc4Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	1361,86	1361,83/1361,86
		$[M + 2Na - H]^+$	1383,85	1383,80/1383,83
		$[M + Na]^+$	1359,85	1359,82/1359,84
4	nLc4Cer (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	1381,83	1381,80/1381,83
		$[M + Na]^+$	1249,74	1249,72/1249,72
		$[M + 2Na - H]^+$	1271,72	1271,70/1271,71
5	nLc6Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	1727,00	1726,98/1726,97
		$[M + 2Na - H]^+$	1748,98	1748,95/1748,95
		$[M + Na]^+$	1724,98	1724,96/1724,98
6	nLc6Cer (d18:1, C24:1)	$[M + 2Na - H]^+$	1746,96	1746,91/1746,99
		$[M + Na]^+$	1614,87	1614,85/1614,86
		$[M + 2Na - H]^+$	1636,85	1636,83/1636,85
7	nLc8Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	2092,13	2092,10/2092,07
		$[M + 2Na - H]^+$	2114,11	n.d. <sup>2</sup> /2114,06
		$[M + Na]^+$	2090,11	2090,09/2090,07
8	nLc8Cer (d18:1, C24:1)	$[M + 2Na - H]^+$	2112,10	n.d. <sup>2</sup> /2112,05
		$[M + Na]^+$	1980,00	1979,99/1980,00
		$[M + 2Na - H]^+$	2001,99	2001,99/2002,00

<sup>1</sup> vergleiche Abbildung 3-2.

<sup>2</sup> nicht detektiert.



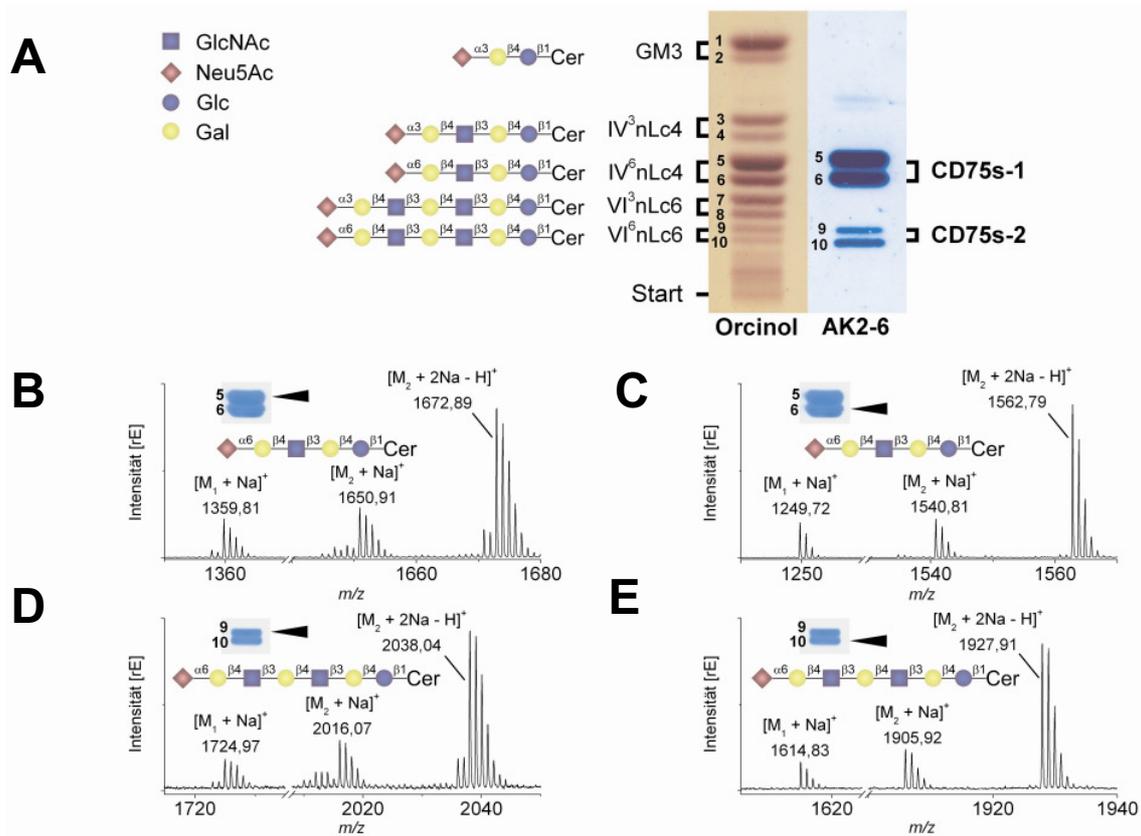
**Abbildung 3-3: Nachweisgrenzen der (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS von pAK- und mAK-immungefärbten nLc4Cer.**

Eine Verdünnungsreihe von neutralen GSL aus humanen Granulozyten (30 ng bis 7,5 ng) wurde auf eine DC-Platte aufgetragen. Im Anschluss erfolgte die Trennung der GSL mittels DC. Die Immundetektion wurde mit dem pAK sowie dem mAK, welche beide spezifisch das Gal $\beta$ 4GlcNAc-Epitop der Neolacto-GSL binden, durchgeführt. **(A)** Nachweisgrenze von pAK-gefärbten nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) (Bande 3) und nLc4Cer-GSL (d18:1, C16:0) (Bande 4). **(B)** Nachweisgrenze von mAK-gefärbten nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) (Bande 3) und nLc4Cer (d18:1, C16:0) (Bande 4) [DISTLER *et al.*, 2008a].

Um die Nachweisgrenze der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe von neutralen GSL aus humanen Granulozyten (30 ng bis 7,5 ng) auf eine DC-Platte aufgetragen. Nach der Trennung der GSL mittels DC wurden die nLc4Cer- und nLc6Cer-Spezies mit dem polyklonalen sowie monoklonalen Antikörper, die das Gal $\beta$ 4GlcNAc-Epitop „erkennen“, immungefärbt und massenspektrometrisch analysiert. Für nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) und nLc4Cer (d18:1, C16:0), die mit dem polyklonalen Antikörper detektiert wurden, lag die Nachweisgrenze der Massenspektrometrie bei 1,9 beziehungsweise bei 0,6 ng (Abbildung 3-3A). Bei der Detektion der beiden nLc4Cer-Spezies mit dem monoklonalen Antikörper ließen sich noch 9,7 (nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0)) beziehungsweise 6,4 ng (nLc4Cer (d18:1, C16:0)) massenspektrometrisch nachweisen. Das Detektionslimit für pAK- und mAK- gefärbte nLc6Cer-Spezies lag ebenfalls im unteren Nanogrammereich und somit in derselben Größenordnung (Daten nicht gezeigt).

Es bleibt festzuhalten, dass mittels kombinierter DC-Immundetektion und IR-MALDI-o-TOF-MS neutrale GSL bis in den niedrigen Nanogrammbereich nachweisbar sind. Des Weiteren ist die Methode im Falle von neutralen GSL, welche mit dem polyklonalen Antikörper detektiert wurden, etwas sensitiver. Eine leicht erhöhte Sensitivität besteht zudem bei der Analyse von GSL mit kurzkettiger Fettsäure, unabhängig davon, ob der Overlay-Assay mit dem polyklonalen oder monoklonalen Antikörper durchgeführt wurde [DISTLER *et al.*, 2008a].

Es wurde als nächstes untersucht, ob sich neben neutralen GSL auch immundetektierbare Ganglioside zur Analyse mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS eignen. Hierfür wurde eine Mischung von Gangliosiden aus humanen Granulozyten [MÜTHING *et al.*, 1993], die sich aus GM3 sowie aus Isomeren von terminal  $\alpha$ 2-6- und  $\alpha$ 2-3-sialylierten nLc4Cer- und nLc6Cer-Spezies zusammensetzt (vergleiche Einleitung, Tabelle 1-9), mittels DC aufgetrennt und mit Orcinol angefärbt (siehe Abbildung 3-4A). Auch in diesem Fall wurden die prozentualen Anteile der einzelnen Komponenten aus dem Gesamtgemisch densitometrisch ermittelt, um bei der Immundetektion Angaben zur eingesetzten Menge der jeweils untersuchten Gangliosidspezies machen zu können (vergleiche Material und Methoden, Abschnitt 2.1.3). Es wurde ein Overlay-Assay mit einem polyklonalen Huhn IgY Antikörper (AK2-6), welcher spezifisch an das Epitop Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 4GlcNAc von CD75s-Gangliosiden bindet, durchgeführt. Wie in Abbildung 3-4A zu sehen ist, werden bei der Immundetektion spezifisch CD75s-Ganglioside erkannt, wohingegen die isomeren  $\alpha$ 2-3-sialylierten iso-CD75s-Ganglioside von dem AK2-6-Antikörper nicht gebunden werden. Die immundetektierbaren CD75s-Ganglioside IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s-1; Banden 5 und 6) sowie VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (CD75s-2; Banden 9 und 10) wurden massenspektrometrisch mit DC-IR-MALDI-o-TOF-MS analysiert [DISTLER *et al.*, 2008a]. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen sind in Abbildung 3-4B-E dargestellt und in Tabelle 3-2 aufgelistet.



**Abbildung 3-4: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von immundetektieren CD75s-Gangliosiden.**

Humane Graunlozyten Ganglioside wurden mittels DC aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem polyklonalen Huhn IgY (AK2-6), der spezifisch das Epitop Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal4GlcNAc von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s-1-Ganglioside) und von VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (CD75s-2-Ganglioside) erkennt. Das zur Durchführung der massenspektrometrischen Analyse auf die DC-Platte aufgetragene Aliquot betrug 7,5  $\mu$ g. Strukturen und Abkürzungen der einzelnen Ganglioside, die von 1-10 durchnummeriert wurden, sind in (A) dargestellt. Die prozentualen Anteile der einzelnen GSL-Spezies des Gesamtgemisches wurden densitometrisch ermittelt (vergleiche Material und Methoden, Abschnitt 2.1.3). Detektierte Molekülionen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der Ganglioside sind in Tabelle 3-2 aufgelistet. Bei allen Messungen konnte eine Abspaltung der terminalen Sialinsäure beobachtet werden. Die entsprechende Struktur wird in den Massenspektren als  $M_1$  bezeichnet. (A) Orcinolfärbung (aufgetragenes Aliquot: 7,5  $\mu$ g) und DC-Immundetektion (aufgetragenes Aliquot: 1,2  $\mu$ g). (B) Massenspektrum von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1) (1,46  $\mu$ g). (C) Massenspektrum von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0) (0,85  $\mu$ g). (D) Massenspektrum von VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:1) (0,26  $\mu$ g). (E) Massenspektrum von VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0) (1,5  $\mu$ g) [DISTLER *et al.*, 2008a].

Bei der massenspektrometrischen Analyse der immunpositiven CD75s-Ganglioside direkt auf der DC-Platte wurden ausschließlich einfach geladene, mit Natrium kationisierte Molekülionen detektiert. Hierbei lagern sich an die monosialylierten Ganglioside bevorzugt zwei Natriumionen an ( $[M + 2Na - H]^+$ ). Protonierte Moleküle traten nicht auf. Bei allen Messungen konnte eine Abspaltung der terminalen Sialinsäure beobachtet werden. Die entsprechenden Strukturen sind in den Massenspektren mit  $M_1$  gekennzeichnet (siehe Abbildung 3-4B-E).

Wie aus Abbildung 3-4B ersichtlich, wurden bei der Messung von Bande 5 einfach geladene Molekülionen von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1) bei  $m/z$  1672,89 [ $M_2 + 2Na - H$ ]<sup>+</sup> und  $m/z$  1650,91 [ $M_2 + Na$ ]<sup>+</sup> detektiert. Bei  $m/z$  1359,81 [ $M_1 + Na$ ]<sup>+</sup> sind nLc4Cer (d18:1, C24:1)-Ionen von desialylierten IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)-Molekülen zu erkennen. Molekülionen von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0) bei  $m/z$  1562,79 [ $M_2 + 2Na - H$ ]<sup>+</sup> und  $m/z$  1540,81 [ $M_2 + Na$ ]<sup>+</sup> konnten bei der massenspektrometrischen Analyse von Bande 6 nachgewiesen werden (Abbildung 3-4C). Auch hier wurde eine Abspaltung der terminalen Sialinsäure beobachtet. Das entsprechende nLc4Cer (d18:1, C16:0)-Molekülion ist bei  $m/z$  1249,72 [ $M_1 + Na$ ]<sup>+</sup> zu erkennen. Bei der Messung der VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer-Spezies (Abbildungen 3-4D und 3-4E) konnten in Bande 9 Molekülionen von VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:1) und in Bande 10 Molekülionen von VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0) nachgewiesen werden. In beiden Fällen dominierten die Ionen, welche durch zweifache Natriumanlagerungen erzeugt wurden. Zudem war eine Abspaltung der terminalen Sialinsäure von VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:1) und VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0) zu beobachten [DISTLER *et al.*, 2008a].

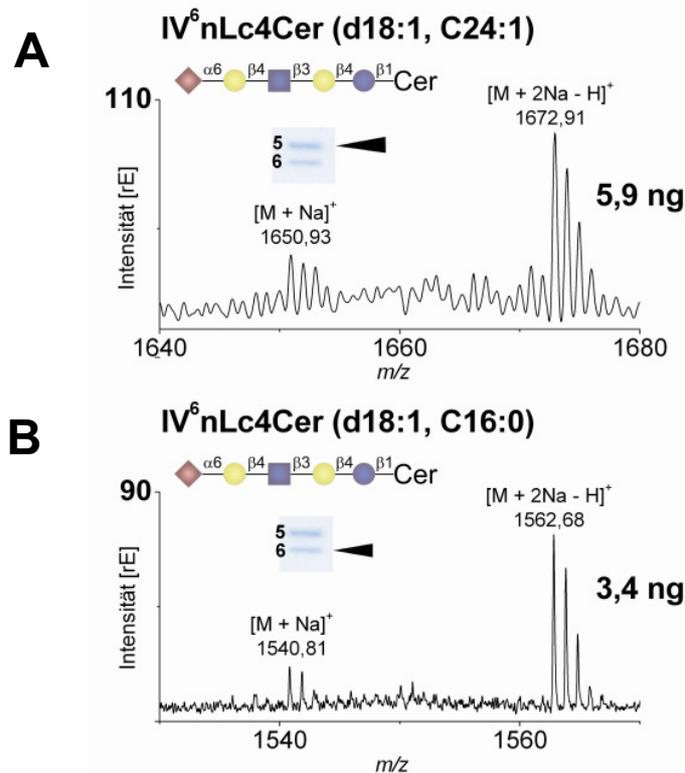
Analog zu dem Overlay-Assay mit dem Antikörper AK2-6 wurde auch eine DC-Immunfärbung mit einem polyklonalen Huhn IgY Antikörper (AK2-3), welcher spezifisch das Epitop Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 4GlcNAc von iso-CD75s-Gangliosiden erkennt, durchgeführt. Bei der Immundetektion konnten die iso-CD75s-Ganglioside IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (iso-CD75s-1; Banden 3 und 4, vergleiche Orcinfärbung Abbildung 3-4A) sowie VI<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (iso-CD75s-2; Banden 7 und 8, vergleiche Orcinfärbung Abbildung 3-4A) nachgewiesen werden. Die  $\alpha$ 2-6-sialylierten Isomere wurden nicht gebunden. Die immungefärbten iso-CD75s-Ganglioside wurden wiederum mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS gemessen [DISTLER *et al.*, 2008a]. Der Overlay-Assay und die Massenspektren sind nicht gezeigt. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse sind in Tabelle 3-2 zusammengestellt. Hierbei ist anzumerken, dass im Gegensatz zu den mit dem AK2-6-Antikörper detektierten  $\alpha$ 2-6-sialylierten Gangliosiden, welche alle eine einfach ungesättigte C24-Fettsäure im Ceramidpart aufwiesen, bei der Analyse der immungefärbten  $\alpha$ 2-3-sialylierten Ganglioside neben IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1) auch die Spezies mit der ungesättigten C24:0-Fettsäure nachgewiesen wurde [DISTLER *et al.*, 2008a].

**Tabelle 3-2: Strukturen und  $m/z$ -Werte der Molekülionen, die bei der Messung von immunpositiven, humanen Granulozyten Gangliosiden mittels (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS detektiert wurden.<sup>1</sup>**

Bande	Struktur	detektierte Molekülionen	$m/z$ berechnet/detektiert
1	GM3 (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	1287,83/1287,82
		$[M + 2Na - H]^+$	1309,81/1309,81
	GM3 (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	1285,81/1285,80
		$[M + 2Na - H]^+$	1307,79/1307,80
2	GM3 (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1175,70/1175,71
3	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	1652,96/1652,95
		$[M + 2Na - H]^+$	1674,94/1674,93
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	1650,94/1650,94
		$[M + 2Na - H]^+$	1672,93/1672,92
4	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1540,84/1540,82
5	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	1650,94/1650,91
		$[M + 2Na - H]^+$	1672,93/1672,89
6	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1540,84/1540,81
		$[M + 2Na - H]^+$	1562,82/1562,79
7	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	2018,09/2018,07
		$[M + 2Na - H]^+$	2040,07/2040,04
	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	2016,08/2016,07
		$[M + 2Na - H]^+$	2038,06/2038,03
8	VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1905,97/1905,95
		$[M + 2Na - H]^+$	1927,95/1927,94
9	VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	2016,08/2016,07
		$[M + 2Na - H]^+$	2038,06/2038,04
10	VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1905,97/1905,92
		$[M + 2Na - H]^+$	1927,95/1927,91

<sup>1</sup> vergleiche Abbildung 3-4.

Analog zu der Vorgehensweise bei den neutralen GSL, wurde auch für die massenspektrometrische Analyse von immundetektieren Gangliosiden mit DC-IR-MALDI-o-TOF-MS die Nachweisgrenze ermittelt. Die Detektionsgrenze lag für IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1) bei 5,9 ng und für IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0) bei 3,4 ng (Abbildung 3-5). Die isomeren Strukturen IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) und IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0) ließen sich noch bis 6,0 und 1,2 ng mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS nachweisen [DISTLER *et al.*, 2008a].



**Abbildung 3-5: Nachweisgrenzen der (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS von immungefärbten CD75s-1-Gangliosiden.**

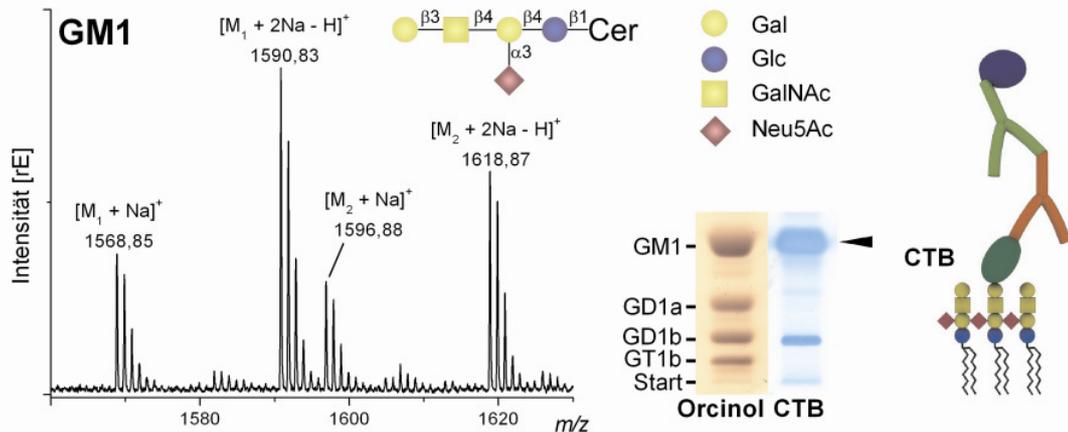
0,03  $\mu$ g einer Gangliosidmischung aus humanen Granulozyten wurde mittels DC aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem polyklonalen Huhn IgY Antikörper (AK2-6), welcher spezifisch das Epitop Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 4GlcNAc erkennt. (A) Nachweisgrenze von  $IV^6$ Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1) (Bande 5). (B) Nachweisgrenze von  $IV^6$ Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0) (Bande 6) [DISTLER *et al.*, 2008a].

### 3.1.2 Nachweis von Toxin- und Lektin-bindenden GSL

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich GSL nach Immundetektion mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern direkt auf der DC-Platte mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS strukturell charakterisieren lassen, wurde geprüft, ob dies auch der Fall ist, wenn zur GSL-Detektion Toxine und Lektine verwendet werden. Hierfür wurden Referenzmischungen von neutralen GSL sowie Gangliosiden mittels DC getrennt. Als Vertreter der Gruppe von Toxinen aus pathogenen Bakterien wurden die Cholera toxin B Untereinheit (CTB) von *Vibrio cholerae* sowie das Shiga Toxin 1 (Stx1) von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* zur Detektion der GSL-Targets eingesetzt. Das hochtoxische *Ricinus communis* Lektin (RCL) diente als repräsentativer Vertreter für Ribosomen-inaktivierende Proteine aus Pflanzen [DISTLER *et al.*, 2008a].

Zunächst wurde ein Overlay-Assay mit CTB, welches das GM1-Gangliosid der Ganglioserie bindet, durchgeführt. Hierfür wurde eine Gangliosidmischung aus Humanhirn mittels DC

aufgetrennt (Strukturen von GM1, GD1a, GD1b und GT1b vergleiche Einleitung, Tabelle 1-9) und GM1 mit Hilfe von CTB/anti-CTB-AK-Immurfärbung detektiert. Das immunpositive GM1 wurde direkt auf der DC-Platte mittels IR-MALDI-o-TOF-MS gemessen.

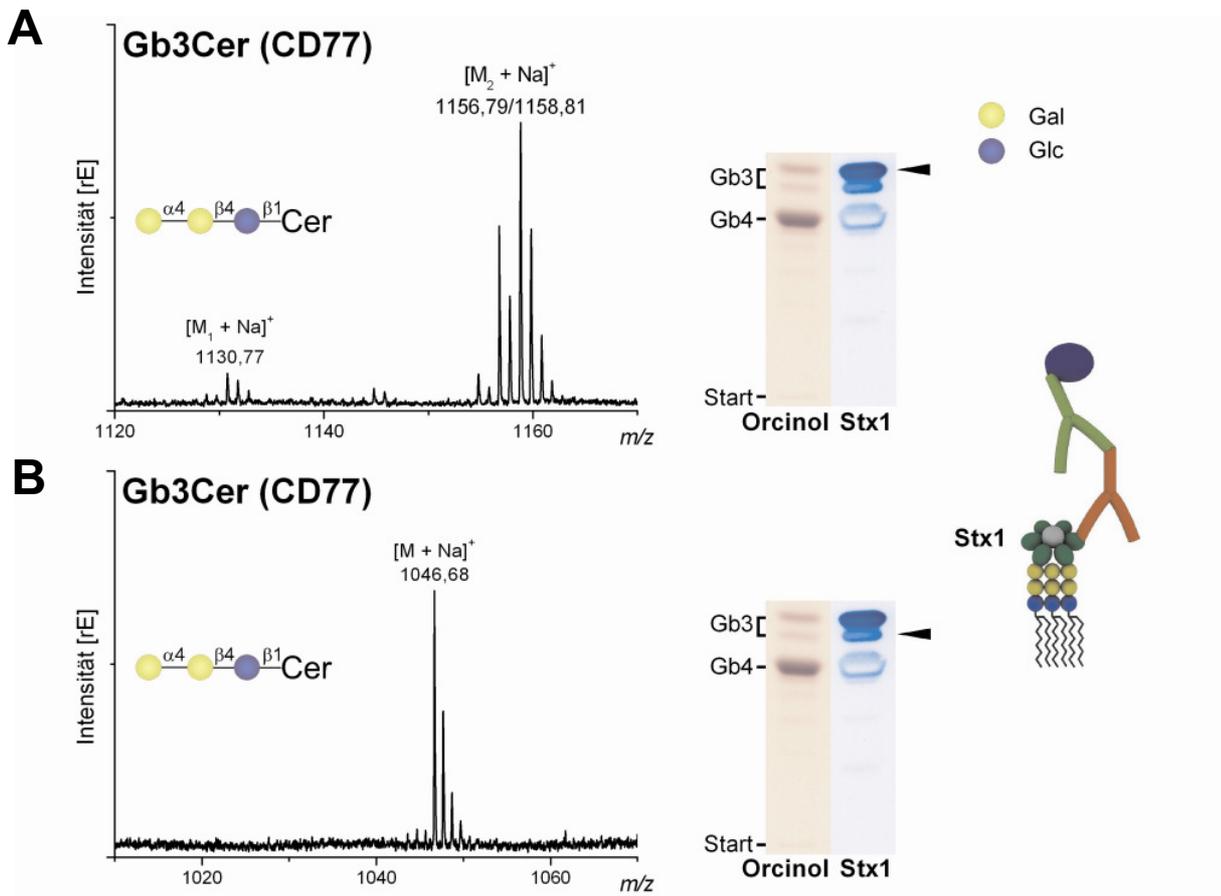


**Abbildung 3-6: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektrum von GM1-Gangliosiden.**

Humane Hirnganglioside wurden mittels DC aufgetrennt und mit Orcinol sowie DC-Overlay-Assay angefärbt. Die zur Durchführung der Orcinol- und Immurfärbung auf die DC-Platte aufgetragenen Aliquots an humanen Hirngangliosiden betragen 20 µg beziehungsweise 2 µg. Die Messung erfolgte nach Immundetektion der GM1-Ganglioside mit CTB/anti-CTB-AK direkt auf der DC-Platte. Es wurden Molekülonen von GM1 (d18:1, C18:0) ( $[M_1 + Na]^+ / [M_1 + 2Na - H]^+$ ) und GM1 (d18:1, C20:0) ( $[M_2 + Na]^+ / [M_2 + 2Na - H]^+$ ) nachgewiesen. Detektierte Molekülonen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der GM1-Ganglioside sind in Tabelle 3-3 aufgelistet [DISTLER *et al.*, 2008a].

Das Ergebnis der Messung von CTB-positiven GM1-Gangliosiden mit IR-MALDI-o-TOF-MS ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Die zugehörigen MS-Daten finden sich in Tabelle 3-3. Bei  $m/z$  1568,85  $[M_1 + Na]^+$  und  $m/z$  1590,83  $[M_1 + 2Na - H]^+$  wurden Molekülonen von GM1 (d18:1, C18:0) nachgewiesen. Neben den Molekülonen der GM1-Spezies mit einer C18:0-Fettsäure konnten auch Molekülonen von GM1 (d18:1, C20:0) bei  $m/z$  1596,88  $[M_2 + Na]^+$  und  $m/z$  1618,87  $[M_2 + 2Na - H]^+$  detektiert werden. Ähnlich wie bei den CD75s-Gangliosiden dominierten auch in diesem Fall die Molekülonen, die durch zweifache Natriumanlagerungen erzeugt wurden [DISTLER *et al.*, 2008a].

Für die DC des Stx1 bindenden Gb3Cer/CD77 wurde eine Mischung von neutralen GSL aus humanen Erythrozyten eingesetzt (Strukturen von Gb3Cer/CD77 und Gb4Cer vergleiche Einleitung, Tabelle 1-8). Nach der Immundetektion von Gb3Cer/CD77 mit Stx1/anti-Stx1-AK erfolgte die massenspektrometrische Analyse der immungefärbten Banden direkt auf der DC-Platte.

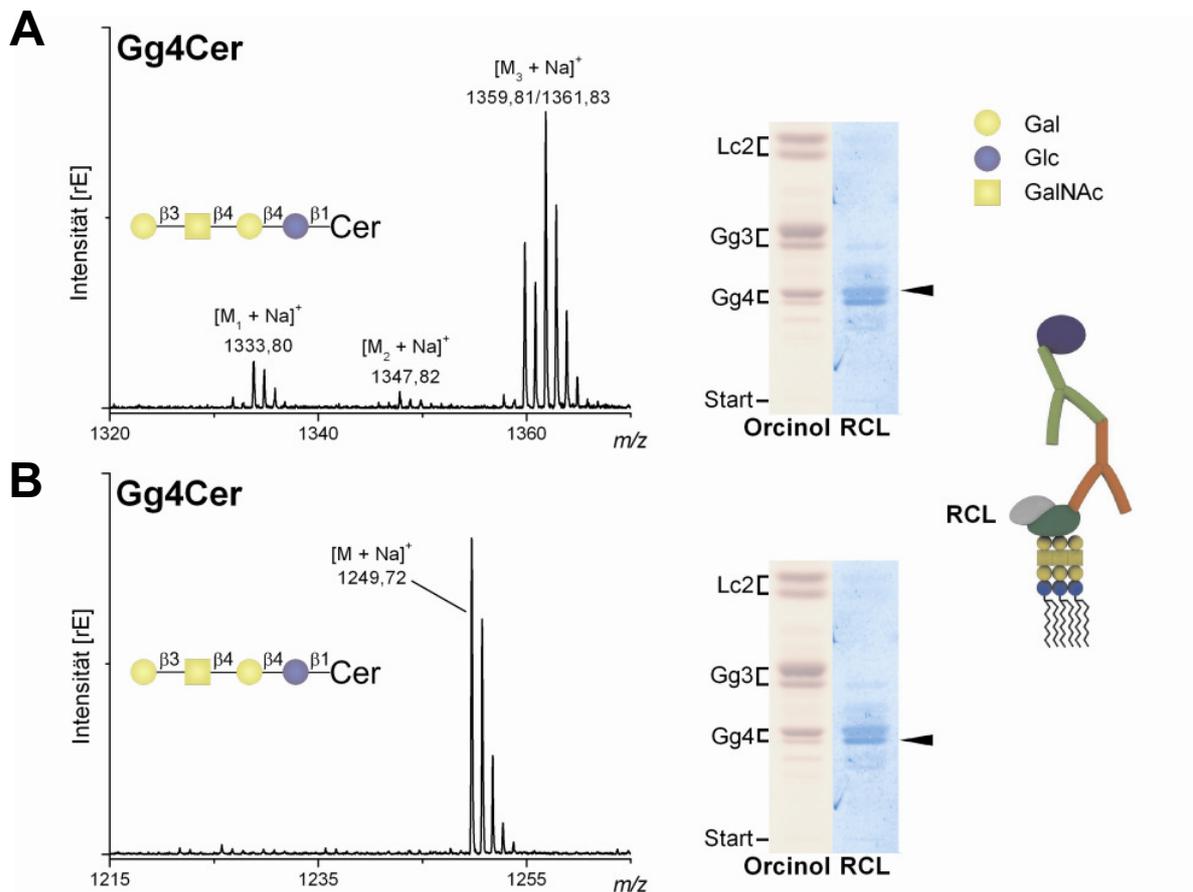


**Abbildung 3-7: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von Gb3Cer/CD77-GSL.**

Neutrale GSL aus humanen Erythrozyten wurden mittels DC aufgetrennt und mit Orcinol sowie DC-Overlay-Assay gefärbt. Die zur Durchführung der Orcinol- und Immunfärbung auf die DC-Platte aufgetragenen Aliquots an humanen Erythrozyten-GSL betragen jeweils 10  $\mu$ g. Die Messung erfolgte nach Immundetektion der Gb3Cer/CD77 mit Stx1/anti-Stx1-AK direkt auf der DC-Platte. Detektierte Molekülonen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der GSL sind in Tabelle 3-3 aufgelistet. **(A)** Massenspektrum von Gb3Cer (d18:1, C22:0) ( $[M_1 + Na]^+$ ) und Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) ( $[M_2 + Na]^+$ ). **(B)** Massenspektrum von Gb3Cer (d18:1, C16:0) [*DISTLER et al., 2008a*].

