

**Die Glykocalyx- und Mukusbarriere des Darms:
Analyse der Zugänglichkeit der Oberfläche von
Schleimhauttumoren für diagnostische Wirkstoffe**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel**

**vorgelegt von
Katrin Ramaker**

Kiel, 2009

Referentin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2009

zum Druck genehmigt: Kiel, 23.06.2009

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Das kolorektale Karzinom	3
2.1.1 Entstehung des kolorektalen Karzinoms	3
2.1.2 Diagnostik des kolorektalen Karzinoms	5
2.1.3 Marker und Modellsysteme zur Untersuchung intestinaler Neoplasien	7
2.2 Die Epithelschicht der intestinalen Mukosa	8
2.2.1 Die Glykocalyx des Intestinaltrakts	8
2.2.2 Die Glykocalyx humaner Kolonkarzinomzellen	9
2.3 Partikuläre Kontrastmittel	10
2.4 Mucine	11
2.4.1 Funktion der Mucine	13
2.4.2 Heterogenität der Mucine	13
2.5 Zielsetzung der Arbeit	15
3 Materialien	16
3.1 Verwendete Organismen	16
3.1.1 Humanes klinisches Material	16
3.1.2 Mäusestämme	16
3.1.3 Zelllinie P3X63Ag8/653	16
3.2 Spezielle Geräte und Apparaturen	17
3.3 Spezielle Verbrauchsmaterialien	17
3.4 Chemikalien	18
3.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur	19
3.6 Proteine und Peptide	20
3.7 Antikörper, Lektine und Streptavidin	20
3.8 Nachweissysteme	21

3.9	Software	21
3.10	Häufig verwendete Puffer	22
4	Methoden	23
4.1	Elektronenmikroskopische Untersuchung von Darmgewebe	23
4.1.1	Murines Gewebe	23
4.1.2	Humanes Gewebe	24
4.1.3	Fixierung, Entwässerung und Einbettung von Gewebe	25
4.1.4	Herstellung, Färbung und Bewertung von Semidünnschnitten	26
4.1.5	Herstellung, Färbung und Auswertung von Ultradünnschnitten	27
4.2	Allgemeine Proteinchemische Arbeiten	28
4.2.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	28
4.2.1.1	Proteinbestimmung mittels DC Protein Assay (Lowry)	28
4.2.1.2	Proteinbestimmung mittels Micro BCA Assay	29
4.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteinfärbung	29
4.2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gel	29
4.2.2.2	Elektrophorese	30
4.2.2.3	Silberfärbung	30
4.3	Immunoverfahren	32
4.3.1	Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Dot Blot)	32
4.3.2	Enzyme Linked Immono Sorbent Assay (ELISA)	33
4.3.2.1	Test von Absättigungsreagenzien	33
4.3.2.1.1	Austausch-ELISA	34
4.3.2.1.2	Sensibilitäts-ELISA	35
4.3.2.2	Sandwich-ELISA	36
4.3.2.3	Nachweis von Antikörpern in Mäuseseren	36
4.3.2.4	Test der Hybridomzellen auf Produktion spezifischer Antikörper	37
4.3.2.4.1	Test der Hybridomzellüberstände mittels Peptid-ELISA	37
4.3.2.4.2	Test der Hybridomzellüberstände mittels Mucin-ELISA	38
4.4	Biotinylierung von Antikörpern	38
4.5	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes MUC5AC Protein	38
4.5.1	Auswahl der Peptide	39