Wie in Abbildung 3-7A gezeigt und der Tabelle 3-3 zu entnehmen ist, konnten bei der Messung der oberen Stx1-positiven Bande Gb3Cer/CD77-Molekülonen mit C22:0- ( $[M_1 + Na]^+$ ) sowie C24:1/C24:0-Fettsäuren ( $[M_2 + Na]^+$ ) im Ceramidpart detektiert werden. Bei der Analyse der unteren Stx1-positiven Bande mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS wurde die Gb3Cer (d18:1, C16:0)-Spezies nachgewiesen (Abbildung 3-7B) [*DISTLER et al., 2008a*].

RCL bindet mit hoher Affinität an den Gal $\beta$ 3GalNAc-Terminus von neutralen GSL der Ganglioserie. Zur Durchführung der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS von RCL-bindenden GSL wurde zunächst eine Mischung von neutralen GSL, welche als Hauptkomponente Gangliotetraosylceramid (Gg4Cer) enthält, mittels DC aufgetrennt (Strukturen von Lc2Cer, Gg3Cer und Gg4Cer vergleiche Einleitung, Tabelle 1-8). Im Anschluss erfolgten die Immundetektion mit RCL/anti-RCL-AK und die massenspektrometrische Analyse.



**Abbildung 3-8: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von Gg4Cer.**

Eine Mischung aus neutralen GSL wurde mittels DC aufgetrennt und mit Orcinol sowie DC-Overlay-Assay gefärbt. Die zur Durchführung der Orcinol- und Immunfärbung auf die DC-Platte aufgetragenen Aliquots an neutralen GSL betragen jeweils 16  $\mu\text{g}$ . Die Messung erfolgte nach Immundetektion von Gg4Cer mit RCL/anti-RCL-AK direkt auf der DC-Platte. Detektierte Molekülionen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der GSL sind in Tabelle 3-3 aufgelistet. **(A)** Massenspektrum von Gg4Cer (d18:1, C22:0) ( $[M_1 + Na]^+$ ), Gg4Cer (d18:1, C23:0) ( $[M_2 + Na]^+$ ) und Gg4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) ( $[M_3 + Na]^+$ ). **(B)** Massenspektrum von Gg4Cer (d18:1, C16:0) [DISTLER *et al.*, 2008a].

Abbildung 3-8 zeigt das Ergebnis der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS-Messung von RCL-positiven Banden direkt auf der DC-Platte. In Tabelle 3-3 sind die Messdaten aufgelistet. In der oberen immungefärbten Bande wurden einfach geladene, mit Natrium kationisierte Molekülionen von Gg4Cer-Varianten mit C22:0-, C23:0- oder C24:1/C24:0-Fettsäure im Lipidpart bei  $m/z$  1333,80  $[M_1 + Na]^+$ ,  $m/z$  1347,82  $[M_2 + Na]^+$  sowie  $m/z$  1359,81/1361,83  $[M_3 + Na]^+$  detektiert (Abbildung 3-8A). In der unteren Bande konnte die Gg4Cer-Spezies mit C16:0-Fettsäure nachgewiesen werden (Abbildung 3-8B) [DISTLER *et al.*, 2008a].

**Tabelle 3-3: Strukturen und  $m/z$ -Werte der Molekülionen, die bei der Messung von Toxin- und Lektin-detektierten GSL mittels (+)-DC-IR-MALDI-o-TOF-MS nachgewiesen wurden.<sup>1</sup>**

Toxin/Lektin	Struktur	detektierte Molekülionen	$m/z$ berechnet/detektiert
CTB	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer (d18:1, C20:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1596,90/1596,88
	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer (d18:1, C20:0)	[M + 2Na - H] <sup>+</sup>	1618,88/1618,87
	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer (d18:1, C18:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1568,87/1568,85
	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Gg4Cer (d18:1, C18:0)	[M + 2Na - H] <sup>+</sup>	1590,85/1590,83
Stx1	Gb3Cer (d18:1, C24:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1158,79/1158,81
	Gb3Cer (d18:1, C24:1)	[M + Na] <sup>+</sup>	1156,77/1156,79
	Gb3Cer (d18:1, C22:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1130,75/1130,77
	Gb3Cer (d18:1, C16:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1046,66/1046,68
RCL	Gg4Cer (d18:1, C24:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1361,86/1361,83
	Gg4Cer (d18:1, C24:1)	[M + Na] <sup>+</sup>	1359,85/1359,81
	Gg4Cer (d18:1, C23:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1347,85/1347,82
	Gg4Cer (d18:1, C22:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1333,83/1333,80
	Gg4Cer (d18:1, C16:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1249,74/1249,72

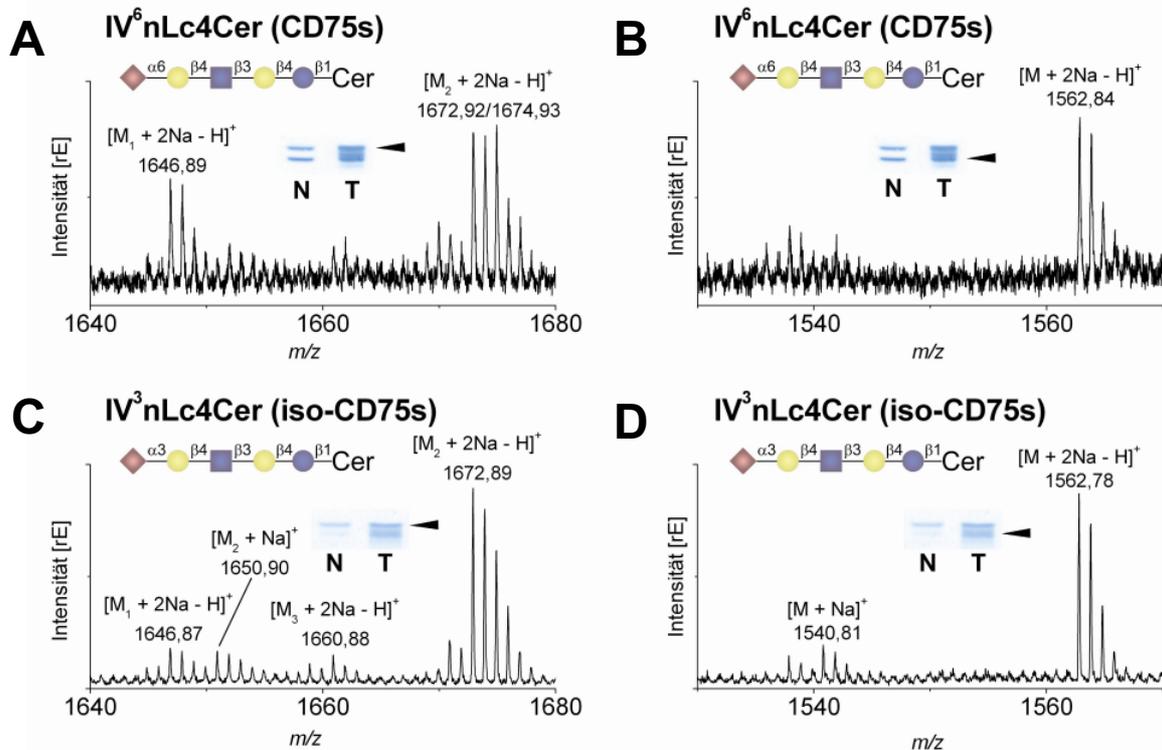
<sup>1</sup> vergleiche Abbildungen 3-6, 3-7 und 3-8.

### 3.1.3 Nachweis von tumorassoziierten GSL aus Geweberohextrakten

Für die strukturelle Charakterisierung von tumorassoziierten GSL aus humanen Gewebeproben wurde eine möglichst sensitive, massenspektrometrische Methode benötigt. Der Grund dafür bestand darin, dass lediglich sehr geringe Mengen an Gewebematerial, welche in einem Bereich von 8,5 -197,5 mg (Pankreas) beziehungsweise 11,17-161,92 mg (Kolon) Gewebefeuchtgewicht lagen, zur Durchführung der GSL-Expressionsanalysen verfügbar waren. Somit galt es zu testen, ob sich die DC-IR-MALDI-o-TOF-MS auch für die Analyse von GSL aus Geweberohextrakten eignet. Um dies zu überprüfen, wurden GSL mit organischen Lösungsmitteln aus Leberkarzinom- und benachbarten, gesunden Vergleichsgewebe extrahiert. Im Anschluss wurden koextrahierte Phospholipide und Triacylglyceride mittels Alkalibehandlung verseift und eine Dialyse zur Entfernung der Salze durchgeführt. Auf weitere arbeitsintensive Aufreinigungsschritte, welche meist mit einem Verlust an Probenmaterial einhergehen, wurde verzichtet.

Zur Durchführung der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS wurden die GSL-Rohextrakte aus Leberkarzinom- und gesundem Kontrollgewebe zweier Lebertumorpatienten eingesetzt. Nach Auftrennung der GSL-Extrakte mittels DC erfolgte die Immundetektion mit dem Antikörper AK2-6 gegen CD75s-Ganglioside (Patient 1) sowie dem Antikörper AK2-3 gegen iso-CD75s-

Ganglioside (Patient 2). Verglichen mit dem gesunden Gewebe (N) war sowohl eine deutlich erhöhte CD75s-1- als auch iso-CD75s-1-Gangliosidexpression in den jeweiligen Tumorgeweben (T) zu beobachten (Abbildung 3-9) [DISTLER *et al.*, 2008a].



**Abbildung 3-9: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von immundetektieren CD75s-1- und iso-CD75s-1-Gangliosiden aus humanen Leberkarzinomgeweben.**

Die Messung erfolgte nach Immundetektion der CD75s- beziehungsweise der iso-CD75s-Ganglioside mit den polyklonalen Huhn IgY Antikörpern AK2-6 und AK2-3 direkt auf der DC-Platte. Das zur Durchführung der massenspektrometrischen Analyse auf die DC-Platte aufgetragene Aliquot an GSL-Rohextrakt entsprach 2 mg Gewebefeuchtgewicht (CD75s-1-Ganglioside) beziehungsweise 3 mg Gewebefeuchtgewicht (iso-CD75s-1-Ganglioside). Detektierte Molekülionen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der Ganglioside sind in Tabelle 3-4 aufgelistet. (A) Massenspektrum von  $IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C24:1/C24:0) ( $[M_2 + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ ) und  $IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C22:0) ( $[M_1 + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ ). (B) Massenspektrum von  $IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C16:0). (C) Massenspektrum von  $IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C24:1) ( $[M_2 + \text{Na}]^+$ ,  $[M_2 + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ ),  $IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C22:0) ( $[M_1 + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ ) und  $IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C23:0) ( $[M_3 + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ ). (D) Massenspektrum von  $IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C16:0) [DISTLER *et al.*, 2008a].

**Tabelle 3-4: Strukturen und  $m/z$ -Werte der Molekülionen, welche mittels (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS von AK2-6- sowie AK2-3-positiven Gangliosiden in Extrakten aus Leberkarzinomgeweben detektiert wurden.<sup>1</sup>**

Patient	Struktur	detektierte Molekülionen	$m/z$ berechnet/detektiert
1	<b>CD75s-1-Ganglioside</b>		
	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:0)	[M + 2Na – H] <sup>+</sup>	1674,94/1674,93
	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)	[M + 2Na – H] <sup>+</sup>	1672,93/1672,92
	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0)	[M + 2Na – H] <sup>+</sup>	1646,91/1646,89
	IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	[M + 2Na – H] <sup>+</sup>	1562,82/1562,84
2	<b>iso-CD75s-1-Ganglioside</b>		
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)	[M + Na] <sup>+</sup>	1650,94/1650,90
		[M + 2Na – H] <sup>+</sup>	1672,93/1672,89
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C23:0)	[M + 2Na – H] <sup>+</sup>	1660,93/1660,88
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0)	[M + 2Na – H] <sup>+</sup>	1646,91/1646,87
	IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1540,84/1540,81
[M + 2Na – H] <sup>+</sup>		1562,82/1562,78	

<sup>1</sup> vergleiche Abbildung 3-9.

Es konnte gezeigt werden, dass die GSL-Analyse direkt auf DC-Platten mittels IR-MALDI-o-TOF-MS nach DC und Immundetektion von GSL aus Lipidhextrakten möglich ist. Patient 1 wies eine deutlich erhöhte CD75s-1-Gangliosidexpression im Tumorgewebe auf (Abbildungen 3-9A und 3-9B). Bei der Analyse der oberen CD75s-1-positiven Bande konnten Molekülionen von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) ([M<sub>2</sub> + 2Na – H]<sup>+</sup>) und IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0) ([M<sub>1</sub> + 2Na – H]<sup>+</sup>) detektiert werden (Abbildung 3-9A). In der unteren immungefärbten Bande waren ausschließlich IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer-Ionen (d18:1, C16:0) ([M + 2Na – H]<sup>+</sup>) nachweisbar (Abbildung 3-9B) [DISTLER *et al.*, 2008a].

Das maligne Gewebe von Patient 2 zeigte im Vergleich zum gesunden Lebergewebe eine starke Überexpression an iso-CD75s-1-Gangliosiden (Abbildungen 3-9C und 3-9D). Mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS konnten in der oberen iso-CD75s-1-positiven Bande Molekülionen von IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer-Gangliosiden mit unterschiedlichen Fettsäuren im Ceramidpart bei  $m/z$  1646,87 (d18:1, C22:0) ([M<sub>1</sub> + 2Na – H]<sup>+</sup>),  $m/z$  1650,90/1672,89 (d18:1, C24:1) ([M<sub>2</sub> + Na]<sup>+</sup>/[M<sub>2</sub> + 2Na – H]<sup>+</sup>) sowie  $m/z$  1660,88 (d18:1, C23:0) ([M<sub>3</sub> + 2Na – H]<sup>+</sup>) detektiert werden (Abbildung 3-9C). Bei der massenspektrometrischen Analyse der unteren immunpositiven Bande wurden IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer-Ionen (d18:1, C16:0) nachgewiesen, wie in Abbildung 3-9D zu sehen ist [DISTLER *et al.*, 2008a].

---

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS um eine sehr sensitive Technik handelt, mit welcher sich auch noch geringe Mengen an GSL in Geweberohextrakten nachweisen lassen. Da die GSL-Analyse von immungefärbten Banden direkt auf der DC-Platte stattfindet, spart der Anwender Zeit sowie aufwendige Aufreinigungsschritte, die immer mit einem Materialverlust verbunden sind. Nachdem also gezeigt werden konnte, dass sich die Technik für die Analyse von GSL aus Geweberohextrakten eignet, wurde mit einer umfassenden GSL-Expressionsanalyse von tumorassoziierten GSL aus malignen Geweben des Gastrointestinaltraktes begonnen.

### **3.2 TUMORASSOZIIERTE GSL IN PANKREAS- UND KOLONTUMOREN**

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der CD75s-, iso-CD75s- und Gb3Cer/CD77-Expressionsanalysen, die mit Lipidrohextrakten aus Pankreas- und Kolonkarzinomgeweben sowie den jeweiligen gesunden Vergleichsgeweben durchgeführt wurden, dargestellt.

Zur Durchführung der GSL-Expressionsanalysen wurde die Zielstruktur zunächst mittels DC von den co-extrahierten Lipiden getrennt und im Anschluss auf der DC-Platte mittels Immundetektion nachgewiesen. Zur Auswertung wurden die immunpositiven Banden densitometrisch quantifiziert. Durch Subtraktion der Extinktionswerte des gesunden Gewebes von den entsprechenden Werten des Tumorgewebes wurde für jede Patientenprobe ein differentieller GSL-Expressionswert ermittelt. Diesen Werten wurden nach folgendem Prinzip Ränge zugeordnet: Rang 1 wurde an den Patienten mit der höchsten, Rang 2 an den Patienten mit der zweithöchsten, usw., und der letzte Rang an den Patienten mit der niedrigsten Expression der jeweils untersuchten GSL-Struktur vergeben. Des Weiteren erfolgte eine Unterteilung der Tumoren in folgende vier Expressionsgruppen:

Gruppe I: stark erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe

Gruppe II: schwach erhöhte GSL-Expression im Tumorgewebe

Gruppe III: gleiche GSL-Expression im Tumor- und im Normalgewebe

Gruppe IV: höhere GSL-Expression im Normalgewebe

Die Untersuchung der CD75s- sowie iso-CD75s-Expression in Pankreaskarzinomgeweben mittels DC-Overlay-Assay erfolgte mit den polyklonalen Huhn IgY Antikörpern AK2-6 und AK2-3 (vergleiche Ergebnisse, Abschnitt 3.1.1). Die DC-Immundetektion zur Analyse der Gb3Cer/CD77-Expression in Pankreas- sowie Kolonkarzinomgeweben wurde mit einem polyklonalen Huhn anti-Gb3Cer/CD77-AK durchgeführt. Zudem erfolgte eine Analyse der Gewebeprobe mittels Stx1/anti-Stx1-AK DC-Overlay-Assay.

Die Expression der verschiedenen GSL-Strukturen wurde auch mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie in Kryoschnitten von Normal- und Tumorgewebeprobe

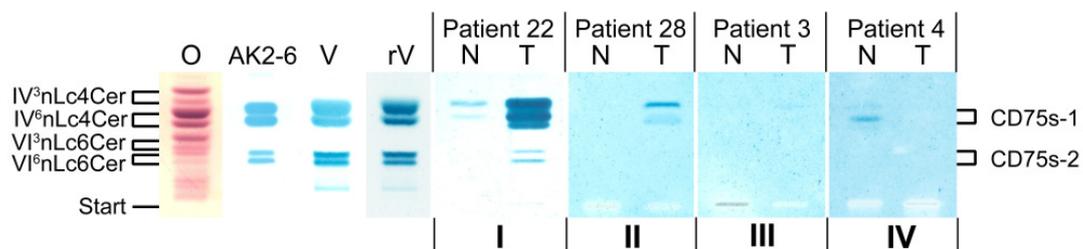
untersucht. Hierbei galt es vor allen Dingen, die Verteilung der verschiedenen GSL im Gewebe zu analysieren. Da bekannt ist, dass CD75s- und iso-CD75s-Ganglioside auch auf Leukozyten und Granulozyten sowie tumorinfiltrierenden Makrophagen exprimiert werden [MACHER *et al.*, 1982; KIGUCHI *et al.*, 1990; MÜTHING *et al.*, 1993; ECSEDY *et al.*, 1998; YOHE *et al.*, 2001], wurde überprüft, ob die Ergebnisse, welche mittels DC-Overlay-Assay erzielt wurden, tatsächlich auf eine erhöhte Expression der Targetstruktur im Tumorgewebe zurückzuführen sind. Die immunfluoreszenzmikroskopische Kontrolle diente dazu, Fehlinterpretationen aufgrund einer erhöhten Präsenz von Granulozyten und/oder Makrophagen im Gewebe zu vermeiden. Hierfür wurden für die Färbungen der Kryoschnitte neben den Antikörpern AK2-6 und AK2-3 zusätzlich die monoklonalen Maus IgG1 Antikörper gegen den Granulozyten-/Makrophagenmarker CD14 sowie den Leukozytenmarker CD45 eingesetzt. Auch beim Nachweis von Gb3Cer/CD77 in Pankreas- und Kolonkarzinomgewebeproben mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Neben dem polyklonalen Huhn anti-Gb3Cer/CD77-AK wurde ein monoklonaler Maus IgG1 Antikörper gegen CD31, einem Marker für Endothelzellen, von denen man weiß, dass sie Gb3Cer/CD77 exprimieren [SCHWEPPE *et al.*, 2008], zur immunohistochemischen Analyse eingesetzt.

Zur Bestätigung der immundetektierten Strukturen sowie zur strukturellen Charakterisierung der einzelnen Spezies wurde anschließend wieder die bereits in Abschnitt 3.1 beschriebene (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS-Technik eingesetzt.

### 3.2.1 CD75s-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen

#### DC-Immundetektion

Insgesamt wurden 38 Pankreaskarzinome (Patientenproben 1-38) auf die Expression von CD75s-Gangliosiden untersucht [DISTLER *et al.*, 2008b]. Die Ergebnisse der CD75s-Gangliosidexpressionsanalyse der Tumoren, ihre Rangzuordnung von 1 bis 38 sowie ihre Einteilung in Expressionsgruppen wird in Tabelle 3-5 gezeigt. In Abbildung 3-10 ist exemplarisch für jede der vier Expressionsgruppen eine DC-Immunfärbung dargestellt.



**Abbildung 3-10: DC-Immundetektion von CD75s-Gangliosiden in Lipidextrakten aus humanen Pankreaskarzinomgeweben (T) und gesunden, normalen Vergleichsgeweben (N).**

Je ein Aliquot der Lipidextrakte aus Tumor- und gesundem Vergleichsgewebe (entsprechend 2 mg Feuchtwicht) wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm in Laufmittel 2 entwickelt. Mit dem polyklonalen Huhn Antikörper AK2-6 wurden die Strukturen IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s-1) und VI<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc6Cer (CD75s-2) nachgewiesen. Die Färbung erfolgte mit BCIP. Exemplarisch für die vier Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 22 (Expressionsgruppe I), Patient 28 (Expressionsgruppe II), Patient 3 (Expressionsgruppe III) sowie Patient 4 (Expressionsgruppe IV) gezeigt (siehe Tabelle 3-5). Als Referenz dienten humane Granulozyten-Ganglioside (HGG). Es wurden 1,5 µg HGG zur Durchführung der Antikörper-vermittelten DC-Immundetektion eingesetzt (AK2-6). Jeweils 10 µg HGG wurden zur Durchführung der Orcinol-färbung (O) sowie der DC-Immundetektion mit Viscumin (V) und rViscumin (rV) auf die DC-Platte aufgetragen [DISTLER *et al.*, 2008b].

Tabelle 3-5: CD75s-Gangliosidexpression in Pankreaskarzinomen.

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G <sup>1</sup>
<b>I</b>	<b>10,5</b>	1	22	2
		2	8	3
		3	2	4
		4	24	3
-----				
<b>II</b>	<b>31,6</b>	5	28	2
		6	25	2
		7	33	2
		8	18	3
		9	23	2
		10	5	3
		11	19	3
		12	12	3
		13	26	X
		14	37	3
		15	1	3
		16	16	2
-----				
<b>III</b>	<b>55,3</b>	17	13	3
		18	6	3
		19	35	2
		20	3	2
		21	36	3
		22	15	2
		23	20	2
		24	21	3
		25	14	3
		29	27	2
		29	30	2-3
		29	32	2
		29	38	2
		29	7	2
		29	10	3
		29	11	2
		33	31	2
34	9	2		
35	34	2		
36	29	2		
37	17	2		
<b>IV</b>	<b>2,6</b>	38	4	2

<sup>1</sup> Histopathologisches Grading, vergleiche Tabelle 1-3. Von den pathologischen Daten ist das Grading für nachfolgende Auswertungen von Relevanz und wird somit in der vorliegenden Tabelle aufgeführt.

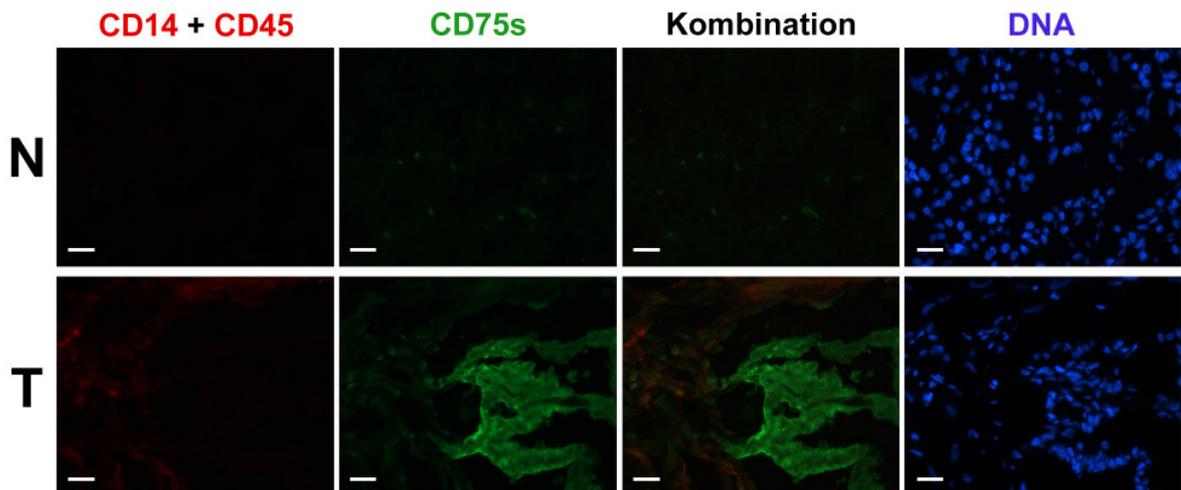
Von den untersuchten Karzinomen (vergleiche Tabelle 3-5) zeigten:

- 4 Tumoren eine starke Überexpression (10,5%)
- 12 Tumoren eine schwache Überexpression (31,6%)
- 21 Tumoren gleiche Expression wie das Normalgewebe (55,3%)
- 1 Tumor eine geringere Expression als das gesunde Gewebe (2,6%).

Somit konnte gezeigt werden, dass in 42,1% der Pankreastumoren eine schwache bis starke Überexpression an CD75s-1-Gangliosiden im Vergleich zu gesundem Gewebe vorlag. Hierbei ist anzumerken, dass in der Mehrzahl der Normalgewebe keine CD75s-1-Ganglioside detektierbar waren. Die gesunden Pankreasgewebe der Patienten 22 und 4 (vergleiche Abbildung 3-10), in welchen eine schwache CD75s-1-Gangliosidexpression nachgewiesen wurde, bilden zwei der wenigen Ausnahmen. Wie am Beispiel von Patient 3 in Abbildung 3-10 dargestellt, wurden in fast allen Tumor- und zugehörigen Vergleichsgeweben der Expressionsgruppe III keine CD75s-1-Ganglioside detektiert. Aufgrund der geringen Menge an Probenmaterial konnten keine zusätzlichen Overlay-Assays mit Viscumin und rViscumin durchgeführt werden (vergleiche Material und Methoden, Tabelle 2-1). Dass der polyklonale Antikörper AK2-6, Viscumin und rViscumin die gleichen Bindungsspezifitäten besitzen, wurde anhand einer Immunfärbung von Referenzgangliosiden aus humanen Granulozyten gezeigt (siehe Abbildung 3-10) [DISTLER *et al.*, 2008b].

### Immunfluoreszenz

Nachfolgend wird am Beispiel von Patient 8 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-5) das immunhistologische Untersuchungsergebnis von gesundem und malignem Pankreasgewebe dargestellt (siehe Abbildung 3-11).



**Abbildung 3-11: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von CD75s-Gangliosiden in Kryoschnitten von gesundem, normalem (N) und malignem Pankreasgewebe (T) des Patienten 8 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-5).**

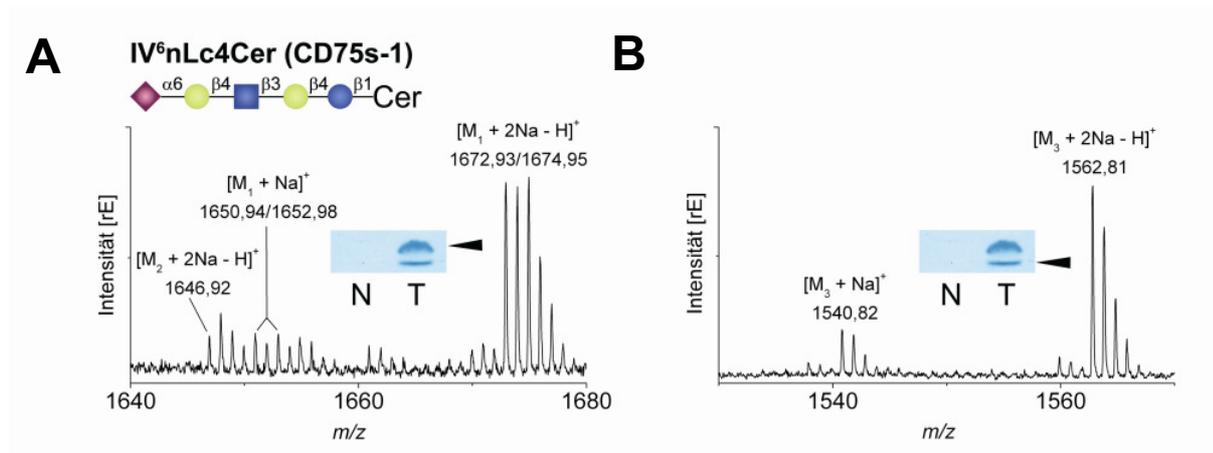
Die Färbung der Schnitte erfolgte mit dem polyklonalen Huhn Antikörper AK2-6 gegen CD75s, sowie monoklonalen Antikörpern aus Maus gegen CD14 und CD45. Die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen. Maßstabsbalken: 20 µm [DISTLER *et al.*, 2008b].

Wie Abbildung 3-11 zu entnehmen ist, zeigten große Teile des Tumorgewebes eine positive CD75s-Gangliosidfärbung. Im Gegensatz hierzu ließen sich im gesunden Gewebe nur sehr vereinzelt CD75s-positive Zellen nachweisen. CD14/45-positive Makrophagen beziehungsweise Leukozyten waren ausschließlich und dann auch nur in geringer Zahl im Tumorgewebe zu finden. Sie zeigten keine bis schwache CD75s-Gangliosid-Färbung. Daraus kann gefolgert werden, dass der Overlay-Assay verlässliche Ergebnisse zur CD75s-Gangliosidexpression in Tumoren lieferte und mit diesem Test keine CD75s-Strukturen von tumorinfiltrierenden Zellen des Immunsystems gemessen wurden.

Nach Extraktion der Lipide aus den Gewebeschnitten mit Methanol und Chloroform/Methanol (1/1, v/v) konnten keine CD75s-Epitope mehr detektiert werden (Daten nicht dargestellt). Dies beweist, dass es sich bei den immundetektierten Strukturen auf den Kryoschnitten um GSL handelt [DISTLER *et al.*, 2008b].

## Massenspektrometrie

Um die immundetkierten Ganglioside im Detail strukturell zu belegen, wurden die gefärbten CD75s-1-Ganglioside direkt auf der DC-Platte mittels IR-MALDI-o-TOF-MS untersucht. Die Ergebnisse werden exemplarisch für Patient 8 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-5 und Abbildung 3-11) in Abbildung 3-12 dargestellt.



**Abbildung 3-12:** (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-Massenspektren von immundetkierten CD75s-1-Gangliosiden aus Pankreaskarzinomgewebe von Patient 8 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-5 und Abbildung 3-11).

Die Messung erfolgte nach Immundetektion der CD75s-1-Ganglioside mit dem Antikörper AK2-6 direkt auf der DC-Platte. Das auf die DC-Platte aufgetragene Aliquot an GSL-Rohextrakt entsprach 2 mg Gewebefeuchtgewicht. Detektierte Molekülonen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der CD75s-1-Ganglioside sind in Tabelle 3-6 aufgelistet. **(A)** Massenspektrum von  $IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C24:1/C24:0) ( $[M_1 + Na]^+$ ,  $[M_1 + 2Na - H]^+$ ) und  $IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C22:0) ( $[M_2 + Na]^+$ ). **(B)** Massenspektrum von  $IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (d18:1, C16:0) ( $[M_3 + Na]^+$ ,  $[M_3 + 2Na - H]^+$ ) [DISTLER *et al.*, 2008b].

**Tabelle 3-6:** Strukturen und  $m/z$ -Werte der mittels (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS detektierten Molekülonen von immungefärbten  $IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ -Spezies aus einem Pankreaskarzinom (Patient 8).<sup>1</sup>

Struktur	detektierte Molekülonen	$m/z$ berechnet/detektiert
$IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	1652,96/1652,98
	$[M + 2Na - H]^+$	1674,94/1674,95
$IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	1650,94/1650,94
	$[M + 2Na - H]^+$	1672,93/1672,93
$IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ (d18:1, C22:0)	$[M + 2Na - H]^+$	1646,91/1646,92
$IV^6\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$ (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1540,84/1540,82
	$[M + 2Na - H]^+$	1562,82/1562,81

<sup>1</sup> vergleiche Abbildung 3-12.

---

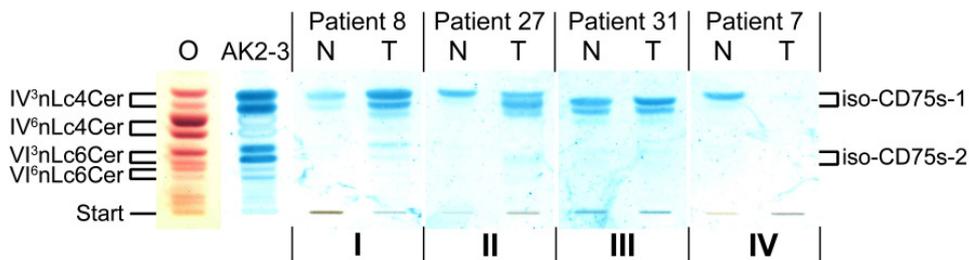
Wie aus Abbildung 3-12 ersichtlich, konnten mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS in der oberen immungefärbten Bande einfach geladene, mit Natrium kationisierte Molekülonen der CD75s-1-Ganglioside IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) ( $[M_1 + Na]^+$ ,  $[M_1 + 2Na - H]^+$ ) und IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0) ( $[M_2 + 2Na - H]^+$ ) detektiert werden (Abbildung 3-12A). Bei der Analyse der unteren CD75s-positiven Bande wurden IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)-Molekülonen nachgewiesen ( $[M_3 + Na]^+$ ,  $[M_3 + 2Na - H]^+$ ) (Abbildung 3-12B) [DISTLER *et al.*, 2008b].

Auch bei der Messung weiterer Patientenproben mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS wurden vornehmlich die CD75s-1-Gangliosidspezies mit der C24:1/C24:0- sowie der C16:0-Fettsäure detektiert (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.2 iso-CD75s-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen

#### DC-Immundetektion

Die 38 Patientenproben, mit denen die CD75s-Gangliosidexpressionsanalyse durchgeführt wurde, wurden auch auf ihren Gehalt an iso-CD75s-Gangliosiden untersucht [DISTLER *et al.*, 2008b]. Die Ergebnisse der iso-CD75s-Gangliosidexpressionsanalyse sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst. Entsprechend ihrer differentiellen Expression erfolgte auch hier die Vergabe von Rängen an die einzelnen Proben sowie die Einteilung in vier Expressionsgruppen. Nachfolgend sind beispielhaft repräsentative Immunfärbungen von Vertretern der einzelnen Gruppen abgebildet.



**Abbildung 3-13: DC-Immundetektion von iso-CD75s-Gangliosiden in Lipidextrakten aus humanen Pankreaskarzinomgeweben (T) und gesundem, normalen Vergleichsgewebe (N).**

Je ein Aliquot der Lipidextrakte aus Tumor- und gesundem Vergleichsgewebe (entsprechend 2 mg Feuchtgewicht) wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm in Laufmittel 2 entwickelt. Mit dem polyklonalen Huhn Antikörper AK2-3 wurden die Strukturen  $IV^3\text{Neu5Ac-nLc4Cer}$  (iso-CD75s-1) und  $VI^3\text{Neu5Ac-nLc6Cer}$  (iso-CD75s-2) nachgewiesen. Die Färbung erfolgte durch Inkubation mit BCIP. Exemplarisch für die vier Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 8 (Expressionsgruppe I), Patient 27 (Expressionsgruppe II), Patient 31 (Expressionsgruppe III) sowie Patient 7 (Expressionsgruppe IV) gezeigt (siehe Tabelle 3-7). Als Referenz dienten humane Granulozyten-Ganglioside (HGG). Es wurden 1,5  $\mu\text{g}$  HGG zur Durchführung der DC-Immundetektion (AK2-3) und 10  $\mu\text{g}$  zur Durchführung der Orcinolfärbung (O) eingesetzt [DISTLER *et al.*, 2008b].

Tabelle 3-7: iso-CD75s-1-Gangliosidexpression in Pankreaskarzinomen.

Expressionssgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G <sup>1</sup>
<b>I</b>	<b>7,9</b>	1	22	2
		2	2	4
		3	8	3
<b>II</b>	<b>57,9</b>	4	23	2
		5	25	2
		6	30	2-3
		7	36	3
		8	11	2
		9	14	3
		10	35	2
		11	3	2
		12	6	3
		13	27	2
		14	16	2
		15	13	3
		16	9	2
		17	5	3
		18	37	3
		19	20	2
		20	19	3
21	28	2		
22	12	3		
23	32	2		
24	21	3		
25	38	2		
<b>III</b>	<b>21,1</b>	26	31	2
		27	15	2
		28	17	2
		29	33	2
		30	1	3
		31	18	3
		32	26	X
33	24	3		
<b>IV</b>	<b>13,2</b>	34	34	2
		35	10	3
		36	4	2
		37	29	2
		38	7	2

<sup>1</sup> Histopathologisches Grading, vergleiche Tabelle 1-3. Von den pathologischen Daten ist das Grading für nachfolgende Auswertungen von Relevanz und wird somit in der vorliegenden Tabelle aufgeführt.

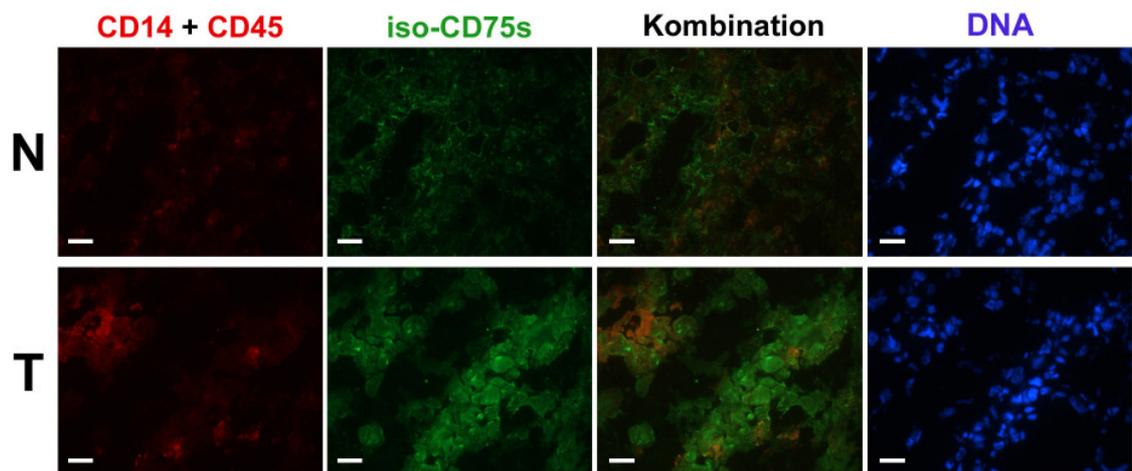
Von den untersuchten Karzinomen (vergleiche Tabelle 3-7) zeigten:

- 3 Tumoren eine starke Überexpression (7,9%)
- 22 Tumoren eine schwache Überexpression (57,9%)
- 8 Tumoren gleiche Expression wie das Normalgewebe (21,1%)
- 5 Tumoren eine geringere Expression als das gesunde Gewebe (13,2%).

Insgesamt konnte somit in 65,8% der Pankreastumoren eine Überexpression an iso-CD75s-1-Gangliosiden im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe festgestellt werden. Im Gegensatz zu den CD75s-1-Gangliosiden (vergleiche Ergebnisse, Abbildung 3-10) ließen sich iso-CD75s-1-Ganglioside mittels DC-Overlay-Technik auch in Normalgeweben nachweisen, wobei die Spezies mit den langkettigen Fettsäuren dominierten (Abbildung 3-13). In den malignen Pankreasgeweben, welche eine erhöhte iso-CD75s-1-Gangliosidexpression zeigten, war vor allen Dingen eine Zunahme von Spezies mit kurzkettigen Fettsäuren (untere der immunpositiven Doppelbanden) auffällig [DISTLER *et al.*, 2008b].

### Immunfluoreszenz

Das Ergebnis des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises von iso-CD75s-Gangliosiden in Kryoschnitten von gesundem und malignem Pankreasgewebe wird exemplarisch für Patient 2 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-7) in Abbildung 3-14 dargestellt.



**Abbildung 3-14: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von iso-CD75s-Gangliosiden in Kryoschnitten von gesundem, normalem (N) und malignem Pankreasgewebe (T) des Patienten 2 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-7).**

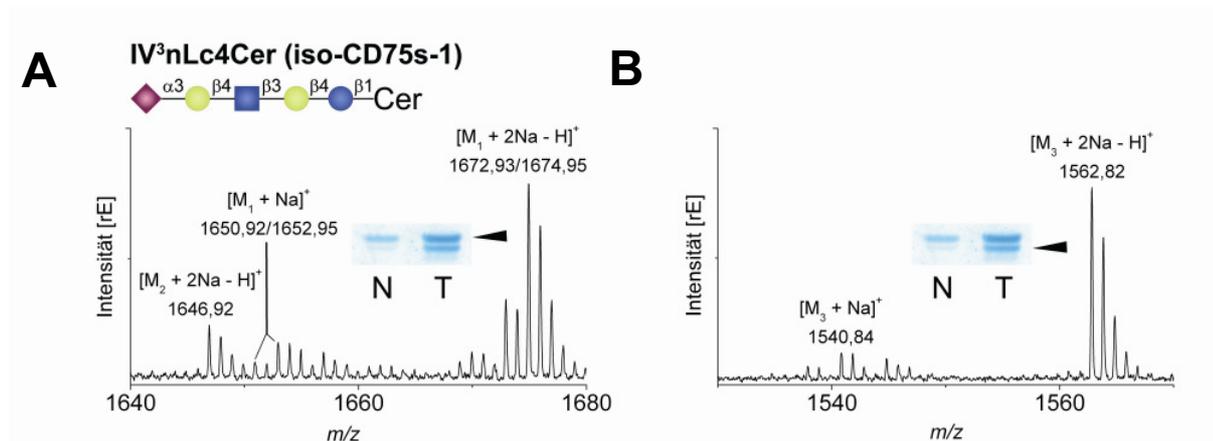
Die Färbung der Schnitte erfolgte mit dem polyklonalen Huhn Antikörper AK2-3 gegen iso-CD75s, sowie monoklonalen Antikörpern aus Maus gegen CD14 und CD45. Die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$  [DISTLER *et al.*, 2008b].

Es konnte eine starke iso-CD75s-Gangliosidexpression im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Auch das gesunde Pankreasgewebe zeigte eine positive iso-CD75s-Gangliosid-Färbung, die allerdings im Vergleich zum Tumorgewebe sehr schwach ausfiel. Im Tumorgewebe waren auch vereinzelt CD14/CD45-positive Makrophagen und Leukozyten zu finden. Diese zeigten jedoch eine verhältnismäßig niedrige iso-CD75s-Gangliosidexpression. Somit kann auch im Falle der iso-CD75s-Ganglioside ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse des Overlay-Assays (vergleiche Abbildung 3-13) durch die Extraktion von iso-CD75s-Gangliosiden aus Granulozyten und Makrophagen verfälscht wurden.

Nach Extraktion der Lipide aus den Kryoschnitten mittels Methanol sowie Chloroform/Methanol (1/1, v/v) ließen sich bei anschließender Immunfärbung keine iso-CD75s-Epitope mehr in den Geweben nachweisen (Daten nicht dargestellt). Somit konnte belegt werden, dass es sich bei den immundetektierten Strukturen um Ganglioside und nicht um Glykoproteine handelt [DISTLER *et al.*, 2008b].

## Massenspektrometrische Analytik

Um die Ergebnisse des Overlay-Assays sowie der Immunfluoreszenz zu verifizieren, wurden die immungefärbten Strukturen mittels IR-MALDI-o-TOF-MS direkt auf der DC-Platte untersucht. Nachfolgend sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse am Beispiel der Patientenprobe 2 (Expressionsgruppe I, Tabelle 3-7) abgebildet.



**Abbildung 3-15: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von immundetektieren iso-CD75s-1-Gangliosiden aus Pankreaskarzinomgewebe von Patient 2 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-7 und Abbildung 3-14).**

Die Messung erfolgte nach Immundetektion der iso-CD75s-1-Ganglioside mit dem polyklonalen Huhn IgY (AK2-3) direkt auf der DC-Platte. Das auf die DC-Platte aufgetragene Aliquot an GSL-Rohextrakt entsprach 2 mg Gewebefeuchtgewicht. Detektierte Molekülonen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der iso-CD75s-1-Ganglioside sind in Tabelle 3-8 aufgelistet. **(A)** Massenspektrum von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) ( $[M_1 + Na]^+$ ,  $[M_1 + 2Na - H]^+$ ) und IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0) ( $[M_2 + Na]^+$ ). **(B)** Massenspektrum von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0) ( $[M_3 + Na]^+$ ,  $[M_3 + 2Na - H]^+$ ) [DISTLER *et al.*, 2008b].

**Tabelle 3-8: Strukturen und  $m/z$ -Werte der mittels (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS detektierten Molekülonen von immungefärbten IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer-Spezies aus einem Pankreaskarzinom (Patient 2).<sup>1</sup>**

Struktur	detektierte Molekülonen	$m/z$ berechnet/detektiert
IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	1652,96/1652,95
	$[M + 2Na - H]^+$	1674,94/1674,95
IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1)	$[M + Na]^+$	1650,94/1650,92
	$[M + 2Na - H]^+$	1672,93/1672,93
IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0)	$[M + 2Na - H]^+$	1646,91/1646,92
IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1540,84/1540,84
	$[M + 2Na - H]^+$	1562,82/1562,82

<sup>1</sup> vergleiche Abbildung 3-15.

Wie Abbildung 3-15 zu entnehmen ist, konnten mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS in der oberen, immunpositiven Bande bei  $m/z$  1650,92/1652,95 und 1672,93/1674,95 sowie bei  $m/z$  1646,92 Molekülen der iso-CD75s-1-Ganglioside IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C24:1/C24:0) ( $[M_1 + Na]^+$ ,  $[M_1 + 2Na - H]^+$ ) und IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C22:0) ( $[M_2 + 2Na - H]^+$ ) detektiert werden (Abbildung 3-15A). Bei der Messung der unteren, immunpositiven Bande wurden ausschließlich kationisierte IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (d18:1, C16:0)-Moleküle bei  $m/z$  1540,84 ( $[M_3 + Na]^+$ ) und  $m/z$  1562,82 ( $[M_3 + 2Na - H]^+$ ) nachgewiesen (Abbildung 3-15B) [DISTLER *et al.*, 2008b].

Die massenspektrometrische Analyse von weiteren Patientenproben führte zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier wurden iso-CD75-Gangliosidspezies, welche entweder eine C24:1, C24:0, C22:0 oder C16:0-Fettsäure im Ceramidpart tragen, detektiert (Daten nicht gezeigt).

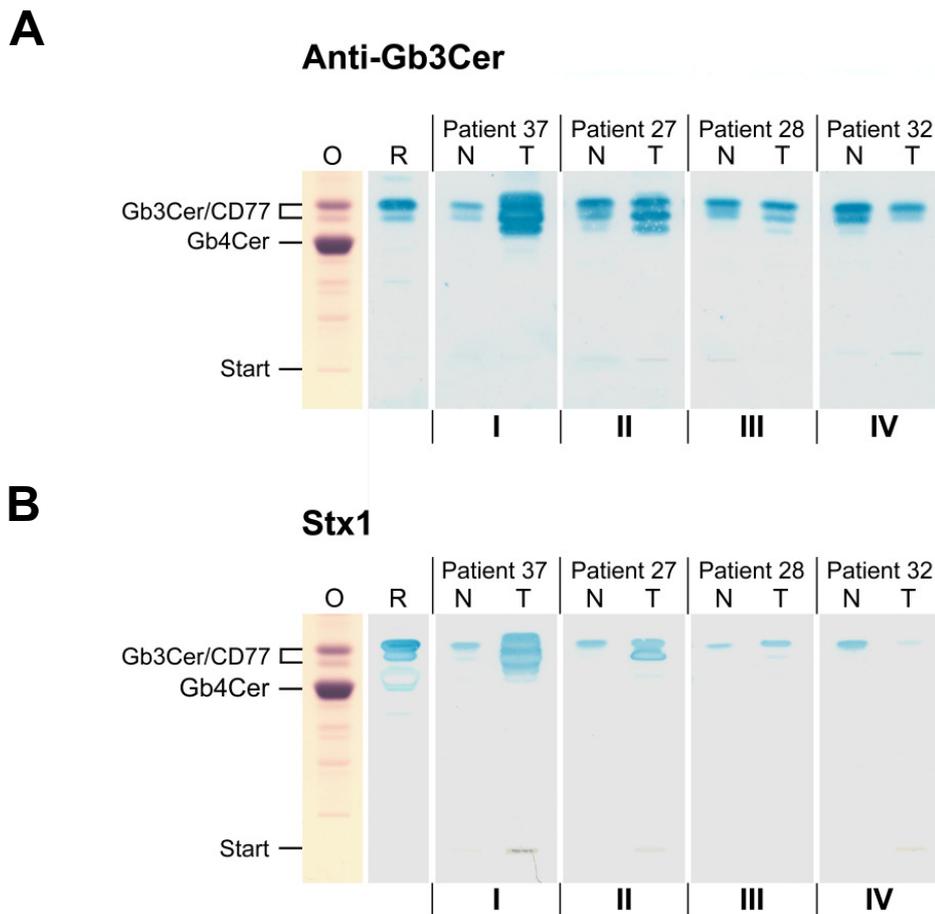
### 3.2.3 Gb3Cer/CD77-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen

#### DC-Immundetektion

Zur Durchführung der Gb3Cer/CD77-Expressionsanalysen wurden lediglich Gewebeproben, die aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Münster bezogen wurden, eingesetzt. Insgesamt handelte es sich hierbei um 21 Pankreaskarzinome sowie die jeweiligen Kontrollgewebe (Patientenproben 22-42), die auf ihre Gb3Cer/CD77-Expression untersucht wurden. Entsprechend den differentiellen Expressionswerten erfolgte die Vergabe von Rängen an die Proben sowie die Zuordnung zu den vier verschiedenen Expressionsgruppen. Die Ergebnisse der Gb3Cer/CD77-Expressionsanalyse sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst. In Abbildung 3-16 sind exemplarisch für jede Expressionsgruppe DC-Immunfärbungen dargestellt, wobei neben der Antikörper-vermittelten Immundetektion (Abbildung 3-16A) auch ein Stx1 Overlay-Assay durchgeführt (Abbildung 3-16B) wurde.

Wie Abbildung 3-16A zu entnehmen ist, zeigte bei der Antikörper-vermittelten DC-Immundetektion ein Teil der Karzinome eine sehr starke Überexpression an Gb3Cer/CD77. Auch im gesunden Gewebe konnte bei allen Proben eine, in manchen Fällen sehr schwache, Gb3Cer/CD77-Expression festgestellt werden. Der Stx1 Overlay-Assay führte zu einem nahezu identischen Ergebnis (Abbildung 3-16B). Allerdings zeigt der Antikörper eine leicht höhere Sensitivität als das Stx1. Somit werden bei der Antikörper-vermittelten Immundetektion auch noch Gb3Cer/CD77-Spezies detektiert, welche in sehr geringen Mengen vorliegen und sich mit Stx1 nicht mehr nachweisen lassen [DISTLER *et al.*, 2009].

Von Gb4Cer ist bekannt, dass es mit sehr geringer Affinität an Stx1 bindet, weshalb es auch als „*low affinity* Stx1-Rezeptor“ [MEISEN *et al.*, 2005] bezeichnet wird. Im Overlay-Assay zeigt das Stx1 eine leichte Reaktivität mit Gb4Cer aus humanen Erythrozyten (vergleiche Stx1 Referenz (R) in Abbildung 3-16B). In den gesunden sowie malignen Pankreasgewebeproben wurde hingegen bei Durchführung des Stx1 Overlay-Assays kein Gb4Cer detektiert [DISTLER *et al.*, 2009].



**Abbildung 3-16: Antikörper- und Stx1-vermittelte DC-Immundetektion von Gb3Cer/CD77 in Lipidextrakten aus humanen Pankreaskarzinomgeweben (T) und gesunden, normalen Vergleichsgeweben (N).**

Je ein Aliquot der Lipidextrakte aus Tumor- und gesundem Vergleichsgewebe (entsprechend 1 mg (anti-Gb3Cer/CD77-AK) beziehungsweise 2 mg Feuchtgewicht (Stx1)) wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm in Laufmittel 1 entwickelt. Die Immundetektion wurde zum einen mit einem polyklonalen Huhn anti-Gb3Cer/CD77-AK (**A**) und zum anderen mit Stx1/anti-Stx1-AK (**B**) durchgeführt. Exemplarisch für die vier Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 37 (Expressionsgruppe I), Patient 27 (Expressionsgruppe II), Patient 28 (Expressionsgruppe III) sowie Patient 32 (Expressionsgruppe IV) gezeigt (siehe Tabelle 3-9). Als Referenz dienten neutrale GSL aus humanen Erythrozyten. Es wurden 10,8 µg der Referenz-GSL-Mischung zur Durchführung der DC-Immundetektion (R) und 16 µg zur Durchführung der Orcinol-färbung (O) eingesetzt [DISTLER *et al.*, 2009].

Tabelle 3-9: Gb3Cer/CD77-Expression in Pankreaskarzinomen.

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G <sup>1</sup>
<b>I</b>	<b>28,6</b>	1	37	3
		2	29	2
		3	30	2-3
		4	24	3
		5	36	3
		6	23	2
<b>II</b>	<b>33,3</b>	7	31	2
		8	27	2
		9	41	3
		10	38	2
		11	35	2
		12	34	2
		13	25	2
<b>III</b>	<b>14,3</b>	14	22	2
		15	28	2
		16	39	3
<b>IV</b>	<b>23,8</b>	17	33	2
		18	40	1
		19	26	X
		20	42	1-2
		21	32	2

<sup>1</sup> Histopathologisches Grading, vergleiche Tabelle 1-3. Von den pathologischen Daten ist das Grading für nachfolgende Auswertungen von Relevanz und wird somit in der vorliegenden Tabelle aufgeführt.

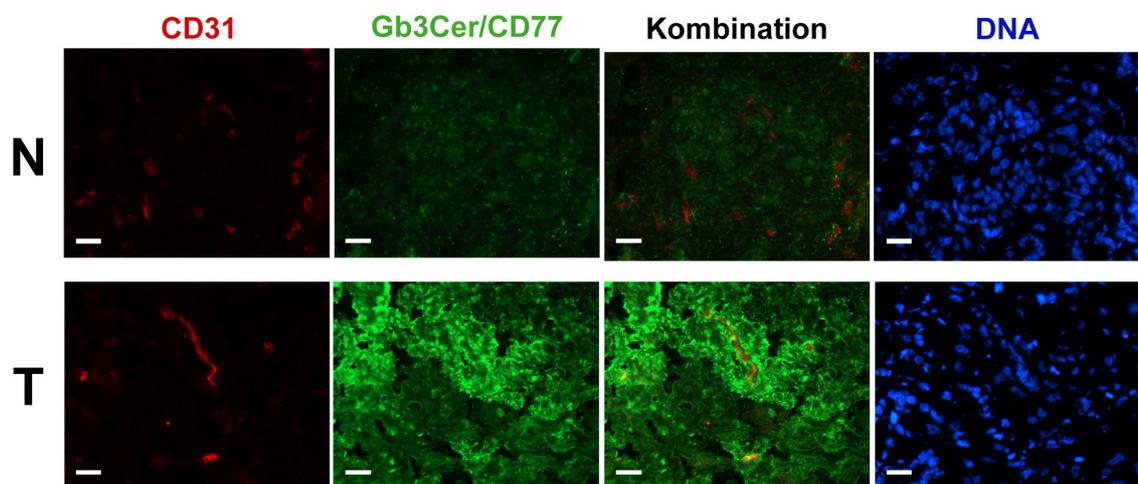
Von den untersuchten Tumoren (vergleiche Tabelle 3-9) zeigten:

- 6 Tumoren eine starke Überexpression (28,6%)
- 7 Tumoren eine schwache Überexpression (33,3%)
- 3 Tumoren gleiche Expression wie das Normalgewebe (14,3%)
- 5 Tumoren eine geringere Expression als das gesunde Gewebe (23,8%).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den untersuchten Pankreasgeweben insgesamt 61,9% eine erhöhte Gb3Cer/CD77-Expression im Tumorgewebe aufwiesen. Die restlichen 39,1% der Tumoren zeigten entweder gleiche oder geringere Gb3Cer/CD77-Expression wie das gesunde Gewebe [DISTLER *et al.*, 2009].