4.5.2	Kopplung der Peptide an BSA und Myoglobin	39
4.5.2.1	Kopplung an BSA	40
4.5.2.2	Kopplung an Myoglobin	40
4.5.3	Versuchstiere	41
4.5.4	Immunisierung	41
4.5.5	Vorbereitung der Myelomzelllinie P3X63Ag8/653 für die Fusion	42
4.5.6	Präparation der Milzzellen	42
4.5.7	Fusion	43
4.5.8	Selektion der Hybridomzellen	44
4.5.9	Klonierung nach dem Prinzip der limitierten Verdünnung	45
4.5.10	Isotypisierung monoklonaler Antikörper	46
4.5.11	Produktion monoklonaler Antikörper	47
4.5.12	Affinitätschromatographische Reinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberständen	47
4.6	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	48
4.6.1	Kultivierung der Myelomzelllinie P3X63Ag8.653	49
4.6.2	Einfrieren von Hybridomzellen	49
5	Ergebnisse	51
5.1	Vergleichende Analyse der Glykocalyx von neoplastischem und gesundem intestinalen Epithel bei Maus und Mensch	51
5.1.1	Analyse der Glykocalyx des murinen Darmepithels	51
5.1.2	Analyse der Glykocalyx des humanen Darmepithels	55
5.1.2.1	Lichtmikroskopische Diskriminierung von neoplastischem und gesundem humanem Darmepithel	57
5.1.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Glykocalyx von neoplastischem und gesundem humanem Darmepithel	58
5.1.2.3	Statistischer Vergleich der Glykocalyx von neoplastischem und gesundem humanem Darmepithel	63
5.2	Untersuchungen zur Etablierung eines Testsystems für Kontrastmittel-Mucin-Interaktionen	67
5.2.1	Anvisierter Aufbau des Kontrastmittel-Mucin-Interaktions-tests	67
5.2.2	Identifizierung eines Absättigungsreagenzes für die Mucinanalytik in Mikrotiterplatten	68

5.2.3	Untersuchung von monoklonalen Antikörpern für die Mucinanalytik in Mikrotiterplatten	71
5.2.3.1	Charakterisierung der anti-MUC5AC-Antikörper 1-13M1, 9-13M1, 2-11M1 und 45M1	71
5.2.3.2	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes MUC5AC	74
5.2.3.2.1	Peptidantigene zur Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes MUC5AC	74
5.2.3.2.2	Generierung der monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper	75
5.2.3.3	Charakterisierung der ausgewählten monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper	77
5.2.3.4	Validierung der Erkennung von humanem MUC5AC durch die isolierten anti-MUC5AC-Antikörper	80
6	Diskussion	83
6.1	Bewertung der Glykocalyx als Biomarker zur Diagnose kolorektaler Neoplasien	83
6.2	Grenzen des Biomarkers Glykocalyx zur Diagnose kolorektaler Neoplasien	90
6.3	Interaktion partikulärer Kontrastmittel mit Mucin	93
7	Anhang	107
7.1	Aminosäuresequenzabschnitte des humanen MUC5AC Proteins	107
7.2	Einzelwerte der vermessenen Glykocalyx-Höhe	108
7.3	Einzelwerte zum Glykocalyxbedeckungsgrad	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Adenom-Karzinom-Sequenz.	4
Abbildung 2.2: Ultrastruktur der apikalen Oberfläche von Epithelzellen des Kolons und des Rektums einer Balb/c-Maus.	9
Abbildung 2.3: Ultrastruktur der Zelloberfläche der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 _{BBE2} .	9
Abbildung 2.4: Modell zur Nutzung der Glykocalyx als Biomarker für die Erkennung von kolorektalen Karzinomen.	11
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung eines Mucin-Dimers.	12
Abbildung 5.1: Elektronenmikroskopische Analyse der Glykocalyx der verschiedenen Darmabschnitte der C57BL/6J Wildtyp-Maus.	52
Abbildung 5.2: Elektronenmikroskopische Analyse der Glykocalyx gesunder und adenomatöser Kolonschleimhaut von drei MIN-Mäusen.	54
Abbildung 5.3: Elektronenmikroskopische Analyse der Glykocalyx gesunder und adenomatöser Schleimhaut der verschiedenen Dünndarmabschnitte von MIN-Mäusen.	55
Abbildung 5.4: Semidünnschnitte gesunder und entarteter humaner Kolonschleimhaut.	57
Abbildung 5.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen gesunder humaner Kolonschleimhaut.	59
Abbildung 5.6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen gesunder humaner Schleimhaut des Ileums.	60
Abbildung 5.7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Adenokarzinomen der humanen Kolonschleimhaut.	61
Abbildung 5.8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Polypen und des <i>Carcinoma in situ</i> der humanen Kolonschleimhaut.	62
Abbildung 5.9: Verteilung der gemessenen Glykocalyx-Höhen der humanen gesunden Schleimhaut des Kolons und des Ileums.	63
Abbildung 5.10: ROC-Analyse der Glykocalyx als Biomarker für Darmkrebs.	66
Abbildung 5.11: Modell des Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstests.	68
Abbildung 5.12: Austauschverhalten unterschiedlicher Absättigungsreagenzien gegen Serumproteine im ELISA.	69
Abbildung 5.13: Einfluss von Absättigungsreagenzien auf die Sensitivität eines Immunglobulin-Capture-ELISA.	70

Abbildung 5.14: Bindung kommerziell erhältlicher anti-MUC5AC-Antikörper an humane, nasale Mucine im Dot Blot.	72
Abbildung 5.15: Bestimmung der unspezifischen Interaktion der kommerziell erhältlichen anti-MUC5AC-Antikörper mit SA-HRP.	73
Abbildung 5.16: Hintergrund eines MUC5AC-Sandwich-ELISA bei Verwendung der kommerziell erhältlichen anti-MUC5AC-Antikörper 9-13M1, 2-11M1 und 45M1.	73
Abbildung 5.17: Peptid-spezifischer Antikörpertiter der vier für die Fusionen ausgewählten Mäuse.	76
Abbildung 5.18: Gelelektrophoretische Analyse der Reinheit der isolierten Antikörper.	79
Abbildung 5.19: Qualitätskontrolle der isolierten monoklonalen Antikörper im Dot Blot.	80
Abbildung 5.20: Bindung der isolierten monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper an humane, nasale Mucine im Dot Blot.	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Kommerziell erhältliche Antikörperklone gegen humanes MUC5AC Protein.	14
Tabelle 4.1: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels.	30
Tabelle 5.1: Klinische Daten und präpariertes Darmgewebe der Patienten.	56
Tabelle 5.2: Bedeckungsgrad der Epithelschicht der Patienten mit intakter Glykocalyx.	65
Tabelle 5.3: Sensitivität und Spezifität der Glykocalyx als Biomarker für Darmkrebs.	66
Tabelle 5.4: Zur Immunisierung eingesetzte Peptidantigene aus humanem MUC5AC.	75
Tabelle 5.5: Zusammenfassung der Fusionsergebnisse.	77
Tabelle 5.6: Bestimmung der Immunglobulinklassen der Antikörperklone.	77
Tabelle 5.7: Kennzahlen zur Gewinnung und Reinigung der im semipräparativen Maßstab hergestellten anti-MUC5AC-Antikörper.	78
Tabelle 6.1: Sensitivität und Spezifität empfohlener Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms.	89

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben-Code benannt. Gewichts- und andere Einheiten entsprechen dem SI-System und werden hier nicht aufgeführt.

<i>A. bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
Ag8	Myelomzelllinie P3X63Ag8/653
apc	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aa	Aminosäure
AUC	area under curve
AVP	Ausverdünnungspuffer
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CO	Cut-Off
Con A	Concanavalin A
CTB	Choleratoxin B
Da	Dalton
DDSA	Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMP 30	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	Dulbecco's Phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immono sorbent assay
<i>et al.</i>	und andere
FCS	fötales Rinderserum
FIT	fecal immunochemical test
FOBT	fecal occult blood test; Blutstuhltest
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G _{M1}	Gangliosid M1
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin

HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	Meerretichperoxidase
HT	Hypoxanthin, Thymidin
Ig	Immunglobulin
L-PBS	Lite Phosphate-buffered saline
LTB	B-Untereinheit des hitzelablen Enterotoxins aus <i>Escherichia coli</i>
MIN	multiple intestinal neoplasia
MPI	magnetic particle imaging
MUC	Mucin
MWCO	Molmassenausschuss
n	Anzahl unabhängiger Messungen
NHS	N-Hydroxy-Succinimidyl
NMA	Nadic Methyl Anhydride
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglycol
p.a.	zur Analyse
ROC	receiver operator characteristic
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIF	Simulierte Intestinalflüssigkeit
SL	Stammlösung
STABW	Standardabweichung
TBABH	Tetrabutylammoniumborhydrid
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
UEA I	Ulex europaeus Lektin I
ü.N.	über Nacht
WHO	Weltgesundheitsorganisation
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
ZWM	Zellwaschmedium