### Immunfluoreszenz

Um die zelluläre Verteilung von Gb3Cer/CD77 zu betrachten, wurden Kryoschnitte von gesundem und malignem Pankreasgewebe mittels Immunfluoreszenz analysiert. Hierfür fand eine Doppelfärbung der Schnitte mit dem polyklonalen Huhn anti-Gb3Cer/CD77-AK sowie einem monoklonalen Maus Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 statt. In Abbildung 3-17 wird am Beispiel von Patient 36 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-9) das Ergebnis der immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse von gesundem und malignem Pankreasgewebe dargestellt.



**Abbildung 3-17: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Gb3Cer/CD77 in Kryoschnitten von gesundem, normalem (N) und malignem Pankreasgewebe (T) des Patienten 36 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-9).**

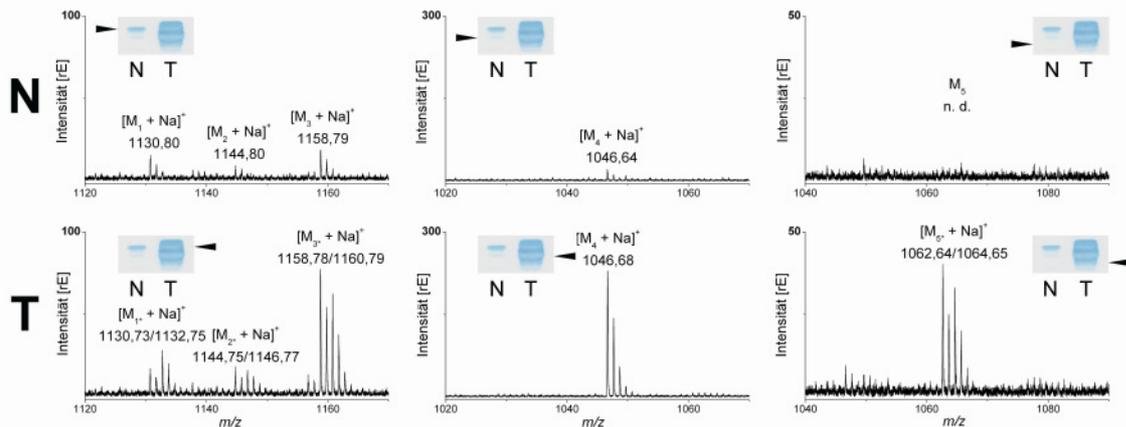
Die Färbung der Schnitte erfolgte mit einem polyklonalen Huhn anti-Gb3Cer/CD77-AK, sowie einem monoklonalen Antikörper aus Maus gegen CD31. Die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$  [DISTLER *et al.*, 2009].

Während das gesunde Pankreasgewebe lediglich vereinzelt schwache Gb3Cer/CD77-Färbung zeigte, konnte im Tumor eine sehr starke Gb3Cer/CD77-Expression nachgewiesen werden. Neben den Gb3Cer/CD77-positiven Tumorzellen befanden sich im malignen Gewebe auch vereinzelt Endothelzellen von Blutgefäßen, die Gb3Cer/CD77 exprimierten.

Dass es sich bei den immundetektierten Strukturen tatsächlich um Gb3Cer/CD77 handelt, konnte durch Extraktion der Lipide mit Methanol und Chloroform/Methanol (1/1, v/v) aus den Schnitten gezeigt werden. Bei der Immunfärbung, die im Anschluss erfolgte, konnten keine CD77-Epitope mehr detektiert werden (Daten nicht dargestellt) [DISTLER *et al.*, 2009].

### Massenspektrometrische Analytik

Der Strukturbeweis für die immundetektieren Gb3Cer/CD77-Moleküle erfolgte mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS. Exemplarisch werden die MS-Daten der Stx1-positiven Banden von Patient 37 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-9) gezeigt. Hierbei wurden sowohl die Gb3Cer/CD77-Varianten des gesunden als auch die des malignen Gewebes untersucht.



**Abbildung 3-18: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von Stx1-detektierten Gb3Cer/CD77-Spezies aus Pankreaskarzinomgewebe (T) und gesundem, normalem Vergleichsgewebe (N) von Patient 37 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-9).**

Die Messung erfolgte nach Immundetektion von Gb3Cer/CD77 mit Stx1/anti-Stx1-AK direkt auf der DC-Platte. Das auf die DC-Platte aufgetragene Aliquot an GSL-Rohextrakt entsprach 2 mg Gewebefeuchtgewicht. Detektierte Molekülonen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der Gb3Cer/CD77-Spezies sind in Tabelle 3-10 aufgelistet. Sowohl für das gesunde (N) als auch für das maligne Gewebe (T) sind (von links nach rechts) die Massenspektren von Gb3Cer (d18:1, C24:0) ( $[M_3 + Na]^+$ ), Gb3Cer (d18:1, C23:0) ( $[M_2 + Na]^+$ ), Gb3Cer (d18:1, C22:0) ( $[M_1 + Na]^+$ ), Gb3Cer (d18:1, C16:0) ( $[M_4 + Na]^+$ ) und von Gb3Cer (d18:1, h16:0) ( $[M_5 + Na]^+$ ) gezeigt. Im Tumorgewebe wurden neben den Spezies mit dem d18:1-Sphinganol auch Spezies mit d18:0-Sphinganol nachgewiesen. Molekülonen, bei denen dies der Fall ist, wurden mit einem Sternchen markiert. Die Spezies mit der Hydroxyfettsäure wurde im Normalgewebe nicht detektiert (n. d.) [DISTLER *et al.*, 2009].

Wie aus Abbildung 3-18 ersichtlich, konnten nach Durchführung des Stx1 Overlay-Assays mittels IR-MALDI-o-TOF-MS verschiedene, einfach mit Natrium kationisierte Gb3Cer/CD77-Spezies direkt auf der DC-Platte nachgewiesen werden. Hierbei wurden im Tumorgewebe Gb3Cer/CD77-Varianten detektiert, die nicht im gesunden Gewebe zu finden waren. Bei der massenspektrometrischen Analyse der oberen Stx1-positiven Bande des Tumorgewebes wiesen dominante Molekülonen ( $[M_3^* + Na]^+$ ) bei  $m/z$  1158,78/1160,79 auf die Gb3Cer/CD77-Spezies (d18:1/d18:0, C24:0) hin, bei denen neben dem einfach ungesättigten d18:1-Sphinganol auch das gesättigte d18:0-Sphinganol im Ceramidpart auftritt. Ähnliches gilt für die Molekülonen bei  $m/z$  1130,73/1132,75 ( $[M_1^* + Na]^+$ ) und  $m/z$  1144,75/1146,77 ( $[M_2^* + Na]^+$ ), die den Gb3Cer/CD77-Spezies (d18:1/18:0, C22:0)

beziehungsweise (d18:1/18:0, C23:0) zuzuordnen sind. Bei der Analyse der oberen immunpositiven Bande des gesunden Gewebes wurden die Molekülonen von Gb3Cer (d18:1, C24:0), Gb3Cer (d18:1, C23:0) und Gb3Cer (d18:1, C22:0) detektiert. In der mittleren Stx1-positiven Bande konnten sowohl im Tumor- als auch im Referenzgewebe kationisierte Gb3Cer (d18:1, C16:0)-Moleküle ( $[M + Na]^+$ ) nachgewiesen werden. Allerdings war das Signal im gesunden Gewebe, verglichen mit dem starken Signal im Tumorgewebe, sehr schwach. Die unterste Stx1-positive Bande weist auf eine Gb3Cer/CD77-Spezies hin, die aufgrund ihres DC-Laufverhaltens polarer sein muss als die anderen Spezies. Bei der massenspektrometrischen Analyse wurden Molekülonen bei  $m/z$  1062,64/1064,65 detektiert. Diese lassen sich den einfach mit Natrium kationisierten Gb3Cer/CD77-Spezies zuordnen, die im Ceramidpart entweder ein d18:1-Sphingenin oder ein d18:0-Sphingamin besitzen, an das jeweils eine hydroxylierte C16:0 Fettsäure gebunden ist. Gb3Cer (d18:1, h16:0) konnte im gesunden Gewebe nicht nachgewiesen werden. Eine Hydroxylierung im Ceramidpart trat bei ca. 85,7% der untersuchten Pankreastumoren auf [DISTLER *et al.*, 2009].

**Tabelle 3-10: Strukturen und  $m/z$ -Werte der mittels DC-IR-MALDI-o-TOF-MS detektierten Molekülonen von Stx1/anti-Stx1-AK-positiven Gb3Cer/CD77-Spezies aus Pankreaskarzinom- und gesundem Vergleichsgewebe (Patient 37).<sup>1</sup>**

Struktur	detektierte Molekülonen	$m/z$ berechnet/detektiert
<b>Normalgewebe (N)</b>		
Gb3Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	1158,79/1158,79
Gb3Cer (d18:1, C23:0)	$[M + Na]^+$	1144,77/1144,80
Gb3Cer (d18:1, C22:0)	$[M + Na]^+$	1130,75/1130,80
Gb3Cer (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1046,66/1046,64
<b>Tumorgewebe (T)</b>		
Gb3Cer (d18:0, C24:0)	$[M + Na]^+$	1160,80/1160,79
Gb3Cer (d18:1, C24:0)	$[M + Na]^+$	1158,79/1158,78
Gb3Cer (d18:0, C23:0)	$[M + Na]^+$	1146,79/1146,77
Gb3Cer (d18:1, C23:0)	$[M + Na]^+$	1144,77/1144,75
Gb3Cer (d18:0, C22:0)	$[M + Na]^+$	1132,77/1132,75
Gb3Cer (d18:1, C22:0)	$[M + Na]^+$	1130,75/1130,73
Gb3Cer (d18:1, C16:0)	$[M + Na]^+$	1046,66/1046,68
Gb3Cer (d18:0, h16:0)	$[M + Na]^+$	1064,67/1064,65
Gb3Cer (d18:1, h16:0)	$[M + Na]^+$	1062,66/1062,64

<sup>1</sup> vergleiche Abbildung 3-18.

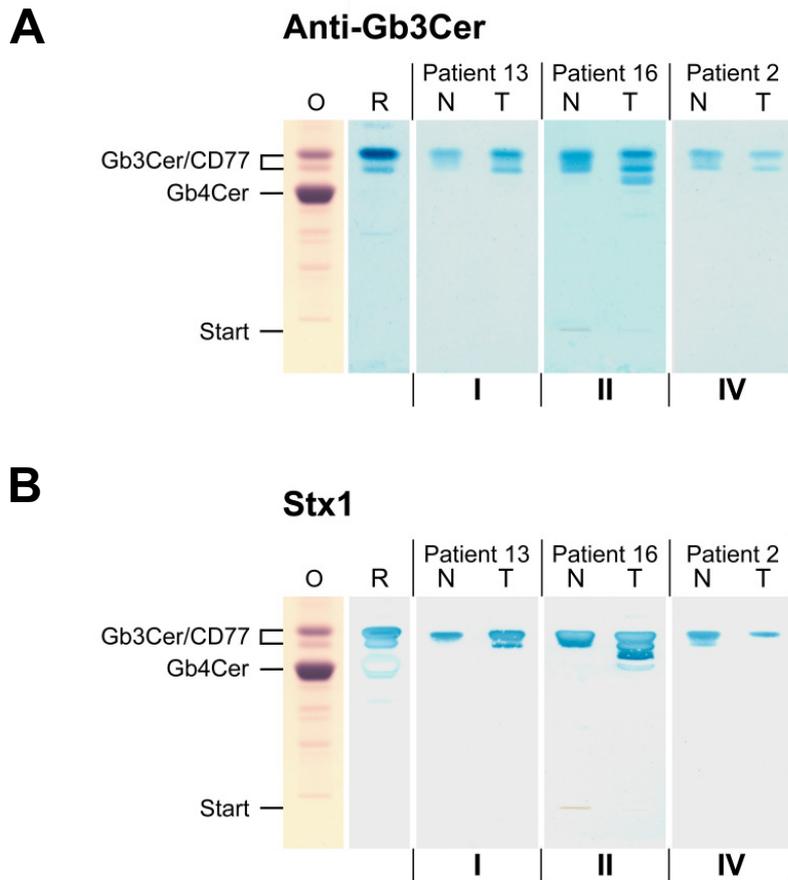
### 3.2.4 Gb3Cer/CD77-Expressionsanalyse in humanen Kolonkarzinomen

#### DC-Immundetektion

Insgesamt wurden 16 Kolonkarzinomgewebeproben auf ihre Gb3Cer/CD77-Expression untersucht. Analog zur Vorgehensweise bei den Pankreaskarzinomen wurden entsprechend ihrer differentiellen Gb3Cer/CD77-Expression Ränge an die Kolonkarzinome vergeben. Des Weiteren wurden die Tumoren den Expressionsgruppen zugeordnet. Die Ergebnisse zur Gb3Cer/CD77-Expression in den 16 untersuchten Kolonkarzinomen sind in Tabelle 3-11 aufgeführt.

Nachfolgend sind beispielhaft DC-Immunfärbungen von Vertretern der einzelnen Expressionsgruppen abgebildet. Der Gb3Cer/CD77-Nachweis erfolgte sowohl mit dem polyklonalen Huhn anti-Gb3Cer/CD77-AK (Abbildung 3-19A) als auch mit Stx1/anti-Stx1-AK (Abbildung 3-19B).

Wie in Abbildung 3-19A demonstriert ist, konnte bei der der Antikörper-vermittelten DC-Immundetektion im Kolonkarzinomgewebe eine starke bis schwache Überexpression an Gb3Cer/CD77 festgestellt werden. Lediglich eine geringe Anzahl an Tumoren wies eine verminderte Gb3Cer/CD77-Expression im Vergleich zum gesunden Kolongewebe auf (siehe auch Tabelle 3-11). In den gesunden Kolongeweben wurde in allen Fällen, teilweise sehr schwach, Gb3Cer/CD77 detektiert. Keiner der untersuchten Kolonkarzinome zeigte eine identische Gb3Cer/CD77-GSL-Expression wie das zugehörige Vergleichsgewebe; somit blieb die Expressionsgruppe III unbesetzt. Das Tumorgewebe wies im Vergleich zum normalen Gewebe entweder eine erhöhte oder eine verminderte Expression an Gb3Cer/CD77 auf. Der Stx1 Overlay-Assay lieferte ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 3-19B). Verglichen mit dem Antikörper ist auch in diesem Fall eine etwas geringere Sensitivität des Stx1 bei der Detektion von Gb3Cer/CD77 zu beobachten. Des Weiteren wurde weder in gesunden noch in malignen Kolongeweben Gb4Cer mittels Stx1 detektiert [DISTLER *et al.*, 2009].



**Abbildung 3-19: Antikörper- und Stx1-vermittelte DC-Immundetektion von Gb3Cer/CD77 in Lipidextrakten aus humanen Kolonkarzinomgeweben (T) und gesunden, normalen Vergleichsgeweben (N).**

Je ein Aliquot der Lipidextrakte (entsprechend 0,5 mg (anti-Gb3Cer/CD77-AK) beziehungsweise 2 mg Feuchtwicht (Stx1)) wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm in Laufmittel I entwickelt. Die Immundetektion wurde zum einen mit einem polyklonalen Huhn anti-Gb3Cer/CD77-AK (**A**) und zum anderen mit Stx1/anti-Stx1-AK (**B**) durchgeführt. Exemplarisch für die verschiedenen Expressionsgruppen sind die DC-Immunfärbungen der Lipidextrakte von Patient 13 (Expressionsgruppe I), Patient 16 (Expressionsgruppe II) und Patient 2 (Expressionsgruppe IV) gezeigt (siehe Tabelle 3-11). Keine der 16 untersuchten Proben zeigte gleiche Gb3Cer/CD77-Expression im gesunden und malignen Gewebe. Aus diesem Grund ist die Expressionsgruppe III nicht besetzt. Als Referenz dienten neutrale GSL aus humanen Erythrozyten. Es wurden 10,8 µg der Referenz-GSL-Mischung zur Durchführung der DC-Immundetektion (R) und 16 µg zur Durchführung der Orcinol-färbung (O) eingesetzt [DISTLER *et al.*, 2009].

Tabelle 3-11: Gb3Cer/CD77-Expression in Kolonkarzinomen.

Expressionsgruppe	Anteil [%]	Rang	Patient	G <sup>1</sup>
<b>I</b>	<b>18,8</b>	1	6	2
		2	8	2
		3	13	2
<b>II</b>	<b>62,5</b>	4	7	3
		5	11	3
		6	16	2
		7	15	2-3
		8	4	3
		9	12	2
		10	1	3
		11	10	2
		12	9	2-3
		13	5	2
<b>IV</b>	<b>18,8</b>	14	2	2
		15	14	2
		16	3	3

<sup>1</sup> Histopathologisches Grading, vergleiche Tabelle 1-3. Von den pathologischen Daten ist das Grading für nachfolgende Auswertungen von Relevanz und wird somit in der vorliegenden Tabelle aufgeführt.

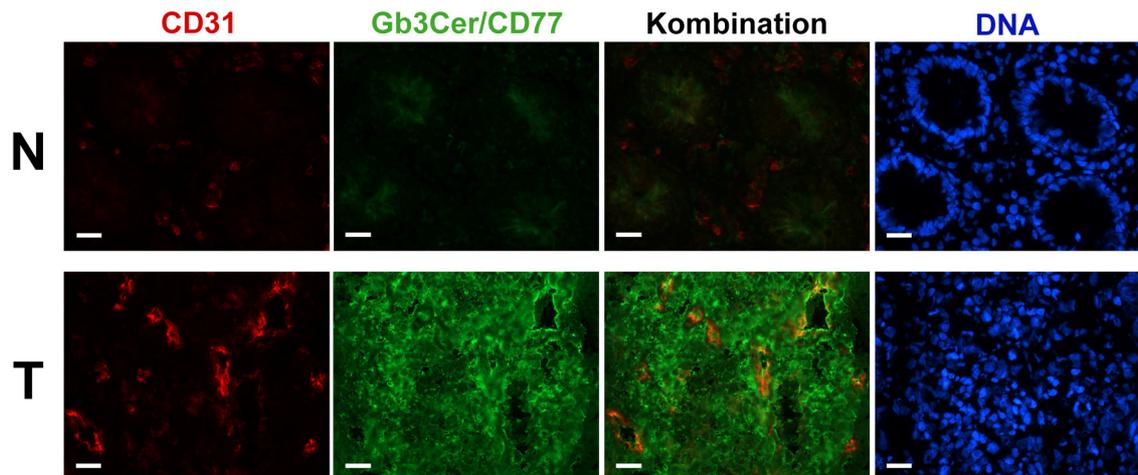
Von den untersuchten Tumoren (vergleiche Tabelle 3-11) zeigten:

- 3 Tumoren eine starke Überexpression (18,8%)
- 10 Tumoren eine schwache Überexpression (62,5%)
- 0 Tumoren gleiche Expression wie das Normalgewebe (0%)
- 3 Tumoren eine geringere Expression als das gesunde Gewebe (18,8%).

Von den untersuchten Kolonkarzinomen wiesen somit insgesamt 81,3% eine erhöhte Gb3Cer/CD77-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe auf [DISTLER *et al.*, 2009].

### Immunfluoreszenz

Die Gb3Cer/CD77-Expression in den Kolonkarzinom- und den gesunden Vergleichsgeweben wurde mittels Immunfluoreszenz überprüft. Am Beispiel von Patient 13 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-11) sind in Abbildung 3-20 die Ergebnisse der Immunhistologie dargestellt.



**Abbildung 3-20: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Gb3Cer/CD77 in Kryoschnitten von gesundem, normalem (N) und malignem Kolongewebe (T) des Patienten 13 (Expressionsgruppe I, vergleiche Tabelle 3-11).**

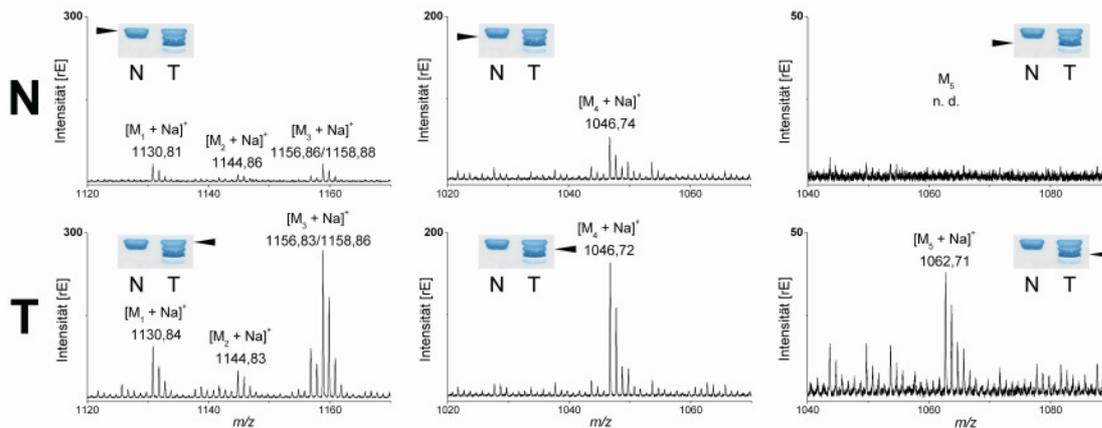
Die Färbung der Schnitte erfolgte mit einem polyklonalen Huhn anti-Gb3Cer/CD77-AK sowie einem monoklonalen Antikörper aus Maus gegen CD31. Die Zellkerne wurden mit DAPI nachgewiesen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$  [DISTLER *et al.*, 2009].

Wie in Abbildung 3-20 deutlich zu erkennen ist, zeigte das Kolonkarzinomgewebe eine sehr starke Gb3Cer/CD77-Färbung. Im Gegensatz dazu konnte im Normalgewebe kein Gb3Cer/CD77 nachgewiesen werden. Im Tumor war zudem die Angiogenese sehr weit fortgeschritten, was anhand der CD31-positiven Endothelzellen zu erkennen ist. Neben den Tumorzellen zeigten auch die Endothelzellen des Karzinoms eine deutliche Gb3Cer/CD77-Expression.

Wiederum wurde mittels Methanol- und Chloroform/Methanol (1:1, v/v)-Extraktion der Nachweis geführt, dass sich die detektierten CD77-Epitope tatsächlich auf Lipiden befinden. Nach der Extraktion konnten bei der anschließenden Immunfärbung keine CD77-Epitope mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was eindeutig ihren Lipidcharakter belegt [DISTLER *et al.*, 2009].

## Massenspektrometrische Analytik

Um die immundetektierten Gb3Cer/CD77-Spezies strukturell zu bestätigen, wurden die Stx1-positiven Banden des Overlay-Assays mittels (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS analysiert. Exemplarisch ist nachfolgend das Ergebnis der Messungen für Patient 16 (Expressionsgruppe II, vergleiche Tabelle 3-11) abgebildet.



**Abbildung 3-21: (+) DC-IR-MALDI-o-TOF Massenspektren von Stx1-detektierten Gb3Cer/CD77-Spezies aus Kolonkarzinomgewebe (T) und gesundem, normalem Vergleichsgewebe (N) von Patient 16 (Expressionsgruppe II, vergleiche Tabelle 3-11).**

Die Messung erfolgte nach Immundetektion von Gb3Cer/CD77 mit Stx1/anti-Stx1-AK direkt auf der DC-Platte. Das auf die DC-Platte aufgetragene Aliquot an GSL-Rohextrakt entsprach 2 mg Gewebefeuchtgewicht. Detektierte Molekülonen,  $m/z$ -Werte sowie Strukturen der Gb3Cer/CD77-Spezies sind in Tabelle 3-12 aufgelistet. Sowohl für das gesunde (N) als auch für das maligne Gewebe (T) sind (von links nach rechts) die Massenspektren von Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) ( $[M_3 + Na]^+$ ), Gb3Cer (d18:1, C23:0) ( $[M_2 + Na]^+$ ), Gb3Cer (d18:1, C22:0) ( $[M_1 + Na]^+$ ), Gb3Cer (d18:1, C16:0) ( $[M_4 + Na]^+$ ) und von Gb3Cer (d18:1, h16:0) ( $[M_5 + Na]^+$ ) gezeigt. Die Spezies mit der Hydroxyfettsäure wurde im Normalgewebe nicht detektiert (n. d.) [DISTLER *et al.*, 2009].

Bei der Messung der Stx1-positiven oberen Bande wurden im Tumor aber auch im Normalgewebe einfach mit Natrium kationisierte Molekülonen der Gb3Cer/CD77-Spezies, bei welchen im Lipidpart die C24:0-, C24:1-, C23:0- oder die C22:0-Fettsäure an das Sphingosin gebunden waren, detektiert (vergleiche Abbildung 3-21, links). Insbesondere das Signal der Gb3Cer (d18:1, C24:0/C24:1)-Molekülonen zeigt im Tumorgewebe eine viel stärkere Intensität als im Normalgewebe. In der mittleren Stx1-positiven Bande wurden im malignen Gewebe bei  $m/z$  1046,72 Gb3Cer (d18:1, C16:0)-Molekülonen ( $[M_4 + Na]^+$ ) nachgewiesen. Gb3Cer (d18:1, C16:0)-Molekülonen konnten auch bei der massenspektrometrischen Analyse der Stx1-positiven unteren Bande des gesunden Gewebes detektiert werden (vergleiche Abbildung 3-21, Mitte). Im Overlay-Assay war bei dem

Tumorgewebe noch eine dritte immungefärbte Bande mit sehr polarem Laufverhalten, ähnlich wie bei den Pankreaskarzinomen, zu erkennen. Molekülonen bei  $m/z$  1062,71 lassen sich der Gb3Cer/CD77-Spezies (d18:1, h16:0), bei der eine C16-Hydroxyfettsäure an das Sphingosin gebunden ist, zuordnen (vergleiche Abbildung 3-21, rechts). Die Gb3Cer/CD77-Spezies (d18:1, h16:0) konnte im gesunden Gewebe nicht detektiert werden. Insgesamt trat diese zusätzliche Hydroxlierung im Ceramidpart bei 18,8% der untersuchten Kolontumoren auf. Sowohl im gesunden als auch im malignen Gewebe war ausschließlich d18:1-Sphinganin zu finden [DISTLER *et al.*, 2009].

**Tabelle 3-12: Strukturen und  $m/z$ -Werte der mittels (+) DC-IR-MALDI-o-TOF-MS detektierten Molekülonen von Stx1/anti-Stx1-AK-positiven Gb3Cer/CD77-Spezies aus Kolonkarzinom- und gesundem Vergleichsgewebe (Patient 16).<sup>1</sup>**

Struktur	detektierte Molekülonen	$m/z$ berechnet/detektiert
<b>Normalgewebe (N)</b>		
Gb3Cer (d18:1, C24:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1158,79/1158,88
Gb3Cer (d18:1, C24:1)	[M + Na] <sup>+</sup>	1156,77/1156,86
Gb3Cer (d18:1, C23:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1144,77/1144,86
Gb3Cer (d18:1, C22:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1130,75/1130,81
Gb3Cer (d18:1, C16:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1046,66/1046,74
<b>Tumorgewebe (T)</b>		
Gb3Cer (d18:1, C24:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1158,79/1158,86
Gb3Cer (d18:1, C24:1)	[M + Na] <sup>+</sup>	1156,77/1156,83
Gb3Cer (d18:1, C23:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1144,77/1144,83
Gb3Cer (d18:1, C22:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1130,75/1130,84
Gb3Cer (d18:1, C16:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1046,66/1046,72
Gb3Cer (d18:1, h16:0)	[M + Na] <sup>+</sup>	1062,66/1062,71

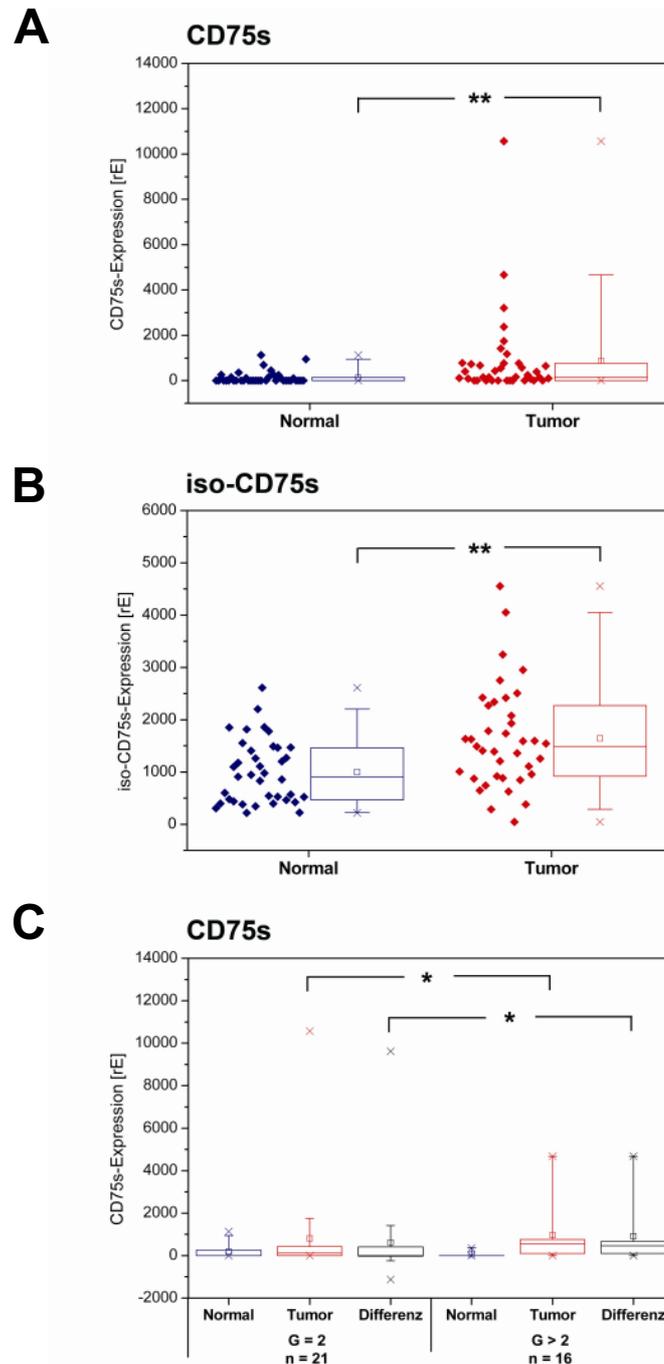
<sup>1</sup> vergleiche Abbildung 3-21.