1 Zusammenfassung

Gesunde intestinale Epithelzellen sind *in vivo* durchgängig von einer ausgeprägten Glykocalyx bedeckt, welche eine Barriere zwischen dem Darmlumen und der Epithelzellmembran darstellt. Die Glykocalyx fehlt jedoch *in vitro* auf der Oberfläche von humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2_{BBE2}). Sofern der Verlust der Glykocalyx auch auf humanem, neoplastischem Gewebe *in vivo* auftritt, könnte das Fehlen einer Glykocalyx einen neuartigen Marker für Darmkrebs darstellen und somit neue Ansätze zur Früherkennung dieser Krankheit ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine systematische Analyse der Morphologie gesunder und neoplastischer Darmschleimhaut durchgeführt und festgestellt, dass die Glykocalyx auf entarteten Zellen *in vivo* tatsächlich fehlt. Anhand der C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J-Maus konnte gezeigt werden, dass die Glykocalyx auf der Oberfläche von Adenomen fehlt, gesundes Gewebe hingegen von einer dichten Glykocalyx bedeckt ist. Im humanen Gewebe waren nur 5,5 % bzw. 4,7 % der Epithelzellen von Polypen und Adenokarzinomen von einer Glykocalyx bedeckt, während die Glykocalyx bei mehr als 75 % des gesunden Darmgewebes vorhanden war. Ein statistischer Vergleich von entartetem und gesundem Darmepithel ergab, dass Polypen und Adenokarzinome anhand der fehlenden Glykocalyx mit hoher Sensitivität und Spezifität von gesundem Darmgewebe zu unterscheiden sind.

Partikuläre Kontrastmittel, die selektiv an durch das Fehlen einer Glykocalyx zugängliche Rezeptoren der Zelloberfläche von entarteten Zellen binden, könnten zum Nachweis intestinaler Neoplasien verwendet werden. Eine unspezifische Bindung der Kontrastmittel an intestinalen Mukus, speziell Mucine, muss allerdings ausgeschlossen sein. Um die Abfangrate von Kontrastmitteln *in vitro* durch das im Gastrointestinaltrakt vorkommende Mucin MUC5AC zu analysieren, ist ein Testsystem erforderlich, mit dem MUC5AC direkt aus ungereinigten Mukusproben eingefangen werden kann. Kommerziell erhältliche Antikörper können in diesem Testsystem nicht eingesetzt werden, da ihre Spezifität nicht ausreicht. Daher wurden neue monoklonale Antikörper gegen humanes MUC5AC generiert und charakterisiert. Obwohl diese Antikörper MUC5AC sehr spezifisch über dessen Proteinerückgrat binden, erkannten sie MUC5AC aus Mukusproben verschiedener Probanden unterschiedlich gut. Dies könnte durch die Verdeckung der Epitope der Antikörper durch unterschiedliche Faltung oder Glykosylierung von MUC5AC, aber auch durch genetische Variabilität der *MUC5AC*-Gene verursacht werden und erfordert zukünftig weitere Untersuchungen, um die Nutzung der generierten Antikörper in einem Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstest beurteilen zu können.

Abstract

Healthy intestinal enterocytes are covered by a continuous, thick glycocalyx, which forms a barrier between the gut lumen and the epithelial cell membrane. However, the glycocalyx is absent *in vitro* on the apical surface of human colon carcinoma cells (Caco-2_{BBE2}). If loss of the glycocalyx also occurs on human neoplastic tissue *in vivo*, this lack of a glycocalyx could represent a novel marker for colorectal cancer (CRC) and therefore may allow new diagnostic means for early detection of CRC.

Here, a systematic ultrastructural analysis of healthy and neoplastic intestinal mucosa was performed to investigate this hypothesis. It turned out that the glycocalyx was indeed missing on neoplastic cells *in vivo*. By examining intestinal mucosa from C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J-mice, it could be shown, that on the surface of adenomas a glycocalyx is lacking, whereas healthy tissue is covered by a thick glycocalyx. In human tissue only 5.5 % or 4.7 % of epithelial cells from polyps and adenocarcinoma were covered by a glycocalyx, while this surface coat existed on more than 75 % of healthy intestinal epithelial cells. A statistical comparison of degenerated and healthy tissue showed, that polyps and adenocarcinoma can be discriminated from healthy epithelium with high sensitivity and specificity by means of the expression of a glycocalyx.