### 3.3 STATISTISCHE ANALYSE

Es wurden sowohl die CD75s- und iso-CD75s-Expressionsdaten der Pankreaskarzinome als auch die Ergebnisse der Gb3Cer/CD77-Expressionsanalyse von Pankreas- und Kolonkarzinomen statistisch ausgewertet. Mittels Vorzeichentest wurde überprüft, ob die GSL-Expression in Tumor- und Normalgeweben signifikant verschieden ist. Des Weiteren galt es festzustellen, ob sich Tumore mit verschiedenen pathologischen Merkmalen in ihrer GSL-Expression unterscheiden. Hierfür wurde der Mediantest eingesetzt. Die Rang-Korrelation  $\tau$  nach Kendall wurde berechnet, um Aussagen über den Zusammenhang zwischen der GSL-Expression und den verschiedenen klinischen Parametern zu treffen. Kendalls  $\tau$  wurde auch eingesetzt, um zu prüfen, ob eine Korrelation zwischen der Expression von CD75s-1- und iso-CD75s-1-Gangliosiden in Pankreaskarzinomen vorliegt. Alle Tests waren zweiseitig, und das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

#### 3.3.1 CD75s-1 und iso-CD75s-1-Gangliosidexpression in humanen Pankreaskarzinomgeweben

Nachfolgend sind die densitometrischen Daten der CD75s- und iso-CD75s-Expressionsanalysen in Box-and-Whisker-Plots (kurz Boxplots) dargestellt (Abbildung 3-22). Dabei werden die einzelnen Stichproben durch eine rechteckige Box repräsentiert, welche unten und oben vom 1. beziehungsweise 3. Quartil begrenzt wird. Unter dem 1. Quartil befinden sich 25% und unter dem 3. Quartil 75% der Datenpunkte. Innerhalb der Box befindet sich, durch einen Strich gekennzeichnet, der Median. Ein kleines Quadrat in der Box markiert das arithmetische Mittel. Neben dem arithmetischen Mittel ist der Median ein Maß für die zentrale Tendenz der Verteilung. Der Median ist jedoch weniger empfindlich gegenüber Ausreißern als das arithmetische Mittel. Je weiter der Mittelwert und der Median voneinander entfernt sind, desto schief ist die Verteilung. Die von der Box ausgehenden Striche (so genannte *whiskers*) zeigen die 5%- und 95%-Perzentile. Die Maxima und Minima der Verteilungen sind durch Kreuze gekennzeichnet.



**Abbildung 3-22: Boxplots der CD75s-1 (A) und iso-CD75s-1-Gangliosidexpression (B) in Normal- und Tumorgewebe des Pankreas (n = 38 Patienten).**

Die Boxen der Stichproben werden unten und oben von den 25%- sowie 75%-Perzentilen begrenzt. Die Linie in der Box kennzeichnet den Median und das Quadrat das arithmetische Mittel. Die beiden Kreuze markieren den höchsten beziehungsweise den niedrigsten Datenpunkt. Sowohl die CD75s-1 als auch die iso-CD75s-1-Gangliosidexpression in den malignen Geweben unterscheidet sich hoch signifikant von der Gangliosidexpression in den gesunden Geweben (\*\*,  $P = 0,001$ ). (C) Korrelation zwischen der CD75s-1-Gangliosidexpression und dem Differenzierungsgrad (G) (n = 37 Patienten; von Patient 26 lagen keine entsprechenden Daten vor, vergleiche auch Tabelle 3-5). Die Tumorproben wurden entsprechend ihrer Differenzierung in zwei Gruppen eingeteilt: G = 2 (n = 21 Patienten) und G > 2 (n = 16 Patienten). Die Tumore mit G > 2 zeigen signifikant erhöhte CD75s-1-Gangliosidexpression (\*,  $P = 0,049$ ). Dies gilt sowohl für die absolute als auch die differentielle CD75s-1-Gangliosidexpression [DISTLER *et al.*, 2008b].

Wie aus den Boxplots ersichtlich wird (Abbildungen 3-22A und 3-22B), ist sowohl die CD75s-1 als auch die iso-CD75s-1-Gangliosidexpression in den malignen Pankreasgeweben im Vergleich zu den gesunden Geweben erhöht. Die unterschiedliche CD75s-1-Gangliosidexpression in Normal- und Tumorgeweben ist hoch signifikant ( $P = 0,001$ ). Gleiches gilt für die iso-CD75s-1-Gangliosidexpression ( $P = 0,001$ ).

Es konnte zudem eine signifikante Korrelation zwischen der CD75s-1 und der iso-CD75s-1-Gangliosidexpression innerhalb des untersuchten Kollektivs von Pankreaskarzinomen festgestellt werden. Tumorgewebe mit erhöhter Konzentration an CD75s-1-Gangliosiden zeigten auch eine Überexpression an iso-CD75s-1-Gangliosiden ( $P = 0,002$ ,  $\tau = 0,364$ ). Betrachtet man die differentielle Expression an CD75s-1 und iso-CD75s-1-Gangliosiden, welche ein Maß der Veränderung zwischen der Gangliosidexpression in Normal- und zugehörigem Tumorgewebe darstellt, so liegt auch hier ein signifikanter Zusammenhang vor ( $P = 0,023$ ,  $\tau = 0,260$ ). Dies bedeutet, dass eine starke Veränderung der CD75s-1-Gangliosidexpression von gesundem zu malignem Pankreasgewebe mit einer ähnlich starken und gleich gerichteten Veränderung der iso-CD75s-1-Gangliosidexpression einhergeht.

Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD75s-1-Gangliosidexpression und der Ausdehnung des Tumors (pT), dem Lymphknotenbefall (pN), dem Vorhandensein von Fernmetastasen (pM) oder dem UICC-Stadium des Tumors festgestellt (vergleiche Material und Methoden, Tabelle 2-1). Allerdings unterschieden sich schlecht beziehungsweise undifferenzierte Tumore, welche als  $G > 2$  ( $n = 16$  Patienten) eingestuft wurden, signifikant in ihrer CD75s-1-Gangliosidexpression von mäßig differenzierten Tumoren ( $G = 2$ ,  $n = 21$  Patienten). Wie Abbildung 3-22C zu entnehmen ist, galt dies sowohl für die absolute ( $P = 0,049$ ) als auch für die differentielle CD75s-1-Gangliosidexpression ( $P = 0,049$ ). In den Normalgeweben konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. Mittels Rang-Korrelation  $\tau$  nach Kendall konnte ein signifikanter Zusammenhang sowohl zwischen absoluter als auch differentieller CD75s-1-Gangliosidexpression und dem Grad der Zelldifferenzierung festgestellt werden ( $P = 0,028$ ,  $\tau = 0,305$  beziehungsweise  $P = 0,011$ ,  $\tau = 0,346$ ). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD75s-1-Gangliosidexpression offenbar in schlecht differenzierten malignen Geweben zunimmt. Somit stellen CD75s-1-Ganglioside potentielle Marker für schlechte Differenzierung in malignem Pankreasgewebe dar.

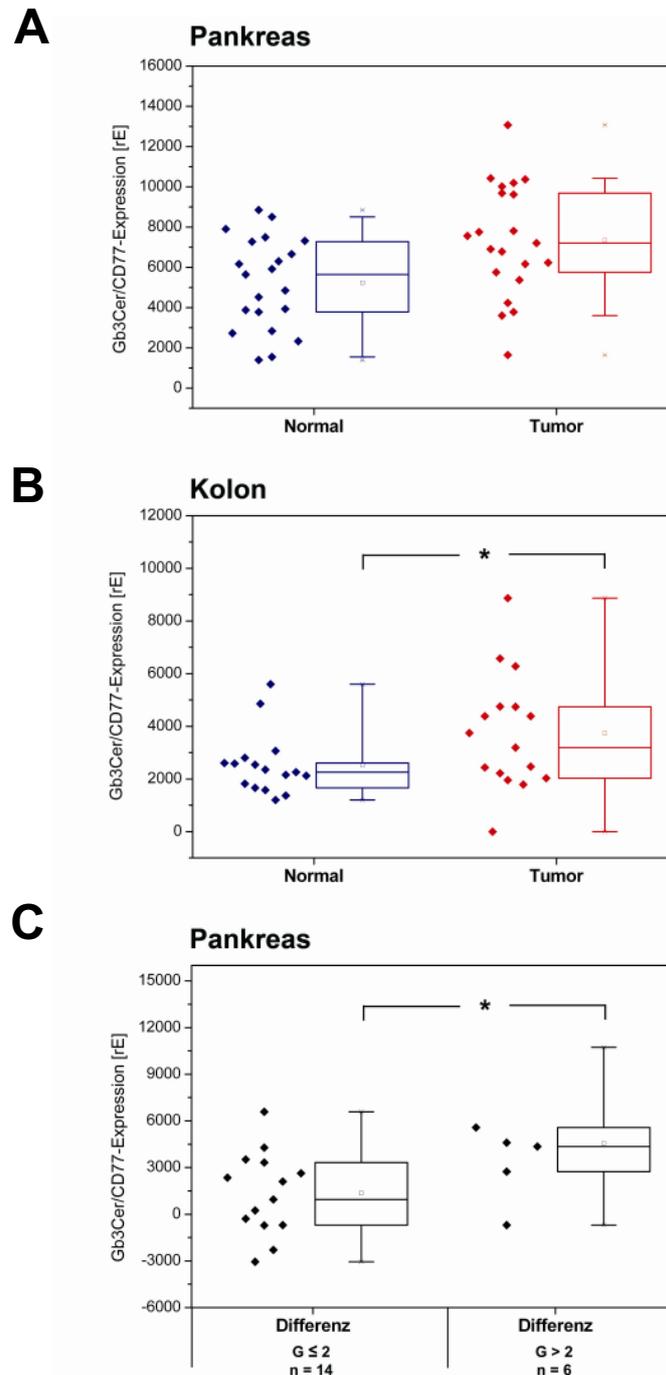
Die iso-CD75s-1-Gangliosidexpression zeigte weder eine Korrelation mit den pathologischen Eigenschaften nach der TNM-Klassifikation noch mit dem Differenzierungsgrad der untersuchten Pankreaskarzinomgewebeproben [DISTLER *et al.*, 2008b].

### **3.3.2 Gb3Cer/CD77-Expression in humanen Pankreas- und Kolonkarzinomgeweben**

Die Boxplots in Abbildung 3-23 zeigen die densitometrischen Daten der Gb3Cer/CD77-Expressionsanalysen in gesunden und malignen Pankreas- sowie Kolongeweben.

Anhand der Boxplots ist zu erkennen, dass in beiden Fällen eine erhöhte Gb3Cer/CD77-Expression in den Tumorgeweben im Vergleich zu den jeweiligen Normalgeweben nachweisbar ist. Während im Falle der Pankreasproben diese Erhöhung statistisch nicht signifikant war ( $P = 0,189$ ) (Abbildung 3-23A), konnte mittels Vorzeichentest ein signifikanter Unterschied zwischen der Gb3Cer/CD77-Expression in gesundem und malignem Kolongewebe (Abbildung 3-23B) festgestellt werden ( $P = 0,021$ ).

Zwischen der anatomischen Ausbreitung (TNM) von Pankreas- sowie Kolontumoren und der Gb3Cer/CD77-Expression wurde kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen. Analog zu der Vorgehensweise bei der Auswertung der CD75s- und iso-CD75s-Daten (Abschnitt 3.3.1) wurden die Pankreaskarzinomproben in zwei Gruppen eingeteilt mit  $G \leq 2$  ( $n = 14$  Patienten) und  $G > 2$  ( $n = 6$  Patienten). Mittels Mediantest konnte weder in den Normal- noch in den Tumorgeweben ein statistisch signifikanter Unterschied in der absoluten oder differentiellen Gb3Cer/CD77-Expression zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Wie Abbildung 3-23C zu entnehmen ist, zeigt jedoch die Berechnung der Rang-Korrelation  $\tau$  nach Kendall, dass ein Zusammenhang zwischen der differentiellen Gb3Cer/CD77-Expression und dem Grad der Zelldifferenzierung in malignem Pankreasgewebe besteht ( $P = 0,039$ ,  $\tau = 0,396$ ). Schlecht differenzierte Tumore zeigten somit eine signifikant erhöhte differentielle Gb3Cer/CD77-Expression. Dagegen wurde keine Korrelation zwischen dem histomorphologischen Grading und der Gb3Cer/CD77-Expression in den untersuchten Kolonkarzinomproben nachgewiesen [DISTLER *et al.*, 2009].



**Abbildung 3-23: Boxplots der Gb3Cer/CD77-Expression in Normal- und Tumorgeweben des Pankreas (A) und des Kolons (B).**

Die Boxen der Stichproben werden unten und oben von den 25%- sowie 75%-Perzentilen begrenzt. Die Linie in der Box kennzeichnet den Median und das Quadrat das arithmetische Mittel. Die beiden Kreuze markieren den höchsten beziehungsweise den niedrigsten Datenpunkt. (A) Eine erhöhte Expression an Gb3Cer/CD77 liegt in malignem Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe vor. Diese Erhöhung ist jedoch nicht signifikant ( $P = 0,189$ ,  $n = 21$  Patienten). (B) Die Gb3Cer/CD77-Expression in den malignen Geweben unterscheidet sich signifikant von der Gb3Cer/CD77-Expression im Normalgewebe (\*,  $P = 0,021$ ,  $n = 16$  Patienten). (C) Korrelation zwischen der Gb3Cer/CD77-Expression in Pankreaskarzinomgeweben und dem Differenzierungsgrad (G) ( $n = 20$  Patienten; von Patient 26 lagen keine entsprechenden Daten vor, vergleiche auch Tabelle 3-9). Die Tumortypen wurden entsprechend ihrer Differenzierung in zwei Gruppen eingeteilt:  $G \leq 2$  ( $n = 14$  Patienten) und  $G > 2$  ( $n = 6$  Patienten). Die Tumore mit  $G > 2$  zeigen eine signifikant erhöhte differentielle Gb3Cer/CD77-Expression (\*,  $P = 0,039$ ,  $\tau = 0,396$ ) [DISTLER *et al.*, 2009].

## 4 DISKUSSION

### 4.1 DC-IR-MALDI-o-TOF-MS

Bei der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS handelt es sich um eine Technik, die es ermöglicht, immungefärbte GSL bis in den unteren Nanogrammbereich direkt auf der DC-Platte zu detektieren. Grundvoraussetzung für das Gelingen der Methode stellt hierbei die Entfernung des Plexigum-Fixativs dar, welches den Ionisierungsprozess stören beziehungsweise verhindern würde, aber für den vorgeschalteten Overlay-Assay unerlässlich ist. Durch mehrmaliges Eintauchen der DC-Platten in Chloroform wird das Plexigum entfernt. Bei diesem Vorgang bleiben sowohl die GSL als auch das blaue BCIP-Präzipitat auf der Kieselgelschicht der DC-Platte erhalten. Dies ermöglicht die eindeutige Zuordnung der Protein-detektierten GSL bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse. Auch für die indirekte MS von immungefärbten GSL aus Kieselgeleextrakten [MEISEN *et al.*, 2004, 2005] sowie für die direkte UV-MALDI-MS, wie sie für die Detektion von immungefärbtem asialo GM1 (= Gg4Cer) auf der DC-Platte beschrieben wurde [NAKAMURA *et al.*, 2006], muss zunächst das Plexigum-Fixativ vor Durchführung der massenspektrometrischen Analytik entfernt werden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass bei der Messung der GSL, die mit unterschiedlichen Detektionssystemen auf der DC-Platte nachgewiesen wurden, die verschiedenen Nachweisproteine keinen störenden Einfluss auf die DC-IR-MALDI-o-TOF-MS hatten. Dies gilt sowohl für die mit den GSL interagierenden primären poly- und monoklonalen Antikörper, bakteriellen Toxine und pflanzlichen Lektine mit ihren entsprechenden Primärantikörpern und die jeweiligen mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörpern als auch für das blaue BCIP-Präzipitat.

Im Vergleich zu verschiedenen indirekten Verfahren, bei denen die DC und die MS zur Analyse von GSL kombiniert werden [STROUD *et al.*, 1998; HILDEBRANDT *et al.*, 1999; MEISEN *et al.*, 2004; MEISEN *et al.*, 2005; NIIMURA *et al.*, 2006], besitzt die direkte DC-MS den Vorteil, dass aufwendige, arbeitsintensive Extraktionsschritte, die meist mit einem Materialverlust einhergehen, entfallen [CHAI *et al.*, 2003; O'CONNOR *et al.*, 2004; IVLEVA *et al.*, 2004, 2005; DREISEWERD *et al.*, 2005; NAKAMURA *et al.*, 2006; ROHLFING *et al.*, 2007]. So wurden schon in den frühen 1980er erste Versuche unternommen, die MS mit der DC zu koppeln, um GSL *in situ* (das heißt direkt auf der DC-Platte) zu analysieren [UNGER *et al.*,

1981; KUSHI AND HANDA, 1985]. Eine wesentliche Verbesserung in der Sensitivität und Massengenauigkeit gegenüber diesen ersten Versuchen, die mit SI (Sekundärionen, engl. *secondary ion*)-MS und FAB (*fast atom bombardment*)-MS durchgeführt wurden, konnte mit dem Einsatz der UV-MALDI-MS erzielt werden, da sich Verunreinigungen und ein hoher Salzgehalt in der Probe weniger störend auf den MALDI- als auf den SI- oder FAB-vermittelten Ionisierungsprozess auswirken [GUITTARD *et al.*, 1999]. Auch der Massenanalysator spielt eine entscheidende Rolle. Beim Einsatz von axial-TOF Geräten führt die Unregelmäßigkeit der Silikaoberfläche bei der DC-MALDI-MS, im Vergleich zu konventionellen MALDI-Protokollen, zu einer immensen Verschlechterung der Massengenauigkeit. Durch die Entkopplung des Ionisierungsprozesses von der Massanalyse kann dieses Problem umgangen werden. Massenanalytoren, bei denen dies der Fall ist, sind Fouriertransform-Ionencyclotronresonanz (FT-ICR)- sowie o-TOF-Massenspektrometer [GUITTARD *et al.*, 1999; DREISEWERD *et al.*, 2005]. Ausgangspunkt für die massenspektrometrische Analyse von immungefärbten GSL in der vorliegenden Arbeit stellen die Experimente von Dreisewerd *et al.* [2005] dar, bei denen mit einem IR-Laser und einem o-TOF-Analysator verschiedene GM3-Varianten auf der DC-Platte charakterisiert wurden.

Nakamura *et al.* [2006] waren die Ersten, die die DC-Immundetektion mit der MS gekoppelt haben. Sie setzten die UV-MALDI-TOF-MS zur Messung von immungefärbtem asialo-GM1 (= Gg4Cer) ein. Das Detektionslimit für MS/MS-Analysen lag hierbei bei 60 ng. Der Vorteil von IR-Lasern gegenüber UV-Lasern besteht darin, dass IR-Laser einige Mikrometer in die Silikaoberfläche eindringen können und somit bei der Messung mehr Material abtragen [BERKENKAMP *et al.*, 1998; DREISEWERD, 2003; DREISEWERD *et al.*, 2005; ROHLFING *et al.*, 2007]. Die Eindringtiefe von UV-Lasern hingegen beträgt im besten Falle nur ca. 100 nm [DREISEWERD, 2003]. Beim UV-MALDI-Prozess werden zudem hauptsächlich die Analytmoleküle, die in die Matrixkristalle auf der Silikaoberfläche eingebunden sind, desorbiert und ionisiert. Je tiefer der Laser nach einigen Schüssen/Pulsen in das matrixfreie Silikagel dringt, desto stärker die Abnahme des GSL-Ionensignals. Somit lässt sich bei Messungen, bei denen eine Flüssigmatrix und ein IR-Laser zur Ionisierung des Analyten auf und im Kieselgel eingesetzt wurden, eine höhere Sensitivität erzielen. In der vorliegenden Arbeit konnte im Falle von nLc4Cer (d18:1, C16:0) ein Detektionslimit von 0,6 ng erreicht werden (vergleiche Ergebnisse, Abbildung 3-3).

Ein Nachteil der IR-MALDI-o-TOF-MS bestand darin, dass mit dem eingesetzten Gerät keine MS/MS- oder MS<sup>n</sup>-Experimente durchgeführt werden konnten. Aus diesem Grund sollte im Fokus zukünftiger Arbeiten die Kopplung der IR-MALDI-Quelle mit Massenspektrometern,

wie zum Beispiel einem FT-ICR-Gerät, stehen. Neben der hohen Auflösung und der Massengenauigkeit, die diese Geräte liefern [VULKELIĆ *et al.*, 2005], könnten sowohl MS/MS- als auch MS<sup>n</sup>-Analysen von immungefärbten GSL direkt auf der DC-Platte durchgeführt werden [O'CONNOR *et al.*, 2004], welche es ermöglichen, detailliertere Strukturinformationen zu erhalten.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die DC-IR-MALDI-o-TOF-MS nicht nur zur Analyse von aufgereinigten Referenzsubstanzen einsetzen lässt, sondern auch zur Untersuchung von GSL aus Geweberohextrakten geeignet ist. Somit kann auf arbeitsintensive Aufreinigungsschritte, wie Anionenaustauschchromatographie (zur Trennung von neutralen GSL und Gangliosiden), Adsorptionschromatographie oder Hochleistungsflüssigchromatographie [MÜTHING, 2000] sowie präparativer DC zur Gewinnung von einzelnen GSL-Fractionen verzichtet werden. Der einzige Aufreinigungsschritt, der bei der Extraktion der (Glykosphingo)lipide aus den Geweben erfolgt, besteht in der Verseifung koextrahierter Phospholipide und Triacylglyceride, gefolgt von einer Dialyse zur Entfernung der Salze. Dieser Aufarbeitungsschritt ist unerlässlich, da koextrahierte Phospholipide die dominierende Substanzklasse in Lipidrohextrakten aus Geweben darstellen und sie somit die Analyse der GSL negativ beeinflussen, indem sie bei Durchführung der DC das Chromatogramm überladen und die Trennung stören. Durch den Einsatz von Gesamtlipidextrakten wird somit zum Einen das Risiko verkleinert, dass durch Standardaufreinigungsverfahren GSL verloren gehen, und zum Anderen wird bei der Analyse gewährleistet, dass man hiermit eine Probe vorliegen hat, die das komplette „Glykosphingolipidom“ eines bestimmten Zelltyps, Gewebes oder Organs enthält. Die geringste Menge an Gewebe (humanes Pankreasgewebe), aus dem bis *dato* GSL extrahiert und noch aussagekräftige Spektren erhalten wurden, entsprach 2 mg Gewebefeuchtgewicht (Daten in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt). Dieses *Downscaling* der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS stellt einen viel versprechenden Ansatz dar, da sich in Zukunft Gewebe in Biopsiegröße von wenigen Milligramm analysieren lassen und man Patientenproben bereits in einem frühen Stadium präoperativ auf die Expression von tumorassoziierten GSL untersuchen könnte.

Unter dem Glykom fasst man die komplette, zelluläre Ausstattung eines Organismus mit Glykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden, aber auch alle Gene und Genprodukte, die für deren Synthese, Bindung oder auch deren Regulation verantwortlich sind, zusammen. Neue Ansätze zur Erforschung des Glykoms helfen die Prozesse, welche der Entwicklung von Krebs und anderen Krankheiten zugrunde liegen, zu verstehen [MIYAMOTO *et al.*, 2006]. Die

„Funktionale Glykomik“ bedient sich verschiedener Hochdurchsatz-Techniken, wie zum Beispiel Glykan-Arrays, um das Glykom beziehungsweise die strukturelle, funktionale und physiologische Rolle von Glykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden zu entschlüsseln [FEIZI, 2000a; FUKUI *et al.*, 2002; FEIZI AND CHAI, 2004; MORELLE AND MICHALSKI, 2005; PILOBELLO AND MAHAL, 2007]. Einen Meilenstein in der Entwicklung von Glyko-/Glykan-Arrays stellt die Etablierung der Neoglykolipidtechnologie dar. Das Grundprinzip dieser Technik besteht darin, von verschiedenen Glykokonjugaten wie Glykoproteinen und Muzinen abgespaltene Oligosaccharide auf ein Rezeptorlipid, zum Beispiel Phosphatidylethanolamin, zu transferieren [FEIZI *et al.*, 1994]. Die so konstruierten Neoglykolipide eignen sich für zahlreiche Analyseverfahren, die zuvor bereits für die Charakterisierung von natürlich vorkommenden GSL entwickelt wurden. Dazu gehören die DC-Overlay-Technik [MAGNANI *et al.*, 1987] und die *in situ* DC-Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (DC-LSI-MS) [CHAI *et al.*, 2003]. Je nach Fragestellung und Komplexität des Ausgangsmaterials findet somit die DC-MS auch Einsatz zur Charakterisierung von Oligosacchariden, die ursprünglich an ein Protein gebunden waren und nach Transfer auf einen Lipidanker wesentlich einfacher strukturell charakterisiert werden können [FUKUI *et al.*, 2002; FEIZI AND CHAI, 2004]. In diesem Kontext stellt die DC-IR-MALDI-o-TOF-MS von immundetektierten GSL eine interessante Methode dar und wird zukünftig eine wichtige Rolle spielen.

## **4.2 TUMORASSOZIIERTE GSL IN PANKREAS- UND KOLON-TUMOREN**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich sowohl bei den CD75s- und iso-CD75s-Gangliosiden als auch bei dem neutralen GSL Gb3Cer/CD77 um Zelloberflächenmoleküle handelt, die in Tumoren sehr häufig in erhöhter Konzentration auftreten. Diese tumorassoziierten GSL sind in den letzten Jahren sowohl in der Tumordiagnostik als auch in der Tumorthherapie als potentielle Targets ins Zentrum des Interesses gerückt [CHU *et al.*, 2000; FREDMAN *et al.*, 2003; KANNAGI *et al.*, 2008]. Durch seine multivalente Präsentation auf der Zelloberfläche in den Lipid-Rafts der Zellmembran übt der Oligosaccharidpart der GSL eine starke Affinität gegenüber seinem Liganden aus [LUNDQUIST AND TOONE, 2002]. Somit stellen GSL grundsätzlich hervorragende Kandidaten für zielgerichtete Therapien mit Lektinen, Toxinen und monoklonalen Antikörpern dar.

Kürzlich wurden zwei monoklonale Antikörper, SC104 [DURRANT *et al.*, 2006] und 14F7 [ROQUE-NAVARRO *et al.*, 2008], die gegen den Oligosaccharidteil von tumorassoziierten Gangliosiden gerichtet sind, beschrieben. Es wurde am Beispiel von malignen Kolonzellen gezeigt, dass SC104 hierbei auf klassischem Weg direkt die Apoptose der Zellen induziert, ohne hierzu Effektorzellen und/oder Komponenten des Komplementsystems zu benötigen [DURRANT *et al.*, 2006]. Der zelluläre GSL-Rezeptor von SC104 konnte bis *dato* noch nicht eindeutig charakterisiert werden. Man geht aber zumindest davon aus, dass es sich um ein Sialyltetraosylceramid handelt, wobei GM1 und Sialyl Lewis X als Targetstrukturen ausgeschlossen werden können [DURRANT *et al.*, 2006]. Im Gegensatz zu SC104 wird der Zelltod durch 14F7 mittels eines neuen Mechanismus, der nicht apoptotisch verläuft, ausgelöst. Auch in diesem Fall ist der zytotoxische Effekt Komplement unabhängig [ROQUE-NAVARRO *et al.*, 2008]. Neben monoklonalen Antikörpern werden, wie schon in Kapitel 1.5 beschrieben, auch pflanzliche und bakterielle Toxine mit GSL-Bindeeigenschaften erforscht, um sie für klinische Zwecke nutzen zu können. Von besonderem Interesse sind die Ribosmen-inaktivierenden Proteine ML-I aus der Mistel und dessen rekombinantes Pendant rViscumin, die spezifisch CD75s-Ganglioside erkennen [MÜTHING *et al.*, 2002, 2004], sowie Stx1 aus EHEC-Stämmen, das mit hoher Affinität an Gb3Cer/CD77 bindet [JANSSEN *et al.*, 2006; FALGUIÈRES *et al.*, 2008].

#### 4.2.1 CD75s-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen

Die Analyse der Pankreaskarzinomgewebeproben auf CD75s-Ganglioside ergab, dass in 42,1% der Fälle (n = 38) IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s-1-Ganglioside) im Tumorgewebe moderat bis stark überexprimiert werden. Mittels Vorzeichentest konnte auch statistisch belegt werden, dass sich die Expression von CD75s-1-Gangliosiden im Tumorgewebe hoch signifikant von der im gesunden Gewebe unterscheidet (P = 0,001). Somit konnte bei Pankreaskarzinomen IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s-1-Gangliosid) eindeutig als ein tumorassoziiertes GSL identifiziert werden.

In malignem Humangewebe finden sich häufig tumorinfiltrierende Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen [ECSEDY *et al.*, 1998] oder Granulozyten [MACHER *et al.*, 1982]. Wenn dies der Fall ist, stellen sie einen Teil der Zellpopulation des malignen Gewebes dar und tragen somit auch zur GSL-Zusammensetzung der Lipidextrakte aus Tumoren bei [MACHER *et al.*, 1982; ECSEDY *et al.*, 1998]. Während sowohl CD75s-1- und CD75s-2-Ganglioside als auch iso-CD75s-1- und iso-CD75s-2-Ganglioside von Granulozyten in hohem

Maße exprimiert werden, treten sie in Monozyten beziehungsweise Makrophagen lediglich in sehr geringen Mengen auf [KIGUCHI *et al.*, 1990; MÜTHING *et al.*, 1993; YOHE *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund wurde das Tumorgewebe mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, um falsch positive Ergebnisse, welche auf tumorinfiltrierende Leukozyten zurückzuführen sind, ausschließen zu können. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden nur vereinzelt Immunzellen beobachtet, die im Vergleich zum malignen Gewebe lediglich sehr schwache CD75s-Gangliosidexpression zeigten. Auch das Fehlen von CD75s-2-Gangliosiden in den Gewebextrakten weist darauf hin, dass die im Overlay-Assay detektierten IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer-Varianten tatsächlich aus malignen Pankreazellen und nicht aus Leukozyten stammen. In gesundem Vergleichsgewebe wurden mittels Immunfluoreszenz keine Leukozyten detektiert; auch konnten nur sehr vereinzelt schwach CD75s-positive Pankreazellen nachgewiesen werden. Somit bestätigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie die Tumorassoziation von IV<sup>6</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (CD75s-1-Ganglioside) in Pankreaskarzinomen.

Mitte der 1980er untersuchten Nilsson *et al.* [1985] stichprobenartig Karzinome verschiedenen Ursprungs (Kolon/Rektum, Pankreas, Magen, Lunge, Niere, Brust, Uterus) auf ihren Gehalt an CD75s-Gangliosiden. In dieser Studie zeigten insbesondere kolorektale sowie Lungenkarzinome eine erhöhte CD75s-Gangliosidexpression. Aber auch in allen anderen Tumoren konnte eine CD75s-Gangliosidexpression verzeichnet werden, wobei 4 von 7 Pankreaskarzinomen CD75s-positiv waren. In den entsprechenden gesunden, adulten Geweben konnten keine oder lediglich geringe Mengen an CD75s-Gangliosiden nachgewiesen werden. Gesundes Pankreasgewebe (n = 2) zeigte keine CD75s-Gangliosidexpression. Die in selbiger Studie zur DC-Immundetektion eingesetzten Mengen an GSL-Extrakt entsprachen 3 mg bis 50 mg Gewebefeuchtgewicht. Im Jahre 1990 beobachteten Taki *et al.*, dass Sialyl( $\alpha$ 2-6)paraglobosid (= CD75s-1-Gangliosid) auch in Lebertumoren in erhöhter Konzentration vorliegt. Müthing *et al.* [2005] konnten ebenfalls eine Erhöhung der CD75s-Gangliosidexpression in malignen Leber- (n = 3), Kolon- (n = 2), Magen- (n = 3) und Pankreaskarzinomen (n = 1) nachweisen, wobei das maligne Pankreasgewebe die stärkste Überexpression zeigte. Die Ergebnisse der verschiedenen Studien stehen somit im Einklang mit den Daten der vorliegenden Arbeit. Sie zeigen darüber hinaus, dass die erhöhte Expression an CD75s-Gangliosiden nicht nur ein Charakteristikum für Pankreastumoren, sondern auch in anderen Organen ein Indikator für Malignität ist.

Die Analyse der Genexpression von Sialyltransferasen, die für den Transfer von Neu5Ac auf Glykoproteine und GSL in  $\alpha$ 2-6- oder  $\alpha$ 2-3-Konfiguration verantwortlich sind, ist eine

weitere Möglichkeit, Informationen über den Sialyierungsgrad von Tumorgeweben zu erhalten. Über diesen molekularbiologischen Ansatz wurden bereits in zahlreichen Studien Daten gewonnen. Allerdings konnte kein quantitativer Zusammenhang zwischen dem mRNA-Gehalt der Sialyltransferasen, ihrer Enzymaktivität auf Proteinebene und der tatsächlichen Menge an entsprechenden Sialylglykokonjugaten festgestellt werden. Vielmehr scheint die Expression eines sialylierten Oligosaccharids an verschiedenen Stellen seines Synthesewegs reguliert zu werden. Sialyltransferasen vollziehen oftmals lediglich den letzten Schritt im Biosyntheseweg von sialylierten Oligosacchariden. In den bisher durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von  $\alpha$ 2-6-Sialyltransferasen und der ihrer Produkte besteht [DALL'OLIO, 2000; DALL'OLIO AND CHIRICOLO, 2001; DALL'OLIO *et al.*, 2004]. Diese Fakten stehen im Einklang mit Daten, die in Vorarbeiten (Diplomarbeit Ute Distler [2005]) gewonnen wurden. Auch hier konnte keine Korrelation zwischen der Expression des Enzyms ST6Gal I ( $\beta$ -Galactosid  $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase), das für die terminale Sialylierung des Gal $\beta$ 4GlcNAc-Restes auf CD75s-Gangliosiden sowie für die Sialylierung von Glykoproteinen mit CD75s-Epitopen verantwortlich ist [DALL'OLIO, 2000], und der Expression von CD75s-Gangliosiden in Pankreas- und Kolonkarzinomgeweben festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Einsatz molekularbiologischer Methoden, wie zum Beispiel der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*) verzichtet. Die RT-PCR stellt somit eine ungeeignete Methode dar, wenn es gilt, herauszufinden, ob ein Pankreaskarzinompatient aufgrund einer starken Überexpression an CD75s-Gangliosiden auf der Tumorzelloberfläche für eine Therapie mit rViscumin in Betracht gezogen werden kann.

Wie bereits in den Abschnitten 1.5.1 und 1.5.2 erläutert, zeigten sowohl das ML-I als auch das rViscumin einen anti-Tumor Effekt im Tiermodell [SCHUMACHER *et al.*, 2000; ELSÄSSER-BEILE *et al.*, 2001; ROSTOCK *et al.*, 2005; THIES *et al.* 2008]. Im Falle von ML-I wurde in verschiedenen Studien der zytotoxische Effekt auf Tumorzellen auch *in vitro* nachgewiesen [BANTEL *et al.* 1999; VALENTINER *et al.*, 2002; PRYME *et al.*, 2006]. Allerdings wurde bis *dato* in keiner der Studien genauer untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Expression des ML-I-Rezeptors und dem zytopathischen Effekt des Lektins besteht. Somit sollte in zukünftigen Arbeiten die Expression von CD75s-1-Gangliosiden in Pankreaskarzinomzelllinien untersucht und in diesem Kontext überprüft werden, ob ein Anstieg der Expression von CD75s-1-Gangliosiden mit einer erhöhten Zytotoxizität des ML-I beziehungsweise des rViscumins einhergeht.

GSL scheinen zudem eine Rolle bei der Resistenz von Tumorzellen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika zu spielen [GOUAZE-ANDERSSON AND CABOT, 2006]. Valentiner *et al.* [2002] konnten zeigen, dass Mistellektine *in vitro* einen starken zytotoxischen Effekt auf *Multidrug*-resistente Kolonkarzinomzellen haben. Somit könnten ML-I beziehungsweise rViscumin vor allen Dingen auch für die Behandlung von Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium, die eine Resistenz gegen konventionelle Radio- und Chemotherapeutika aufweisen, interessant sein. Die Verträglichkeit der beiden Lektine wurde bereits in zahlreichen klinischen Studien erfolgreich getestet [STAUDER AND KREUSER, 2002; HABECK, 2003; SCHÖFFSKI *et al.*, 2004; SCHÖFFSKI *et al.*, 2005; BERGMANN *et al.*, 2008].

Schlecht- beziehungsweise undifferenzierte Tumore ( $G > 2$ ) unterschieden sich signifikant in ihrer CD75s-1-Gangliosidexpression von mäßig differenzierten Tumoren ( $G = 2$ ). Dies galt sowohl für die absolute ( $P = 0,049$ ) als auch für die differentielle CD75s-1-Gangliosidexpression ( $P = 0,049$ ). In beiden Fällen konnte eine signifikant erhöhte CD75s-1-Gangliosidexpression in der Gruppe der schlecht differenzierten beziehungsweise undifferenzierten Tumore festgestellt werden ( $P = 0,028$  beziehungsweise  $P = 0,011$ ). Eine schlechte Differenzierung des Tumors ist oftmals mit einer ungünstigen Prognose für den Patienten verbunden. Hedlund *et al.* [2008] waren die Ersten, die anhand von *in vivo*-Experimenten zeigen konnten, dass die  $\alpha 2$ -6-Sialylierung von Glykokonjugaten einen Einfluss auf die Differenzierung von Karzinomen hat und mit einem schlecht differenzierten Phänotyp korreliert. Diese Studie bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Da eine Korrelation zwischen der Expression von  $\alpha 2$ -6-sialylierten CD75s-1-Gangliosiden und schlecht differenziertem Gewebe besteht, könnten CD75s-1-Ganglioside somit in Zukunft möglicherweise auch zur Abschätzung der Prognose von Patienten interessant werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass sialylierte Antigene möglicherweise auch prognostische Informationen über Metastasen liefern [ICHIKAWA *et al.*, 2000]. Die Dissemination (Ausbreitung) der malignen Tumorzellen des Primärtumors über den lymphatischen und/oder den hämatogenen Weg wird als eine Ursache der Metastasenbildung und der Wiederkehr eines Tumors angesehen. Eine Studie von Ichikawa *et al.* [2000] weist auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten disseminierter Zellen/Metastasen und einer Expression sialylierter Antigene im Primärtumor hin. Unter diesem Aspekt sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob auch CD75s-1-Ganglioside eine Rolle bei der Metastasierung spielen und eventuell einen prognostischen Marker für die Wiederkehr einer Tumorerkrankung darstellen.

### 4.2.2 iso-CD75s-Expressionsanalyse in humanen Pankreaskarzinomen

Bei der Analyse der Pankreaskarzinomproben auf iso-CD75s-Ganglioside zeigten 65,8% der Tumoren (n = 38) im Vergleich zu entsprechendem gesunden Gewebe eine moderate bis starke Überexpression an IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (iso-CD75s-1-Gangliosiden). Die iso-CD75s-1-Gangliosidexpression unterschied sich hierbei hoch signifikant von der im gesunden Gewebe (P = 0,001), so dass auch IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer (iso-CD75s-1-Gangliosid) als tumorassoziiertes Molekül identifiziert werden konnte. Hierbei ist anzumerken, dass im Vergleich zu den CD75s-1-Gangliosiden iso-CD75s-1-Ganglioside auch in geringen Konzentrationen in den untersuchten gesunden Geweben nachgewiesen werden konnten.

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse von Kryoschnitten der malignen und gesunden Pankreasgewebe konnte auch in diesem Fall ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse des Overlay-Assays durch die Koextraktion von iso-CD75s-Gangliosiden aus Granulozyten und Makrophagen verfälscht wurden. Lediglich vereinzelte, leukozytäre Zellen, die schwach iso-CD75s-Ganglioside exprimierten, wurden im Karzinomgewebe nachgewiesen. Zudem waren im Overlay-Assay keine VI<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc6Cer-Spezies, die sehr stark in Granulozyten exprimiert werden, bei der Analyse der Gewebeextrakte detektierbar. Somit stammt das im Overlay-Assay identifizierte IV<sup>3</sup>Neu5Ac-nLc4Cer tatsächlich aus malignem Pankreasgewebe und nicht aus tumorinfiltrierenden Leukozyten. Als tumorassoziierte Struktur stellen die iso-CD75s-1-Ganglioside interessante Targets für (ziel)gerichtete Therapien mit humanisierten monoklonalen Antikörpern dar.

Es konnte weder ein Zusammenhang zwischen den pathologischen Eigenschaften nach der TNM-Klassifikation noch dem Differenzierungsgrad der Pankreaskarzinome und der iso-CD75s-1-Gangliosidexpression festgestellt werden. Allerdings zeigten maligne Pankreasgewebe mit einer erhöhten CD75s-1-Gangliosidexpression auch eine Akkumulation an iso-CD75s-1-Gangliosiden (P = 0,002,  $\tau = 0,364$ ). Auch die differentielle Expression an CD75s-1- und iso-CD75s-1-Gangliosiden, die ein Maß der Veränderung zwischen Gangliosidexpression in Normal- und Tumorgewebe darstellt, korreliert in den malignen Geweben (P = 0,023,  $\tau = 0,260$ ). Somit geht eine starke Erhöhung der CD75s-1-Gangliosidexpression in malignem Pankreasgewebe mit einer ähnlich starken Zunahme der iso-CD75s-1-Gangliosidexpression einher. In diesem Kontext sollte in weiterführenden Expressionsanalysen untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der Expression von CD75s-1- beziehungsweise iso-CD75s-1-Gangliosiden und der Expression gemeinsamer

Vorläuferstrukturen, wie zum Beispiel nLc4Cer, bei dem es sich ebenfalls um ein tumorassoziiertes GSL handelt [TAKI *et al.*, 1984, 1985; MYOGA *et al.* 1988], besteht.

### **4.2.3 Gb3Cer/CD77-Expressionsanalyse in humanen Pankreas- und Kolonkarzinomen**

Bei einem Großteil der Kolon- und der Pankreaskarzinome konnte eine deutlich erhöhte Gb3Cer/CD77-Expression festgestellt werden. Insgesamt zeigten 81,3% der Kolon- und 61,9% der Pankreastumore eine Überexpression an Gb3Cer/CD77 im Vergleich zum Normalgewebe. Die unterschiedliche Expression an Gb3Cer/CD77 in malignem gegenüber gesundem Kolongewebe erwies sich als signifikant ( $P = 0,021$ ). Dieser Befund stimmt mit den Daten, die Falguières *et al.* [2008] kürzlich publizierten, überein. Selbige Arbeitsgruppe konnte sowohl in humanen KRK als auch in Lebermetastasen eine hoch signifikante Überexpression an Gb3Cer/CD77 nachweisen. Somit handelt es sich bei Gb3Cer/CD77 im Falle von Kolonkarzinomen um ein tumorassoziiertes neutrales GSL. Auch bei den Pankreaskarzinomen liegt eine Tumorassoziation vor, da 60,9% der Proben eine Hochregulation von Gb3Cer/CD77 im Vergleich zu gesundem Gewebe zeigte ( $P = 0,189$ ).

Gb3Cer/CD77 erweist sich somit als vielversprechende Targetstruktur für potentielle Therapeutika. So könnten Stx1 beziehungsweise die B-Untereinheit oder auch Derivate der B-Untereinheit im Rahmen einer adjuvanten Therapie zur Behandlung von Patienten, die an einem Kolon- oder Pankreaskarzinom erkrankt sind und eine Überexpression an Gb3Cer/CD77 zeigen, möglicherweise zum Einsatz kommen. Bei den Stx handelt es sich bis *dato* um die einzigen bakteriellen Toxine, welche, analog zu pflanzlichen RIP, eine rRNA-N-Glykosidase Aktivität aufweisen [STIRPE AND BATTELLI, 2006]. Vor allen Dingen die B-Untereinheit erfüllt mehrere wichtige Kriterien, die für den Einsatz als Therapeutikum beziehungsweise Targeting-Vektor essentiell sind [JOHANNES AND DECAUDIN, 2005]. Dies sind zum einen die hohe Bindespezifität an ihren zellulären Rezeptor, die ein zellspezifisches Targeting erlaubt, und zum anderen die Eigenschaft, physiologische Barrieren zu überwinden und sowohl einem extra- als auch intrazellulären Abbau stand zu halten. Weitere Vorteile bestehen in der geringen immunogenen Wirkung und der schnellen Aufnahme der B-Untereinheit in die Tumorzellen [JOHANNES AND DECAUDIN, 2005].

Nach Aufnahme in die Zelle entgeht das Stx1 dem intrazellulären Abbau über retrograden Transport, welcher offenbar von der Organisation der GSL in der Zellmembran abhängt.

Lediglich GSL, die mit den Lipid-Rafts assoziiert sind, „transportieren“ AB<sub>5</sub> Toxine auf dem retrograden Weg und leiten die Toxine über frühe Endosomen und den Golgi Apparat zum ER sowie zum Zellkern [FALGUIÈRES *et al.*, 2001; LENCER AND SASLOWSKY, 2005]. Sobald das Stx1 das ER erreicht, erfolgt die proteolytische Spaltung der A-Untereinheit in ein A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Fragment sowie die Translokation des enzymatisch aktiven A<sub>1</sub>-Fragments in das Zytosol. Das terminale Gal $\alpha$ 4Gal-Disaccharid von Gb3Cer/CD77 stellt zwar die primäre Erkennungsdomäne für Stx1 dar, aber auch die Länge der Fettsäurekette im Ceramidteil übt sowohl auf die Affinität von Stx1 zu Gb3Cer/CD77 [KIARASH *et al.*, 1994; MAHFOUD *et al.*, 2008] als auch auf den retrograden Transport [ARAB AND LINGWOOD, 1998; LINGWOOD, 1999; MUKHERJEE *et al.*, 1999] einen entscheidenden Einfluss aus. So scheint der intrazelluläre Transport des Toxins zum ER vor allen Dingen durch die Assoziation von Stx1 mit Gb3Cer/CD77-Spezies, welche kurzkettige Fettsäuren (insbesondere C16) tragen, begünstigt zu sein, was in einer stärkeren Sensitivität der Zellen gegenüber dem Toxin resultiert. Gb3Cer/CD77-Varianten mit langkettigen Fettsäuren (C22; C24) im Ceramid leiten die Toxine über retrograden Transport nur bis zum Golgi-Apparat [ARAB AND LINGWOOD, 1998; LINGWOOD, 1999]. Es wird angenommen, dass es sich bei diesem selektiven Transport von der Zelloberfläche zum ER um einen neuen Signaltransduktionsweg handelt. Die Transportroute zum ER korreliert mit einer ca. 1000-fachen Steigerung der Zytotoxizität von Stx1 im Vergleich zur Route, die im Golgi-Apparat endet [ARAB AND LINGWOOD, 1998; LINGWOOD, 1999]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pankreas- und Kolonkarzinomgewebe zeigten mehrheitlich eine Hochregulation der Gb3Cer/CD77-Spezies mit C16:0-Fettsäure, von der man annimmt, dass sie aufgrund des Toxintransports zum ER mit der erhöhten Sensitivität von Zellen gegenüber dem Stx1 assoziiert ist [ARAB AND LINGWOOD, 1998; LINGWOOD, 1999].

Im Overlay-Assay konnte in 80% der Pankreas- und in 20% der Kolonkarzinomgewebe neben den Gb3Cer/CD77 mit kurz- (C16) beziehungsweise langkettiger Fettsäure (C22, C23 oder C24) eine weitere Spezies mit polarerem Laufverhalten detektiert werden. Die massenspektrometrischen Analysen deuten auf eine Gb3Cer/CD77-Variante hin, die eine hydroxylierte C16-Fettsäure im Ceramid besitzt. Hydroxylierte GSL-Spezies treten in gesunden Geweben selten auf. Dagegen geht in malignen Zellen ein verändertes Glykosylierungsmuster häufig mit einer Veränderung im Ceramidprofil einher [HAKOMORI, 1996]. Ganglioside aus Neuroblastomen zeigen zum Beispiel eine hohe Expression an  $\alpha$ -Hydroxyfettsäuren [LADISCH *et al.*, 1989]. Eine Hydroxylierung im Ceramid erhöht die Bindungsaffinität von Stx an Gb3Cer/CD77 [BINNINGTON *et al.*, 2002]. Somit stellen

hydroxylierte Gb3Cer/CD77-Spezies möglicherweise hocheffiziente Targets für die onkologische Anwendung dar. Ein hoher Gehalt an hydroxyliertem Gb3Cer/CD77 konnte auch in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden, welche eine Resistenz gegen die Chemotherapeutika Taxol und Cisplatin zeigen. Beim Vergleich mit Taxol- und Cisplatin-sensitiven Zellen konnte ein Zusammenhang zwischen einer starken Zunahme von hydroxyliertem Gb3Cer/CD77 und der Resistenz gegen Antitumormittel festgestellt werden [KIGUCHI *et al.*, 2006]. In einer anderen Studie konnte eine hohe Expression an Gb3Cer/CD77 in *Multidrug*-resistenten primären Ovarialkarzinomzellen, welche eine Hypersensitivität gegenüber dem Stx1 aufwiesen, festgestellt werden [FARKAS-HIMSLEY *et al.*, 1995; LINGWOOD, 1999]. Somit könnte das Stx1 oder eines seiner Derivate, ähnlich wie ML-I und rViscumin, insbesondere zur Behandlung von Tumoren in fortgeschrittenem Stadium, die gegen herkömmliche Therapeutika resistent sind, interessant sein.

Bei der histologischen Untersuchung von Gewebeschnitten aus Pankreas- und Kolonkarzinomen konnte neben der Hochregulation von Gb3Cer/CD77 im malignen Epithelgewebe auch eine hohe Expression an Gb3Cer/CD77 in neovaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden. Da Tumore über die Blutbahn Nährstoffe und Sauerstoff beziehen, ist die Angiogenese für das Tumorwachstum von essentieller Bedeutung. Die Idee, das Blutgefäßwachstum zu hemmen und somit Tumore „auszuhungern“, liefert einen vielversprechenden Ansatz für die Tumorthherapie. So konnten mit dem Einsatz des humanisierten monoklonalen Antikörpers Bevacizumab (Avastin), der spezifisch an das tumorassoziierte Zelloberflächenmolekül VEGF, das bei der Ausbildung von neovaskulärem Endothel eine entscheidende Rolle spielt, bindet, in klinischen Studien bereits erste Erfolge erzielt werden [WEITZ *et al.*, 2005; KLEIN AND GOTTFRIED, 2007; GOODIN, 2008]. Eine relevante Expression an Gb3Cer/CD77 war zuvor schon in der tumorversorgenden Neovaskulatur bei Ovarialkarzinomen sowie deren Metastasen [FARKAS-HIMSLEY *et al.*, 1995], Astrozytomen und Neuroblastomen [LINGWOOD, 1999] gezeigt worden. Lingwood *et al.* [1999] ist es bereits gelungen, durch Gabe von Stx1 humane Astrozytom-Xenotransplantate in Nacktmäusen langfristig zu eliminieren. Hierbei konnte sowohl bei den Tumor- als auch bei den Endothelzellen der Neovaskulatur eine starke Stx1-vermittelte Apoptose beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Rückbildung und Eliminierung des Tumors nicht nur auf eine antineoplastische, sondern auch auf eine antiangiogenetische Wirkung des Stx1 zurückzuführen ist.

In malignen Pankreasgeweben konnte eine Korrelation zwischen der differentiellen Gb3Cer/CD77-Expression und dem Grad der Zelldifferenzierung nachgewiesen werden

---

( $P = 0,039$ ,  $\tau = 0,396$ ). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass Gb3Cer/CD77, ähnlich wie CD75s-1-Ganglioside, ein potentieller Marker für schlecht differenzierte Pankreaskarzinome und somit auch für eine ungünstige Prognose sein könnten. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Gb3Cer/CD77-Expression und weiteren klinischen Parametern wie der Ausdehnung des Tumors, dem Lymphknotenbefall etc. gefunden werden. In malignem Kolongewebe konnte weder eine Korrelation zwischen der Expression an Gb3Cer/CD77 und der anatomischen Ausbreitung des Tumors (TNM-Klassifikation) noch zwischen dem Gehalt an Gb3Cer/CD77 und dem histomorphologischen Grading festgestellt werden. Falguières *et al.* [2008] kamen zu demselben Ergebnis.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

GSL spielen eine Schlüsselrolle in vielen biologischen Prozessen, einschließlich der Tumorgenese. Die GSL-Analytik erfährt dank moderner, massenspektrometrischer Methoden einen rasanten Fortschritt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Technik zur strukturellen Charakterisierung von GSL entwickelt, die auf der direkten Kopplung der IR-MALDI-o-TOF-MS und des DC Overlay-Assays beruht. Hierbei werden drei komplementäre Methoden miteinander kombiniert: 1) die Trennung der GSL mittels DC, 2) ihre Detektion mit Oligosaccharid-spezifischen Proteinen und 3) die *in situ* MS von Protein-detektierten GSL. Die hohe Spezifität und Sensitivität der DC-IR-MALDI-o-TOF-MS konnten anhand verschiedener Detektionssysteme demonstriert werden. Es ließen sich sowohl GSL, die mit poly- und monoklonalen Antikörpern auf der DC-Platte detektiert wurden, als auch GSL, die mit verschiedenen Toxinen nachgewiesen wurden, massenspektrometrisch charakterisieren. Die Methode ermöglicht die Messung von GSL direkt auf der DC-Platte bis in den unteren Nanogrammbereich. Im besten Fall lag das Detektionslimit bei 0,6 ng. Zudem konnte gezeigt werden, dass für die DC-IR-MALDI-o-TOF-MS lediglich geringe Mengen an GSL aus Geweberohextrakten erforderlich sind und somit arbeitsintensive Aufreinigungsverfahren, die mit einem Materialverlust einhergehen, entfallen. Die Technik läßt sich erfolgreich zur Identifikation von tumorassoziierten GSL aus allen bisher untersuchten humanen Karzinomen einsetzen. Somit eröffnet die *in situ* DC-IR-MALDI-o-TOF-MS immundetektierter GSL neue Möglichkeiten zur spezifischen Charakterisierung von Nanogrammmengen an GSL aus sehr kleinen Gewebeproben im Milligrammbereich ohne aufwendige GSL-Isolierungsverfahren.

Nach Etablierung dieser Technik wurden GSL-Expressionsanalysen in humanen Pankreas- und Kolonkarzinomgeweben durchgeführt. Mittels DC-Immundetektion konnte gezeigt werden, dass es sich im Falle der  $\alpha$ 2-6-sialylierten CD75s-1-Ganglioside sowie der isomeren  $\alpha$ 2-3-sialylierten iso-CD75s-1-Ganglioside in Pankreaskarzinomgeweben um tumorassoziierte Strukturen handelt. Im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe zeigten 42,1% der Pankreaskarzinome eine Überexpression an CD75s-1-Gangliosiden und 65,8% einen erhöhten Gehalt an iso-CD75s-1-Gangliosiden. Neben diesen beiden Gangliosiden konnte auch das neutrale GSL Gb3Cer/CD77 als tumorassoziiertes Molekül identifiziert werden. Insgesamt wurde in 61,9% der Pankreastumoren und in 81,3% der Kolonkarzinome eine erhöhte Gb3Cer/CD77-Expression im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe nachgewiesen. In allen Fällen konnten die Daten der DC-Overlay-Assays mittels

fluoreszenzmikroskopischer und massenspektrometrischer Analysen bestätigt werden. Sowohl bei den CD75s-1-Gangliosiden als auch bei Gb3Cer/CD77 könnte es sich um potentielle Marker für eine ungünstige Prognose bei einer Erkrankung an Pankreaskrebs handeln, da ihre Expression mit einem schlecht- beziehungsweise undifferenzierten histomorphologischen Phänotyp korreliert.

CD75s-1-Ganglioside und das neutrale GSL Gb3Cer/CD77 sind von besonderem Interesse, da es sich bei ihnen um die Rezeptoren der Ribosomen-inaktivierenden Proteine ML-I/rViscumin beziehungsweise Stx1 handelt, deren zyotoxische Effekte auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden konnten. Die Verträglichkeit von rViscumin wurde unlängst in klinischen Phase-I-Studien an Patienten erfolgreich getestet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die tumorassoziierten CD75s-1- und iso-CD75s-1-Ganglioside sowie Gb3Cer/CD77 vielversprechende, hocheffiziente Targetstrukturen für potentielle Adjuvanttherapien zur Behandlung von Pankreas- und, im Falle von Gb3Cer/CD77, auch für Kolonkarzinome darstellen. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen verdeutlichen aber auch, dass eine Behandlung mit ML-I/rViscumin oder Stx1 nicht für alle Patienten gleichermaßen in Frage kommt, da nicht alle Tumore eine erhöhte CD75s-1-Gangliosid- beziehungsweise Gb3Cer/CD77-Expression gegenüber gesundem Gewebe aufwiesen. Dies ist ein weiteres Beispiel für die Notwendigkeit, Therapiekonzepte in Zukunft individuell auf den Patienten zuzuschneiden, um somit möglichst effektiv und nachhaltig Pankreas- und Kolonkarzinome mit GSL-basierten Konzepten therapieren zu können.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Mücke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I. 2007.  
*S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ 2007 - Ergebnis einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz (13.–14.10.2006). S3-Guidelines “Exocrine pancreatic cancer” 2007.*  
Z Gastroenterol **45**:487–523.
- Agapov II, Tonevitsky AG, Moysenovich MM, Maluchenko NV, Weyhenmeyer R, Kirpichnikov MP. 1999.  
*Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm.*  
FEBS Lett **452**:211-214.
- Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M, Flasnöcker M. 1999.  
*Thieme's Innere Medizin - TIM.*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 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.*  
J Cell Physiol **177**:646-660.
- Aspholm M, Olfat FO, Nordén J, Sondén B, Lundberg C, Sjöström R, Altraja S, Odenbreit S, Haas R, Wadström T, Engstrand L, Semino-Mora C, Liu H, Dubois A, Teneberg S, Arnqvist A, Borén T. 2006.  
*SabA is the H. pylori hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans.*  
PLoS Pathog **2**:e110.
- Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. 1999.  
*Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis.*  
Cancer Res **59**:2083-2090.
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. 1993.  
*Ribosome-inactivating proteins from plants.*  
Biochim Biophys Acta **1154**:237-282.
- Bergmann L, Aamdal S, Marreaud S, Lacombe D, Herold M, Yamaguchi T, Wilhelm-Ogunbiyi K, Lentzen H, Zwierzina H, European Organisation for Research and Treatment of Cancer. 2008.  
*Phase I trial of r viscumine (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001).*  
Eur J Cancer **44**:1657-1662.
- Berkenkamp S, Kirpekar F, Hillenkamp F. 1998.  
*Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids.*  
Science **281**: 260-262.

- Bernold DM, Sinicrope FA. 2006.  
*Advances in chemotherapy for colorectal cancer.*  
Clin Gastroenterol Hepatol **4**:808-821.
- Beuth J, Ko HL, Gabius HJ, Burrichter H, Oette K, Pulverer G. 1992.  
*Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients.*  
Clin Investig **70**:658-661.
- Beuth J, Ko HL, Tunggal L, Jeljaszewicz J, Steuer MK, Pulverer G. 1994.  
*Einfluß von wässrigen, auf Mistlektin-1 standardisierten Mistelextrakten auf die in-vitro (Tumor) Zellproliferation.*  
J Oncol **26**:1-6.
- Beuth J. 1997.  
*Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I.*  
Anticancer Drugs **8** (Suppl 1):S53-55.
- 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.
- Bocci V. 1993.  
*Mistletoe (viscum album) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review.*  
J Biol Regul Homeost Agents **7**:1-6.
- Boeck S, Stieber P, Holdenrieder S, Wilkowski R, Heinemann V. 2006.  
*Prognostic and therapeutic significance of carbohydrate antigen 19-9 as tumor marker in patients with pancreatic cancer.*  
Oncology **70**:255-264.
- Boeck S, Ankerst DP, Heinemann V. 2007.  
*The role of adjuvant chemotherapy for patients with resected pancreatic cancer: systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis.*  
Oncology **72**:314-321.
- Burda H. 2005.  
*Allgemeine Zoologie.*  
UTB Wissenschaft; Stuttgart.
- Burriss HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. 1997.  
*Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial.*  
J Clin Oncol **15**:2403-13.
- Chai W, Leteux C, Lawson AM, Stoll MS. 2003.  
*On-line overpressure thin-layer chromatographic separation and electrospray mass spectrometric detection of glycolipids.*  
Anal Chem **75**:118-125.

- Cheresh DA, Pytela R, Pierschbacher MD, Klier FG, Ruoslahti E, Reisfeld RA. 1987.  
*An Arg-Gly-Asp-directed receptor on the surface of human melanoma cells exists in an divalent cation-dependent functional complex with the disialoganglioside GD2.*  
J Cell Biol 1987 **105**:1163-1173.
- Chester MA. 1999.  
*IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids. Recommendations 1997.*  
Glycoconj J **16**:1-6.
- Chinnapen DJ, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer WI. 2007.  
*Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER.*  
FEMS Microbiol Lett **266**:129-137.
- Chu KU, Ravindranath MH, Gonzales A, Nishimoto K, Tam WY, Soh D, Bilchik A, Katopodis N, Morton DL. 2000.  
*Gangliosides as targets for immunotherapy for pancreatic adenocarcinoma.*  
Cancer **88**:1828-1836.
- Colombo-Benkmann M, Senninger N. 2005.  
*Chirurgie von Leber, Gallenwegen und Pankreas.*  
Lehmanns Media – LOB.de, Berlin.
- Dall'Olio F. 2000.  
*The sialyl- $\alpha$ 2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role.*  
Glycoconj J **17**:669-676.
- Dall'Olio F, Chiricolo M. 2001.  
*Sialyltransferases in cancer.*  
Glycoconj J 2001 **18**:841-850.
- Dall'Olio F, Chiricolo M, D'Errico A, Gruppioni E, Altimari A, Fiorentino M, Grigioni WF. 2004.  
*Expression of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase and of  $\alpha$ 2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis.*  
Glycobiology **14**:39-49.
- de Gramont A, Tournigand C, André T, Larsen AK, Louvet C. 2006.  
*Targeted agents for adjuvant therapy of colon cancer.*  
Semin Oncol **33**(6 Suppl 11):S42-45.
- Debuch H, Dawson RM. 1965.  
*Prof. J. L. W. Thudichum (1829-1901).*  
Nature **207**:814.
- Dietrich JB, Ribéreau-Gayon G, Jung ML, Franz H, Beck JP, Anton R. 1992.  
*Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album L.*) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins.*  
Anticancer Drugs **3**:507-511.
- Distler U. 2005.  
*Molekulargenetische und strukturelle Charakterisierung der CD75s-Struktur von humanen Tumoren des Gastrointestinaltraktes.*  
Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.

- 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. 2008a.  
*Matching IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry with the TLC overlay binding assay and its clinical application for tracing tumor-associated glycosphingolipids in hepatocellular and pancreatic cancer.*  
Anal Chem **80**:1835-1846.
- Distler U, Souady J, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Denz A, Grützmann R, Pilarsky C, Senninger N, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Schmidt MA, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2008b.  
*Tumor-associated CD75s- and iso-CD75s-gangliosides are potential targets for adjuvant therapy in pancreatic cancer.*  
Mol Cancer Ther **7**:2464-2475.
- Distler U, Souady J, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Friedrich AW, Karch H, Senninger N, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Schmidt MA, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2009.  
*Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer.*  
PloS One **4**:e6813.
- Dreisewerd K. 2003.  
*The desorption process in MALDI.*  
Chem Rev **103**:395-426.
- Dreisewerd K, Müthing J, Rohlfing A, Meisen I, Vukelić Z, 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.
- Duffy MJ. 1998.  
*CA 19-9 as a marker for gastrointestinal cancers: a review.*  
Ann Clin Biochem **35**:364-370.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, Lamerz R, Peltomaki P, Sturgeon C, Topolcan O. 2007.  
*Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use.*  
Eur J Cancer **43**:1348-1360.
- Duller C. 2008.  
*Einführung in die nichtparametrische Statistik mit SAS und R.*  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Durrant LG, Harding SJ, Green NH, Buckberry LD, Parsons T. 2006.  
*A new anticancer glycolipid monoclonal antibody, SC104, which directly induces tumor cell apoptosis.*  
Cancer Res **66**:5901-5909.
- Duvar S, Peter-Katalinić J, Hanisch FG, Müthing J. 1997.  
*Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated bovine aortic endothelial cells.*  
Glycobiology **7**:1099-1109.

- Eck J, Langer M, Möckel B, Baur A, Rothe M, Zinke H, Lentzen H. 1999a.  
*Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain.*  
Eur J Biochem **264**:775-784.
- Eck J, Langer M, Möckel B, Witthohn K, Zinke H, Lentzen H. 1999b.  
*Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains.*  
Eur J Biochem **265**:788-797.
- Ecsedy JA, Yohe HC, Bergeron AJ, Seyfried TN. 1998.  
*Tumor-infiltrating macrophages influence the glycosphingolipid composition of murine brain tumors.*  
J Lipid Res **39**:2218-2227.
- EGTM. [www.egtm.eu](http://www.egtm.eu). 2008
- Elsässer-Beile U, Ruhnau T, Freudenberg N, Wetterauer U, Mengs U. 2001.  
*Antitumoral effect of recombinant mistletoe lectin on chemically induced urinary bladder carcinogenesis in a rat model.*  
Cancer **91**:998-1004.
- Endo Y, Tsurugi K, Franz H. 1988.  
*The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein.*  
FEBS Lett **231**:378-380.
- 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.
- Falguières T, Maak M, von Weyhern C, Sarr M, Sastre X, Poupon MF, Robine S, Johannes L, Janssen KP. 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.
- 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.*  
Proc Natl Acad Sci U S A **92**:6996-7000.
- Fearon ER, Vogelstein B. 1990.  
*A genetic model for colorectal tumorigenesis.*  
Cell **61**: 759-767
- Feizi T. 1985.  
*Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens.*  
Nature **314**:53-57.
- Feizi T, Stoll MS, Yuen CT, Chai W, Lawson AM. 1994.  
*Neoglycolipids: probes of oligosaccharide structure, antigenicity, and function.*  
Methods Enzymol **230**:484-519.

- Feizi T. 2000a.  
*Progress in deciphering the information content of the 'glycome'--a crescendo in the closing years of the millennium.*  
Glycoconj J **17**:553-565.
- Feizi T. 2000b.  
*Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity.*  
Immunol Rev **173**:79-88.
- Feizi T, Chai W. 2004.  
*Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code.*  
Nat Rev Mol Cell Biol **5**:582-588.
- Franz H, Hausteil B, Luther P, Kuropka U, Kindt A. 1977.  
*Isolierung und Charakterisierung von Inhaltsstoffen der Mistel (Viscum album L.), I. Affinitätschromatographie von Mistelrohextrakt an fixierten Plasmaproteinen.*  
Acta biol Med Germ **36**:113-117.
- Franz H, Ziska P, Kindt A. 1981.  
*Isolation and properties of three lectins from mistletoe (Viscum album L.).*  
Biochem J **195**:481-484.
- Franz H. 1986.  
*Mistletoe lectins and their A and B chains.*  
Oncology **43** (Suppl 1):23-34.
- Franz H. 1990.  
*100 Jahre Lektinforschung – eine Bilanz.*  
Naturwissenschaften **77**:103-109.
- Fredman P, Hedberg K, Brezicka T. 2003.  
*Gangliosides as therapeutic targets for cancer.*  
BioDrugs **17**:155-167.
- Fujinaga Y. 2006.  
*Transport of bacterial toxins into target cells: pathways followed by cholera toxin and botulinum progenitor toxin.*  
J Biochem **140**:155-160.
- Fukui S, Feizi T, Galustian C, Lawson AM, Chai W. 2002.  
*Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions.*  
Nat Biotechnol **20**:1011-1017.
- Geißler M, Graeven U. 2005.  
*Das kolorektale Karzinom.*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. 2007.  
*Biology and management of pancreatic cancer.*  
Gut **56**:1134-1152.
- Gillard BK, Thurmon LT, and Marcus DM. 1993.  
*Variable subcellular localization of glycosphingolipids.*  
Glycobiology **3**:57-67.

- 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.
- Goldstein MJ, Mitchell EP. 2005.  
*Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer.*  
Cancer Invest **23**:338-351.
- Goodin S. 2008.  
*Development of monoclonal antibodies for the treatment of colorectal cancer.*  
Am J Health Syst Pharm **65**(11 Suppl 4):S3-7.
- Gordon J, Mellstedt H,  aman P, Biberfeld P, Bj orkholm M, Klein G. 1983.  
*Phenotypes in chronic B-lymphocytic leukemia probed by monoclonal antibodies and immunoglobulin secretion studies: identification of stages of maturation arrest and the relation to clinical findings.*  
Blood **62**:910-917.
- Gouaze-Andersson V, Cabot MC. 2006.  
*Glycosphingolipids and drug resistance.*  
Biochim Biophys Acta **1758**:2096-2103.
- Griesel H, Postel H. 1990.  
*Grundkurs Stochastik.*  
Schr odel Schulbuchverlag GmbH, Hannover.
- Guittard J, Hronowski XL, Costello CE. 1999.  
*Direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of glycosphingolipids on thin layer chromatographic plates and transfer membranes.*  
Rapid Commun Mass Spectrom **13**:1838-1849.
- Habeck M. 2003.  
*Mistletoe compound enters clinical trials.*  
Drug Discov Today **8**:52-53.
- Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. 1989.  
*Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients.*  
Cancer Res **49**:4803-4808.
- Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ. 1990.  
*Increased secretion of tumor necrosis factors  $\alpha$ , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to  $\beta$ -galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract.*  
Cancer Res **50**:3322-3326.
- Hajto T, Hostanska K, Fischer J, Saller R. 1997.  
*Immunomodulatory effects of Viscum album agglutinin-I on natural immunity.*  
Anticancer Drugs **8** (Suppl 1):43-46.
- Hakomori S. 1989.  
*Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens.*  
Adv Cancer Res **52**:257-331.

- Hakomori S. 1990.  
*Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions.*  
J Biol Chem **265**:18713-18716.
- Hakomori S. 1992.  
*Functional role of glycosphingolipids in tumor progression.*  
Tohoku J Exp Med **168**:211-222.
- Hakomori S. 1996.  
*Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism.*  
Cancer Res **56**:5309-5318.
- Hakomori S, Zhang Y. 1997.  
*Glycosphingolipid antigens and cancer therapy.*  
Chem Biol **4**:97-104.
- Hakomori S, Handa K, Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A. 1998.  
*New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain," a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules ,involved in cell adhesion coupled with signaling.*  
Glycobiology **8**:xi-xix.
- Hakomori S. 2002a.  
*The glycosynapse.*  
Proc Natl Acad Sci USA **99**:225-232.
- Hakomori S. 2002b.  
*Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle.*  
Proc Natl Acad Sci U S A **99**:10231-10233.
- Hakomori S, Handa K. 2002.  
*Glycosphingolipid-dependent cross-talk between glycosynapses interfacing tumor cells with their host cells: essential basis to define tumor malignancy.*  
FEBS Lett **531**:88-92.
- Hakomori S. 2004.  
*Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization.*  
Glycoconj J **21**:125-137.
- Hakomori SI. 2008.  
*Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends.*  
Biochim Biophys Acta **1780**:325-346.
- Hart AR, Kennedy H, Harvey I. 2008.  
*Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation.*  
Clin Gastroenterol Hepatol **6**:275-282.
- Hedlund M, Ng E, Varki A, Varki NM. 2008.  
 *$\alpha$ 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo.*  
Cancer Res **68**:388-394.
- Hidari KI, Shimada S, Suzuki Y, Suzuki T. 2007.  
*Binding kinetics of influenza viruses to sialic acid-containing carbohydrates.*  
Glycoconj J **24**:583-590.

- Hildebrandt H, Jonas U, Ohashi M, Klaiber I, Rahmann H. 1999.  
*Direct electrospray-ionization mass spectrometric analysis of the major ganglioside from crucian carp liver after thin layer chromatography.*  
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **122**:83-88.
- Hillenkamp F, Peter-Katalinic J. 2007.  
*MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications.*  
Wiley-VCH, Weinheim, Berlin.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. 2000.  
*Progression model for pancreatic cancer.*  
Clin Cancer Res **6**:2969-2972.
- Ichikawa D, Kitamura K, Tani N, Nishida S, Tsurutome H, Hakomori S, Ikeda E, Mutoh F, Kurioka H, Yamagishi H. 2000.  
*Molecular detection of disseminated cancer cells in the peripheral blood and expression of sialylated antigens in colon cancers.*  
J Surg Oncol **75**:98-102.
- Ivleva VB, Elkin YN, Budnik BA, Moyer SC, O'Connor PB, Costello CE. 2004.  
*Coupling thin-layer chromatography with vibrational cooling matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry for the analysis of ganglioside mixtures.*  
Anal Chem **76**:6484-6491.
- Ivleva VB, Sapp LM, O'Connor PB, Costello CE. 2005.  
*Ganglioside analysis by thin-layer chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry.*  
J Am Soc Mass Spectrom **16**:1552-1560.
- Janssen KP, Vignjevic D, Boisgard R, Falguières T, Bousquet G, Decaudin D, Dollé 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.
- Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D. 1993.  
*In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis).*  
Arzneimittelforschung **43**:1221-1227.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. 2008.  
*Cancer statistics, 2008.*  
CA Cancer J Clin **58**:71-96.
- Johannes L, Decaudin D. 2005.  
*Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy.*  
Gene Ther **12**:1360-1368.
- Johansson P, Nilsson J, Angström J, Miller-Podraza H. 2005.  
*Interaction of Helicobacter pylori with sialylated carbohydrates: the dependence on different parts of the binding trisaccharide Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc.*  
Glycobiology **15**:625-636.
- Junginger T, Hermanek P, Klimpfinger M. 2002.  
*Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts I.*  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

- Kakugawa Y, Wada T, Yamaguchi K, Yamanami H, Ouchi K, Sato I, Miyagi T. 2002.  
*Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression.*  
Proc Natl Acad Sci U S A **99**:10718-10723.
- Kalisiak A, Minniti JG, Oosterwijk E, Old LJ, Scheinberg DA. 1991.  
*Neutral glycosphingolipid expression in B-cell neoplasms.*  
Int J Cancer **49**:837-845.
- Kannagi R. 2007.  
*Carbohydrate antigen sialyl Lewis a - its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression.*  
Chang Gung Med J **30**:189-209.
- Kannagi R, Yin J, Miyazaki K, Izawa M. 2008.  
*Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants - Hakomori's concepts revisited.*  
Biochim Biophys **1780**:525-531.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988.  
*Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.*  
Anal Chem **60**:2299-2301.
- 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. 2004.  
*Infection by Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview.*  
Mol Biotechnol **26**:117-122.
- 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.
- Kienle GS. 1999.  
*The story behind mistletoe: a European remedy from anthroposophical medicine.*  
Altern Ther Health Med **5**:34-36.
- Kiguchi K, Henning-Chubb CB, Huberman E. 1990.  
*Glycosphingolipid patterns of peripheral blood lymphocytes, monocytes, and granulocytes are cell specific.*  
J Biochem **107**:8-14.
- Kiguchi K, Iwamori Y, Suzuki N, Kobayashi Y, Ishizuka B, Ishiwata I, Kita T, Kikuchi Y, Iwamori M. 2006.  
*Characteristic expression of globotriaosyl ceramide in human ovarian carcinoma-derived cells with anticancer drug resistance.*  
Cancer Sci **97**:1321-1326.

- Kindler HL, Friberg G, Singh DA, Locker G, Nattam S, Kozloff M, Taber DA, Karrison T, Dachman A, Stadler WM, Vokes EE. 2005.  
*Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer.*  
J Clin Oncol **23**:8033-8040.
- Klein B, Gottfried M. 2007.  
*Targeted agents to improve treatment results in colon cancer: bevacizumab and cetuximab.*  
J BUON **12** Suppl 1:S127-136
- Konowalchuk J, Speirs JJ, Stavric S. 1977.  
*Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli.*  
Infect Immun **18**:775-779.
- Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG. 1992.  
*Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha.*  
J Clin Invest **90**:1352-1360.
- 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 U S A **102**:19087-19092.
- Krauspenhaar R, Eschenburg S, Perbandt M, Kornilov V, Konareva N, Mikailova I, Stoeva S, Wacker R, Maier T, Singh T, Mikhailov A, Voelter W, Betzel C. 1999.  
*Crystal structure of mistletoe lectin I from Viscum album.*  
Biochem Biophys Res Commun **257**:418-424.
- Kushi Y, Handa S. 1985.  
*Direct analysis of lipids on thin layer plates by matrix-assisted secondary ion mass spectrometry.*  
J Biochem **98**:265-268.
- LaCasse EC, Bray MR, Patterson B, Lim WM, Perampalam S, Radvanyi LG, Keating A, Stewart AK, Buckstein R, Sandhu JS, Miller N, Banerjee D, Singh D, Belch AR, Pilarski LM, Gariépy J. 1999.  
*Shiga-like toxin-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34(+) hematopoietic stem cells: implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation.*  
Blood **94**:2901-2910.
- Ladisch S, Sweeley CC, Becker H, Gage D. 1989.  
*Aberrant fatty acyl  $\alpha$ -hydroxylation in human neuroblastoma tumor gangliosides.*  
J Biol Chem **264**:12097-12105.
- Ledeen RW, Yu RK. 1982.  
*Gangliosides: structure, isolation, and analysis.*  
Methods Enzymol **83**:139-191.
- Lehnert H, Werdan K. 2006.  
*Innere Medizin – essentials.*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Lencer WI, Saslowsky D. 2005.  
*Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins.*  
Biochim Biophys Acta **1746**:314-321.
- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. 2004.  
*Pancreatic cancer.*  
Lancet **363**:1049-1057.
- Liang JJ, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, Tan D. 2009.  
*Diagnostic and prognostic biomarkers in pancreatic carcinoma.*  
Int J Clin Exp Pathol **2**:1-10.
- 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 Gb<sub>3</sub>.*  
Biochemistry **37**:1777-1788.
- Lingwood CA. 1996.  
*Role of verotoxin receptors in pathogenesis.*  
Trends Microbiol. **4**:147-153.
- Lingwood CA. 1999.  
*Verotoxin/globotriaosyl ceramide recognition: angiopathy, angiogenesis and antineoplasia.*  
Biosci Rep **19**:345-354.
- Lloyd KO, Furukawa K. 1998.  
*Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances.*  
Glycoconj J **15**:627-636.
- 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 Commun Mass Spectrom **17**:2508-2516.
- Lochnit G, Geyer R, Heinz E, Rietschel ET, Zähringer U, Müthing J. 2001.  
*Chapter 7.5. Chemical biology and biomedicine: glycolipids and glycosphingolipids.*  
In: *Glycoscience-chemistry and chemical biology I-III*, 2185-2237, edited by: Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J.  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Löhr JM, Heinemann V, Friess H. 2003.  
*Pankreaskarzinom – Aktuelle Diagnostik und Therapie.*  
UNI-MED Verlag AG, Bremen.
- Lopez PH, Schnaar RL. 2006.  
*Determination of glycolipid-protein interaction specificity.*  
Methods Enzymol **417**:205-220.
- Lottspeich F, Engels JW. 2006.  
*Bioanalytik.*  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P. 2005.  
*Risk factors for pancreatic cancer.*  
J Cell Biochem **95**:649-656.

- Lundquist JJ, Toone EJ. 2002.  
*The cluster glycoside effect.*  
Chem Rev **102**:555-578.
- Luther P. 1982.  
*Lektin und Toxin der Mistel – Aberglaube und moderne Forschung.*  
Akademie-Verlag, Berlin.
- Luther P, Becker, H. 1987.  
*Die Mistel: Botanik, Lektine, medizinische Anwendung.*  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Lutsch G, Noll F, Ziska P, Kindt A, Franz H. 1984.  
*Electron microscopic investigations on the structure of lectin I from Viscum album L.*  
FEBS Lett **170**:335-338.
- Lynch HT, de la Chapelle A. 2003.  
*Hereditary colorectal cancer.*  
N Engl J Med **348**:919-932.
- Macher BA, Lee WM, Westrick MA. 1982.  
*Glycosphingolipids of normal and leukemic human leukocytes.*  
Mol Cell Biochem **47**:81-95.
- Maggio B, Fanani ML, Rosetti CM, Wilke N. 2006.  
*Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: an assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface.*  
Biochim Biophys Acta **1758**:1922-1944.
- Magnani JL, Spitalnik SL, Ginsburg V. 1987.  
*Antibodies against cell surface carbohydrates: determination of antigen structure.*  
Methods Enzymol **138**:195-207.
- Mahfoud R, Manis A, Lingwood CA. 2008.  
*Fatty acid-dependent globotriaosyl ceramide receptor function in detergent resistant model membranes.*  
J Lipid Res: *in press*.
- Mano MS, Duhoux F. 2008.  
*Colon cancer: update on adjuvant therapy.*  
Clin Colorectal Cancer **7**:178-183.
- Meisen I, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2003.  
*Discrimination of neolacto-series gangliosides with  $\alpha$ 2-3- and  $\alpha$ 2-6-linked N-acetylneuraminic acid by nanoelectrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem quadrupole TOF MS.*  
Anal Chem **75**:5719-5725.
- Meisen I, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2004.  
*Direct analysis of silica gel extracts from immunostained glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry.*  
Anal Chem **76**:2248-2255.

- Meisen I, Friedrich AW, Karch H, Witting U, Peter-Katalinić J, Müthing J. 2005.  
*Application of combined high-performance thin-layer chromatography immunostaining and nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry to the structural characterization of high- and low-affinity binding ligands of Shiga toxin 1.*  
Rapid Commun Mass Spectrom **19**:3659-3665.
- Mendelsohn J. 2001.  
*The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy.*  
Endocr Relat Cancer **8**:3-9.
- Mengs U, Göthel D, Leng-Peschlow E. 2002.  
*Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research.*  
Anticancer Res **22**:1399-1407.
- 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.
- Miller-Podraza H, Lanne B, Angström J, Teneberg S, Milh MA, Jovall PA, Karlsson H, Karlsson KA. 2005.  
*Novel binding epitope for Helicobacter pylori found in neolacto carbohydrate chains: structure and cross-binding properties.*  
J Biol Chem **280**:19695-19703.
- Mimeault M, Brand RE, Sasson AA, Batra SK. 2005.  
*Recent advances on the molecular mechanisms involved in pancreatic cancer progression and therapies.*  
Pancreas **31**:301-316.
- Miyamoto S. 2006.  
*Clinical applications of glycomic approaches for the detection of cancer and other diseases.*  
Curr Opin Mol Ther **8**:507-513.
- Moisenovich M, Tonevitsky A, Agapov I, Niwa H, Schewe H, Bereiter-Hahn J. 2002.  
*Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells.*  
EJCB **81**:529-538.
- Morelle W, Michalski JC. 2005.  
*Glycomics and mass spectrometry.*  
Curr Pharm Des **11**:2615-2645.
- Mukherjee S, Soe TT, Maxfield FR. 1999.  
*Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails.*  
J Cell Biol **144**:1271-1284.
- Murray LJ, Habeshaw JA, Wiels J, Greaves MF. 1985.  
*Expression of Burkitt lymphoma-associated antigen (defined by the monoclonal antibody 38.13) on both normal and malignant germinal-centre B cells.*  
Int J Cancer **36**:561-565.

- 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.
- Müthing J, Duvar S, Heitmann D, Hanisch FG, 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. 2000.  
*Analyses of glycosphingolipids by high-performance liquid chromatography.*  
Methods Enzymol **312**:45-64.
- Müthing J, Burg M, Möckel B, Langer M, Metelmann-Strupat W, Werner A, Neumann U, Peter-Katalinic J, Eck J. 2002.  
*Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally  $\alpha$ 2-6-sialylated neolacto-series gangliosides.*  
Glycobiology **12**:485-497.
- Müthing J, Meisen I, Bulau P, Langer M, Witthohn K, Lentzen H, Neumann U, Peter-Katalinić J. 2004.  
*Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc residues.*  
Biochemistry **43**:2996-3007.
- Müthing J, Meisen I, Kniep B, Haier J, Senninger N, Neumann U, Langer M, Witthohn K, Milosević J, Peter-Katalinić J. 2005.  
*Tumor-associated CD75s gangliosides and CD75s-bearing glycoproteins with Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-residues are receptors for the anticancer drug rViscumin.*  
FASEB J **19**:103-105.
- Müthing J, Schweppe CH, Karch H, Friedrich AW. 2009.  
*Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury.*  
Thromb Haemost **101**:252-264.
- Myoga A, Taki T, Arai K, Sekiguchi K, Ikeda I, Kurata K, Matsumoto M. 1988.  
*Detection of patients with cancer by monoclonal antibody directed to lactoneotetraosylceramide (paragloboside).*  
Cancer Res **48**:1512-1516.
- Nakamura K, Suzuki Y, Goto-Inoue N, Yoshida-Noro C, Suzuki A. 2006.  
*Structural characterization of neutral glycosphingolipids by thin-layer chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight MS/MS.*  
Anal Chem **78**:5736-5743.
- Narayanan S, Surendranath K, Bora N, Surolia A, Karande AA. 2005.  
*Ribosome inactivating proteins and apoptosis.*  
FEBS Lett **579**:1324-1331.

- Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Büchler MW, European Study Group for Pancreatic Cancer. 2001.  
*Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial.*  
Lancet **358**:1576-1585.
- Neuhaus P, Wittekind C. 2007.  
*Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts II.*  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Niimura Y, Ishizuka I. 2006.  
*Isolation and identification of nine sulfated glycosphingolipids containing two unique sulfated gangliosides from the African green monkey kidney cells, Verots S3, and their possible metabolic pathways.*  
Glycobiology **16**:729-735.
- Nilsson O, Månsson JE, Tibblin E, Svennerholm L. 1981.  
*Gangliosides of human meconium - detection of a possible fetal antigen.*  
FEBS Lett **133**:197-200.
- Nilsson O, Lindholm L, Holmgren J, Svennerholm L. 1985.  
*Monoclonal antibodies raised against NeuAca2-6neolactotetraosylceramide detect carcinoma-associated gangliosides.*  
Biochim Biophys Acta **835**:577-583.
- Niwa H, Tonevitsky AG, Agapov II, Saward S, Pfüller U, Palmer RA. 2003.  
*Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose.*  
Eur J Biochem **270**:2739-2749.
- 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.
- O'Connor PB, Budnik BA, Ivleva VB, Kaur P, Moyer SC, Pittman JL, Costello CE. 2004.  
*A high pressure matrix-assisted laser desorption ion source for Fourier transform mass spectrometry designed to accommodate large targets with diverse surfaces.*  
J Am Soc Mass Spectrom **15**:128-132.
- OECD. [www.oecd.org](http://www.oecd.org). 2006
- Olsnes S, Stirpe F, Sandvig K, Pihl A. 1982.  
*Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from Viscum album L. (mistletoe).*  
J Biol Chem **257**:13263-13270.
- Ono M, Handa K, Withers DA, Hakomori S. 1999.  
*Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation.*  
Cancer Res **59**:2335-2339.
- Peumans WJ, Verhaert P, Pfüller U, Van Damme EJM. 1996.  
*Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (Viscum album).*  
FEBS Lett **396**:261-265.

- Pilobello KT, Mahal LK. 2007.  
*Deciphering the glycode: the complexity and analytical challenge of glycomics.*  
Curr Opin Chem Biol **11**:300-305.
- Pingoud A, Urbanke C. 1997.  
*Arbeitsmethoden der Biochemie.*  
de Gruyter, Berlin, New York.
- Pipas JM, Barth RJ, Zaki B, Tsapakos MJ, Suriawinata AA, Bettmann MA, Cates JM, Ripple GH, Sutton JE, Gordon SR, McDonnell CE, Perez RP, Redfield N, Meyer LP, Marshall JF, Cole BF, Colacchio TA. 2005.  
*Docetaxel/Gemcitabine followed by gemcitabine and external beam radiotherapy in patients with pancreatic adenocarcinoma.*  
Ann Surg Oncol **12**:995-1004.
- Pour PM, Konishi Y, Klöppel G, Longnecker DS. 1994.  
*Atlas of Exocrine Pancreatic Tumors.*  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Pryme IF, Bardocz S, Pusztai A, Ewen SW. 2006.  
*Suppression of growth of tumour cell lines in vitro and tumours in vivo by mistletoe lectins.*  
Histol Histopathol **21**:285-299.
- Pschyrembel, W. 2007.  
*Klinisches Wörterbuch.*  
de Gruyter, Berlin, New York.
- Raman R, Venkataraman M, Ramakrishnan S, Lang W, Raguram S, Sasisekharan R. 2006.  
*Advancing glycomics: implementation strategies at the consortium for functional glycomics.*  
Glycobiology **16**:82R-90R.
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2008.  
Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Berlin.
- 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 U S A **91**:11889-11893.
- 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.*  
Anal Chem **79**:5793-5808.
- Roque-Navarro L, Chakrabandhu K, de León J, Rodríguez S, Toledo C, Carr A, de Acosta CM, Hueber AO, Pérez R. 2008.  
*Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity.*  
Mol Cancer Ther **7**:2033-2041.
- Rostock M, Huber R, Greiner T, Fritz P, Scheer R, Schueler J, Fiebig HH. 2005.  
*Anticancer activity of a lectin-rich mistletoe extract injected intratumorally into human pancreatic cancer xenografts.*  
Anticancer Res **25**:1969-1975.

- Sandhoff K, Kolter T. 2003.  
*Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids.*  
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**:847-861.
- Sandvig K. 2001.  
*Shiga toxins.*  
Toxicol **39**:1629-1635.
- Sandvig K, van Deurs B. 2002a.  
*Membrane traffic exploited by protein toxins.*  
Annu Rev Cell Dev Biol **18**:1-24.
- Sandvig K, van Deurs B. 2002b.  
*Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin.*  
FEBS Lett **529**:49-53.
- Scharlau W. 2000.  
*Mathematik in Biologie und Geowissenschaften.*  
LIT VERLAG, Münster-Hamburg-Berlin-London.
- Schlee D, Kleber HP. 1991.  
*Wörterbücher der Biologie; Biotechnologie Teil I/Teil II.*  
Gustav Fischer Verlag, Jena
- Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Fleig W, Fölsch UR, Fröhmann P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kopp I, T. Kühlbacher TK, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Rödel C, Sauer R, Sauerbruch T, Schmitt W, Schmoll HJ, Zeitz M, Selbmann HK. 2008.  
*S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“-Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./7. Februar 2004 und am 8./9. Juni 2007 (für die Themenkomplexe IV, VI und VII). S3-Guideline „Colorectal Cancer“ 2004/2008.*  
Z Gastroenterol **46**:1-73.
- Schnaar RL. 1991.  
*Glycosphingolipids in cell surface recognition.*  
Glycobiology **1**:477-485.
- Schnaar RL. 2004.  
*Glycolipid-mediated cell-cell recognition in inflammation and nerve regeneration.*  
Arch Biochem Biophys **426**:163-172.
- Schöffski P, Riggert S, Fumoleau P, Campone M, Bolte O, Marreaud S, Lacombe D, Baron B, Herold M, Zwierzina H, Wilhelm-Ogunbiyi K, Lentzen H, Twelves C, European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. 2004.  
*Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group.*  
Ann Oncol **15**:1816-1824.
- Schöffski P, Breidenbach I, Krauter J, Bolte O, Stadler M, Ganser A, Wilhelm-Ogunbiyi K, Lentzen H. 2005.  
*Weekly 24 h infusion of aviscumine (rViscumin): a phase I study in patients with solid tumours.*  
Eur J Cancer **41**:1431-1438.
- Schulmann K, Reiser M, Schmiegel W. 2002.  
*Colonic cancer and polyps.*  
Best Pract Res Clin Gastroenterol **16**:91-114.

- Schumacher U, Feldhaus S, Mengs U. 2000.  
*Recombinant mistletoe lectin (rML) is successful in treating human ovarian cancer cells transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice.*  
Cancer Lett **150**:171-175.
- 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.*  
Glycoconj J **25**:291-304.
- Scotland SM, Smith HR, Rowe B. 1985.  
*Two distinct toxins active on Vero cells from Escherichia coli O157.*  
Lancet **2**:885-886.
- Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K. 2000.  
*High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma.*  
Cancer **88**:2239-2245.
- Simons K, Ikonen E. 1997.  
*Functional rafts in cell membranes.*  
Nature **387**:569-572.
- Sobin LH, Wittekind C. 2002.  
*TNM classification of malignant tumours, 6<sup>th</sup> ed.*  
Wiley-VHC, Weinheim, Berlin.
- Soler MH, Stoeva S, Schwamborn C, Wilhelm S, Stiefel T, Voelter W. 1996.  
*Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I.*  
FEBS Lett **399**:153-157.
- Soler MH, Stoeva S, Voelter W. 1998.  
*Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I.*  
Biochem Biophys Res Commun **246**:596-601.
- Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. 2006a.  
*Gangliosides as components of lipid membrane domains.*  
Glycobiology **17**:1R-13R.
- Sonnino S, Prinetti A, Mauri L, Chigorno V, Tettamanti G. 2006b.  
*Dynamic and structural properties of sphingolipids as driving forces for the formation of membrane domains.*  
Chem Rev **106**:2111-2125.
- Sorice M, Longo A, Garofalo T, Mattei V, Misasi R, Pavan A. 2004.  
*Role of GM3-enriched microdomains in signal transduction regulation in T lymphocytes.*  
Glycoconj J **20**:63-70.
- Stauder H, Kreuser ED. 2002.  
*Mistletoe extracts standardised in terms of mistletoe lectins (ML I) in oncology: current state of clinical research.*  
Onkologie **25**:374-380.

- Steelant WF, Kawakami Y, Ito A, Handa K, Bruyneel EA, Mareel M, Hakomori S. 2002.  
*Monosialyl-Gb5 organized with cSrc and FAK in GEM of human breast carcinoma MCF-7 cells defines their invasive properties.*  
FEBS Lett **531**:93-98.
- Stein GM, Henn W, Laue HB, Berg PA. 1998.  
*Modulation of the cellular and humoral immune responses of tumor patients by mistletoe therapy.*  
Eur J Med Res **3**:194-202.
- Stirpe F, Legg RF, Onyon LJ, Ziska P, Franz H. 1980.  
*Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from Viscum album L. (mistletoe).*  
Biochem J **190**:843-845.
- Stirpe F, Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. 1982.  
*Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture.*  
J Biol Chem **257**:13271-13277.
- Stirpe F, Battelli MG. 2006.  
*Ribosome-inactivating proteins: progress and problems.*  
Cell Mol Life Sci **63**:1850-1866.
- Stoeva S, Franz M, Wacker R, Krauspenhaar R, Guthöhrlein E, Mikhailov A, Betzel C, Voelter W. 2001.  
*Primary structure, isoforms, and molecular modeling of a chitin-binding mistletoe lectin.*  
Arch Biochem Biophys **392**:23-31.
- 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.
- Sultana A, Ghaneh P, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Smith CT. 2008.  
*Gemcitabine based combination chemotherapy in advanced pancreatic cancer-indirect comparison.*  
BMC Cancer **8**:192.
- Svennerholm L. 1963.  
*Chromatographic separation of human brain gangliosides.*  
J Neurochem **10**:613-623.
- Taki T, Kojima S, Seto H, Yamada H, Matsumoto M. 1984.  
*Glycolipid composition of ascitic fluids from patients with cancer.*  
J Biochem **96**:1257-1265.
- Taki T, Ishikawa H, Imai K, Yachi A, Matsumoto M. 1985.  
*Immunological analysis of glycolipids on cell surfaces of cultured human tumor cell lines: expression of lactoneotetraosylceramide on tumor cell surfaces.*  
J Biochem **98**:887-895.
- Taki T, Yamamoto K, Takamatsu M, Ishii K, Myoga A, Sekiguchi K, Ikeda I, Kurata K, Nakayama J, Handa S. 1990.  
*Accumulation of gangliosides with N-acetylneuraminosyl( $\alpha$ 2-6)lactosamine structure in primary human hepatoma.*  
Cancer Res **50**:1284-1290.

- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. 2005.  
*Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome.*  
Lancet **365**:1073-1086.
- Thies A, Dautel P, Meyer A, Pfüller U, Schumacher U. 2008.  
*Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model.*  
Br J Cancer **98**:106-112.
- Todeschini AR, Hakomori SI. 2008.  
*Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains.*  
Biochim Biophys Acta **1780**:421-433.
- Tonevitsky AG, Shamshiev AT, Prokoph'ev SA, Agapov II, Toptygin Ayu. 1995.  
*Hybridoma cells producing antibodies against A-chain of mistletoe lectin I are resistant to this toxin.*  
Immunol Lett **46**:5-8.
- Unger SE, Vincze A, Cooks RG, Chrisman R, Rothman LD. 1981.  
*Identification of quaternary alkaloids in mushroom by chromatography/secondary ion mass spectrometry.*  
Anal Chem **53**:976-981.
- Valentiner U, Pfüller U, Baum C, Schumacher U. 2002.  
*The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro.*  
Toxicology **171**:187-199.
- van Echten-Deckert G, Guravi M. 2008.  
*Golgi localization of glycosyltransferases involved in ganglioside biosynthesis.*  
Curr Drug Targets **9**:282-291.
- Varki A. 2007.  
*Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins.*  
Nature **446**:1023-1029.
- Vergil, Norden E. 1976.  
*P. Vergilius Maro Aeneis Buch VI. 6. Edition.*  
de Gruyter, Berlin, New York.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 2004.  
*Cancer genes and the pathways they control.*  
Nat Med **10**:789-799.
- Vukelić Z, Zamfir AD, Bindila L, Froesch M, Peter-Katalinić J, Usuki S, Yu RK. 2005.  
*Screening and sequencing of complex sialylated and sulfated glycosphingolipid mixtures by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.*  
J Am Soc Mass Spectrom **16**:571-580.
- Walz G. 2004.  
*Lexikon der Statistik.*  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Weinberg RA. 2007.  
*The Biology of Cancer.*

---

Taylor & Francis, Garland Science, London.

Weiß C. 2008.

*Basiswissen Medizinische Statistik.*

Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. 2005.

*Colorectal cancer.*

Lancet **365**:153-165.

WHO. [www.who.int](http://www.who.int). 2008

Wolpin BM, Mayer RJ. 2008.

*Systemic treatment of colorectal cancer.*

Gastroenterology **134**:1296-1310.

Xiong HQ. 2004.

*Molecular targeting therapy for pancreatic cancer.*

Cancer Chemother Pharmacol **54**(Suppl 1):S69-77.

Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, Deutsch J, Needle M, Abbruzzese JL. 2004.

*Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial.*

J Clin Oncol **22**:2610-2616.

Yamakawa T. 1996.

*A reflection on the early history of glycosphingolipids.*

Glycoconj J **13**:123-126.

Young JJ. 1965.

*The Prose Edda of Snorri Sturluson. Tales from Norse Mythology.* 80-83.

University of California Press, Berkeley.

Yohe HC, Wallace PK, Berenson CS, Ye S, Reinhold BB, Reinhold VN. 2001.

*The major gangliosides of human peripheral blood monocytes/macrophages: absence of ganglio series structures.*

Glycobiology **11**:831-841.

Yowler BC, Schengrund CL. 2004.

*Glycosphingolipids-sweets for botulinum neurotoxin.*

Glycoconj J **21**:287-293.

Yu RK, Saito M. 1989.

*Structure and localization of gangliosides.*

In: *Neurobiology of glycoconjugates*, 1, edited by Margolis RU, Margolis RK.

Plenum Press, New York.

Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G. 2004.

*Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system.*

J Lipid Res **45**:783-793.

Zheng M, Fang H, Tsuruoka T, Tsuji T, Sasaki T, Hakomori S. 1993.

*Regulatory role of GM<sub>3</sub> ganglioside in  $\alpha 5\beta 1$  integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells.*

J Biol Chem **268**:2217-2222.

## 7 ANHANG

### 7.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Blaugel (Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator)	Merck KGaA, Darmstadt
BSA (Fraktion V; pH 7,0; lyophil.)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dichlorid)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Fluorescence Mounting Medium	Dako Germany, Hamburg
Formaldehydlösung (3,7%)	Fischar, Saarbrücken
Glyzerin	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
<i>n</i> -Hexan	Merck KGaA, Darmstadt
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Riedel-de Haën AG, Seelze
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel-de Haën AG, Seelze
KOH	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
NaN <sub>3</sub>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Orcin (3,5-Dihydroxytoluol-Monohydrat)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Plexigum (Polyisobutylmethacrylat)	Röhm, Darmstadt
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 21	Uniquema, Redcar, UK
ZnCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt

---

## 7.2 TUMOR- UND KONTROLLPROBEN

Vor der Durchführung der analytischen Arbeiten wurden sowohl den Pankreas- und Kolon- als auch den Leberkarzinomproben aus Datenschutzgründen Laborjournalcodenummern zugeordnet. Hierbei geben die ersten beiden Buchstaben die Initialen des Experimentators (UD = Ute Distler; JM = Johannes Müthing; JS = Jamal Souady) an. Die nachfolgende Nummer bezeichnet das Laborjournal (01 = Laborjournal 1). Daraufhin folgt die Angabe der Seite, auf welcher die Probe zum ersten Mal beschrieben wird. Zum Schluss wird die Nummer der Probe angegeben. Die Nummerierung erfolgte hierbei willkürlich, das heißt sie gibt lediglich die Reihenfolge, in welcher die einzelnen Proben untersucht wurden wieder und steht somit in keinem Zusammenhang mit pathologischen Daten oder den nach Auswertung der experimentellen Daten zugewiesenen Rängen.

Für die analytischen Arbeiten wurden von Herrn Prof. Dr. Johannes Müthing je ein Geweberohextrakt aus gesundem sowie malignem Pankreas- und Lebergewebe zur Verfügung gestellt. Dipl.-Biotechnologe Jamal Souady stellte Geweberohextrakte aus normalem und malignem Gewebe eines Leberkarzinompatienten bereit.

## 7.2.1 Pankreas

**Tabelle 7-1: Pathologische Daten und Laborjournalcodenummern der Pankreaskarzinome sowie Feuchtgewichte der gesunden und malignen Pankreasgewebeprobe<sup>1</sup>.**

Patient	Code	pT	pN <sup>2</sup>	pM <sup>2</sup>	UICC-Stage <sup>2</sup>	G <sup>2</sup>	Gewebefeuchtgewicht [mg]	
							Normal	Tumor
1	UD02/266-4	3	1	0	IIB	3	23,52	31,49
2	UD02/266-6	3	1	0	IIB	4	47,36	80,46
3	UD02/266-7	3	1	0	IIB	2	22,87	39,24
4	UD02/266-9	3	1	0	IIB	2	38,52	59,76
5	UD02/266-10	3	1	0	IIB	3	27,24	41,64
6	UD02/266-11	3	1	0	IIB	3	23,90	19,02
7	UD02/266-12	1	0	0	IA	2	82,07	51,92
8	UD02/266-13	3	0	0	IIA	3	18,55	26,28
9	UD02/266-14	3	1	0	IIB	2	63,24	60,49
10	UD02/266-15	3	0	0	IIA	3	18,21	42,77
11	UD02/266-18	3	0	0	IIA	2	8,50	45,14
12	UD02/266-19	3	0	0	IIA	3	17,43	25,74
13	UD02/266-20	3	1	0	IIB	3	28,37	68,81
14	UD02/266-21	3	1	1	IV	3	30,77	36,39
15	UD02/266-22	3	0	0	IIA	2	78,05	63,06
16	UD02/266-25	3	1	0	IIB	2	36,28	47,59
17	UD02/266-26	3	1	1	IV	2	77,97	36,35
18	UD02/266-28	3	1	0	IIB	3	36,29	65,10
19	UD02/266-29	3	1	0	IIB	3	28,02	69,85
20	UD02/266-31	3	1	0	IIB	2	19,97	42,97
21	UD02/266-32	3	0	0	IIA	3	21,92	115,14
22	JM09/11-10	2	X	X	X	2	197,50	75,80
23	UD01/103-3	3	1	1	IV	2	44,10	75,40
24	UD01/103-4	3	1	X	X	3	58,30	85,40
25	UD01/103-6	3	1	X	X	2	20,20	40,40
26	UD01/103-9	3	1	0	IIB	X	55,80	74,90
27	UD01/103-11	2	1	0	IIB	2	110,90	59,10
28	UD01/103-13	3	0	X	X	2	63,84	53,27
29	UD01/103-14	4	1(4/8)	X	X	2	143,56	153,00
30	UD01/103-16	3	1	X	X	2-3	32,53	71,26
31	UD01/103-18	4	1(9/24)	X	X	2	77,59	119,61
32	UD01/103-19	3	1	1	IV	2	110,14	153,37
33	UD01/103-20	3	1(2/20)	X	X	2	27,68	88,33
34	UD01/103-21	3	1(2/19)	X	X	2	17,97	27,63
35	UD01/103-22	3	1	X	X	2	60,43	54,65
36	UD01/103-23	3	1(8/27)	X	X	3	28,35	45,14
37	UD02/103-24	3	1(2/10)	X	X	3	92,63	40,57
38	UD02/103-25	3	0(0/17)	X	X	2	12,76	77,90
39	UD01/103-1	3	0	X	X	3	24,10	32,10
40	UD01/103-2	3	1	1	IV	1	23,20	27,10
41	UD01/103-10	3	1(2/8)	0	IIB	3	42,30	59,70
42	UD01/103-15	3	X	X	X	1-2	13,91	154,01

<sup>1</sup> TNM-Klassifikation, Staging und Grading (G), vergleiche Tabelle 1-1 bis Tabelle 1-3.

<sup>2</sup> X: kann nicht beurteilt werden.

## 7.2.2 Kolon

**Tabelle 7-2: Pathologische Daten und Laborjournalcodenummern der Kolonkarzinome sowie Feuchtgewichte der gesunden und malignen Kolongewebeproben<sup>1</sup>.**

Patient	Code	pT	pN	pM <sup>2</sup>	UICC-Stage <sup>2</sup>	G	Gewebefeuchtgewicht [mg]	
							Normal	Tumor
1	UD01/4-1	3/4	2	0	IIIC	3	19,56	12,63
2	UD01/4-2	3	2	1	IV	2	86,08	51,84
3	UD01/4-3	3	0	0	IIA	3	62,42	24,85
4	UD01/4-4	4	2	1	IV	3	56,52	47,42
5	UD01/4-5	2	0	0	I	2	99,51	22,56
6	UD01/4-6	4	0	0	IIB	2	58,96	13,78
7	UD01/4-7	3	1	X	X	3	23,45	95,99
8	UD01/4-8	2	2	X	X	2	112,10	11,17
9	UD01/4-9	3	1	X	X	2-3	104,80	14,66
10	UD01/4-10	3	0	X	X	2	82,32	24,23
11	UD01/4-11	3	2	1	IV	3	73,21	31,79
12	UD01/4-12	4	1	1	IV	2	161,79	32,37
13	UD01/4-13	3	0	0	IIA	2	116,92	157,10
14	UD01/4-14	1	1	1	IV	2	78,70	71,80
15	UD01/4-15	4	1	0	IIIB	2-3	52,31	73,87
16	UD01/4-16	3	0	0	IIA	2	41,22	21,84

<sup>1</sup> TNM-Klassifikation, Staging und Grading (G), vergleiche Tabelle 1-3 bis Tabelle 1-6.

<sup>2</sup> X: kann nicht beurteilt werden.

## 7.2.3 Leber

**Tabelle 7-3: Pathologische Daten und Laborjournalcodenummern der Leberkarzinome sowie Feuchtgewichte der gesunden und malignen Lebergewebeproben.**

Patient	Code	pT	pN <sup>2</sup>	pM <sup>2</sup>	UICC-Stage <sup>2</sup>	G	Gewebefeuchtgewicht [mg]	
							Normal	Tumor
1	JS01/120-2	4	X	X	X	3	46,10	263,70
2	JM09/9-5	3	X	X	X	2	49,50	72,20

<sup>1</sup> TNM-Klassifikation, Staging und Grading (G), vergleiche Anhang Abschnitt 7.5 und Tabelle 1-3.

<sup>2</sup> X: kann nicht beurteilt werden.

### 7.3 GSL-REFERENZEN

In der nachfolgenden Tabelle 7-4 sind die eingesetzten GSL-Referenzen sowie ihre Hauptkomponenten aufgelistet. Zudem werden die entsprechenden Laborjournalcodenummern angegeben.

**Tabelle 7-4: : Auflistung der Hauptkomponenten, Gesamtkonzentrationen und Laborjournalcodierungen der eingesetzten GSL-Referenzen.**

GSL-Referenz	Code	Hauptkomponenten	Konzentration [µg/µL]	Literatur/Hersteller
Ganglioside aus humanen Granulozyten	JM07/7-1	GM3(Neu5Ac) IV <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc4Cer IV <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc4Cer VI <sup>3</sup> Neu5Ac-nLc6Cer VI <sup>6</sup> Neu5Ac-nLc6Cer	1,5	MÜTHING <i>et al.</i> , 1993
Neutrale GSL aus humanen Erythrozyten	JM10/80	MHC Lc2Cer Gb3Cer Gb4Cer	2,7	MEISEN <i>et al.</i> , 2005
Neutrale GSL aus humanen Granulozyten	HD02/188	Lc2Cer nLc4Cer nLc6Cer nLc8Cer	1,5	DUVAR <i>et al.</i> , 1997; MÜTHING <i>et al.</i> , 2002
Neutrale GSL aus murinen MDAY-D2-Zellen	HD01/340	Lc2Cer Gg3Cer Gg4Cer	2	DUVAR <i>et al.</i> , 1997; MÜTHING <i>et al.</i> , 2002
Humane Hirnganglioside	JM06/26	GM1 GD1a GD1b GT1b	2	Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA

## 7.4 ANTIKÖRPER

Tabelle 7-5 enthält eine Auflistung der eingesetzten Primäantikörper mit Verweis auf das entsprechende Laborjournal.

**Tabelle 7-5: Liste der eingesetzten Primäantikörper und den entsprechenden Laborjournalcodenummern.**

Primäantikörper	Code/Referenz	Epitop	Spezies	Isotyp	Klonalität	Klon
AK2-6	JM06/280-5	Neu5Ac $\alpha$ 6Gal $\beta$ 4GlcNAc-R (CD75s)	Huhn	IgY	polyklonal	-
AK2-3	JM06/280-4	Neu5Ac $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc-R (iso-CD75s)	Huhn	IgY	polyklonal	-
anti-Gb3Cer/CD77	JM06/298-1	Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ -R (CD77)	Huhn	IgY	polyklonal	-
anti-nLc4Cer	JM06/149-3	Gal $\beta$ 4GlcNAc-R	Huhn	IgY	polyklonal	-
anti-nLc4Cer	JM06/53	Gal $\beta$ 4GlcNAc-R	Maus	IgM	monoklonal	1B2-1B7
anti-CTB	Calbiochem, Frankfurt	Choleratoxin B-Untereinheit (CTB)	Ziege	IgG	polyklonal	-
anti-RCL	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA	<i>Ricinus communis</i> -Lektin (RCL)	Kaninchen	IgG	polyklonal	-
anti-Stx1	Sifin, Berlin	Shiga Toxin 1 (Stx1)	Maus	IgG1	monoklonal	VT109/ 4-E9b
anti-(r)Viscumin	Tonevitsky <i>et al.</i> , 1995	rViscumin/Viscumin A-Untereinheit	Maus	IgG1	monoklonal	TA5
anti-CD14	Immunotools, Friesoythe	Lipopolysaccharid-Rezeptor (CD14)	Maus	IgG1	monoklonal	18D11
anti-CD45	Immunotools, Friesoythe	LCA ( <i>leukocyte common antigen</i> ) (CD45)	Maus	IgG1	monoklonal	MEM-28
anti-CD31	Immunotools, Friesoythe	PECAM-1 ( <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i> ) (CD31)	Maus	IgG1	monoklonal	MEM-05
Isotypenkontrolle	Immunotools, Friesoythe	irrelevantes Epitop	Maus	IgG1	monoklonal	203

## 7.5 TNM-KLASSIFIKATION UND STAGING DER HEPATOZELLULÄREN KARZINOME (HCC)

In den beiden nachfolgenden Tabellen (Tabelle 7-6 und Tabelle 7-7) sind die TNM/(p)TNM-Klassifikation sowie die Stadiengruppierung von hepatozellulären Karzinomen dargestellt.

**Tabelle 7-6: TNM/pTNM-Klassifikation von hepatozellulären Karzinomen.<sup>1</sup>**

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
(p)TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
(p)T1	solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion
(p)T2	solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder multiple Tumoren, keiner mehr als 5cm in größter Ausdehnung
(p)T3	multiple Tumoren mehr als 5 cm in größter Ausdehnung oder Tumoren mit Befall eines größeren Astes der V. portae oder Vv. hepaticae
(p)T4	Tumor(en) mit direkter Invasion von Nachbarorganen, ausgenommen Gallenblase, <i>oder</i> Tumor(en) mit Perforation des viszerale Peritoneums
<b>N</b>	<b>regionäre Lymphknoten</b>
(p)NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
(p)N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
(p)N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
(p)MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
(p)M0	keine Fernmetastasen
(p)M1	Fernmetastasen
	Optionale Ramifikation:
M1a	Metastasen nur in regionären Lymphknoten
M1b	Metastasen in inneren Organen (ausgenommen Metastasen der Pleura und des Peritoneums)
M1c	Metastasen der Pleura und/oder des Peritoneums

<sup>1</sup> SOBIN AND WITTEKIND, 2002; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007.

Üblicherweise werden 3 oder mehr regionäre Lymphknoten untersucht, um einen Lebertumor bei negativem Befund pN0 klassifizieren zu können. Werden weniger als 3, aber mindestens ein regionärer Lymphknoten untersucht und erweist sich dieser beziehungsweise erweisen sich diese als tumorfrei, so ist dem Befund pN0 in Klammern die Zahl der befallenen und

untersuchten Lymphknoten zuzusetzen, um die Verlässlichkeit der pN-Klassifikation anzuzeigen, zum Beispiel pN0 (0/2).

**Tabelle 7-7: Stadiengruppierung von hepatozellulären Karzinomen.<sup>1</sup>**

	(p)M0		(p)M1
	(p)N0	(p)N1	
(p)T1	Stadium I	Stadium IIIC	Stadium IV
(p)T2	Stadium II		
(p)T3	Stadium IIIA		
(p)T4	Stadium IIIB		

<sup>1</sup> SOBIN AND WITTEKIND, 2002; NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007.

Liegen klinische TNM-Daten vor, so spricht man von klinischer, bei Vorliegen von pT und pN von definitiver Stadiengruppierung. Bei Unterschieden zwischen der klinisch festgestellten M-Kategorie und der pathologischen pM-Kategorie ist im Einzelfall jeweils unter Berücksichtigung der Gesamtsituation festzulegen, welche Kategorie für die Gesamtbeurteilung bei der Stadiengruppierung maßgeblich ist [NEUHAUS UND WITTEKIND, 2007].

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Vor- und Zuname: Ute Distler  
Geburtsdatum: 27.06.1981  
Geburtsort: Neustadt/Weinstrasse  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

09/1987 - 07/1991 Grundschole (Hans-Geiger-Schole) in Neustadt/Wstr.  
09/1991 - 06/2000 Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Neustadt/Wstr.  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Studium:**

10/2000 – 12/2004 Diplomstudiengang Molekulare Biotechnologie an der  
Universität Bielefeld  
Prüfungsfächer: Fermentationstechnik, Genomforschung-  
Bioanalytik, Glykobiotechnologie, Immunologie  
01/2005 – 08/2005 Externe Diplomarbeit der Technischen Fakultät der Universität  
Bielefeld am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung  
von Prof. Dr. J. Müthing  
Thema der Diplomarbeit: „Molekulargenetische und strukturelle  
Charakterisierung der CD75s-Struktur von humanen Tumoren  
des Gastrointestinaltraktes“

---

09/2005 – 12/2005 Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**Promotion:**

01/2006 – 02/2009 Anfertigung einer externen Doktorarbeit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld am Institut für Medizinische Physik und Biophysik und am Institut für Hygiene der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Leitung von Prof. Dr. J. Müthing

---

## **Erklärung**

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

---

Dipl.-Biotech. Ute Distler

---

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706