Particulate contrast agents that bind selectively to accessible apical surface receptors of cancerous cells due to the lack of a glycocalyx may be used for detection of intestinal neoplasia. However, nonspecific binding of these contrast agents to intestinal mucus, particularly mucins, has to be excluded. To analyse the absorption of contrast agents *in vitro* by the mucin MUC5AC present in the gastrointestinal tract, an assay capable to bind MUC5AC from crude mucosal extracts is required. Commercially available antibodies could not be applied in this system, because they lacked the necessary specificity. Hence, novel monoclonal antibodies against human MUC5AC were generated and characterised. Although these antibodies bind MUC5AC very specifically via its backbone, they were not able to bind MUC5AC from mucin probes of different patients equally well. This could be due to masking of the antibodies' epitopes by different folding states or glycosylation of MUC5AC, but also to genetic variability in the *MUC5AC* genes, and requires future investigations in order to judge the usefulness of the novel antibodies in a contrast agent-mucin-binding-assay.

2 Einleitung

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellen Krebserkrankungen eine der führenden Todesursachen weltweit dar. In Deutschland war Krebs 2004 nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache mit etwa 210.000 Sterbefällen (Batzler et al., 2008). Die meisten krebsbedingten Sterbefälle entfielen dabei auf Karzinome der Lunge und des Darms. Laut WHO wird Krebs im Jahr 2010 sogar voraussichtlich die weltweit häufigste Todesursache sein und damit Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Haupttodesursache ablösen (Boyle und Levin, 2008).

2.1 Das kolorektale Karzinom

Mehr als 95 % aller Darmtumoren treten im Kolon sowie im Rektum auf und werden unter dem Begriff kolorektales Karzinom zusammengefasst. Das kolorektale Karzinom ist nach Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Deutschland bei beiden Geschlechtern nicht nur die zweithäufigste Krebserkrankung, sondern auch die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache. So erkrankten im Jahr 2004 etwa 37.250 Männer sowie 36.000 Frauen an Darmkrebs und etwa 14.750 Männer sowie 14.050 Frauen verstarben an dieser Krankheit (Batzler et al., 2008).

Bei der Mehrheit der kolorektalen Karzinome handelt es sich um Adenokarzinome. Diese machen mehr als 90 % der Dickdarntumoren aus und können bereits aus einer einzelnen entarteten Epithelzelle der Mukosa hervorgehen (Stewart und Kleihues, 2003).

2.1.1 Entstehung des kolorektalen Karzinoms

Gemeinsames Merkmal aller Krebserkrankungen ist die Entartung und unkontrollierte Vermehrung von Zellen. Ursache hierfür sind entweder spontan auftretende oder erblich bedingte Defekte in Genen, deren Produkte normalerweise an der Steuerung der Zellteilung beteiligt sind. Am häufigsten treten kolorektale Karzinome sporadisch auf, nur in 5 % der Fälle basieren sie auf einer genetischen Prädisposition (Stewart und Kleihues, 2003). Die am häufigsten auftretende kolorektale Krebserkrankung, welche mit erblicher Prädisposition verbunden und mit Keimbahnmutationen in verschiedenen Genen der DNA-Reparatursysteme assoziiert ist, ist das hereditäre nicht polypöse Kolonkarzinom (Dietel

et al., 2005). Auch die familiäre adenomatöse Polyposis, die durch das Auftreten hunderter adenomatöser Polypen im gesamten Dickdarm gekennzeichnet ist, ist eine erbliche Erkrankung, die mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung kolorektaler Karzinome einhergeht. Als Ursache gilt eine Mutation im *apc* (adenomatous polyposis coli) -Gen (Dietel et al., 2005).

Die Karzinogenese ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, bei dem verschiedene molekulare Veränderungen der DNA von Bedeutung sind. Im Hinblick auf das kolorektale Karzinom geht man davon aus, dass dieses durch eine Akkumulation von genetischen Ereignissen aus Adenomen hervorgeht. Dieses Konzept der Adenom-Karzinom-Sequenz wurde von Fearon und Vogelstein (1990) in einem genetischen Modell zusammengefasst, welches zeigt, dass die Aktivierung eines oder mehrerer Onkogene (*ras*) sowie der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (*apc*, *DCC*, *p53*) dazu führen, dass aus normaler Kolonmukosa ein invasives Karzinom entsteht (Abbildung 2.1). Entscheidend dabei ist die Akkumulation von mindestens vier bis fünf genetischen Alterationen, während die Reihenfolge der Veränderungen offenbar eine untergeordnete Rolle spielt. (Fearon und Vogelstein, 1990).

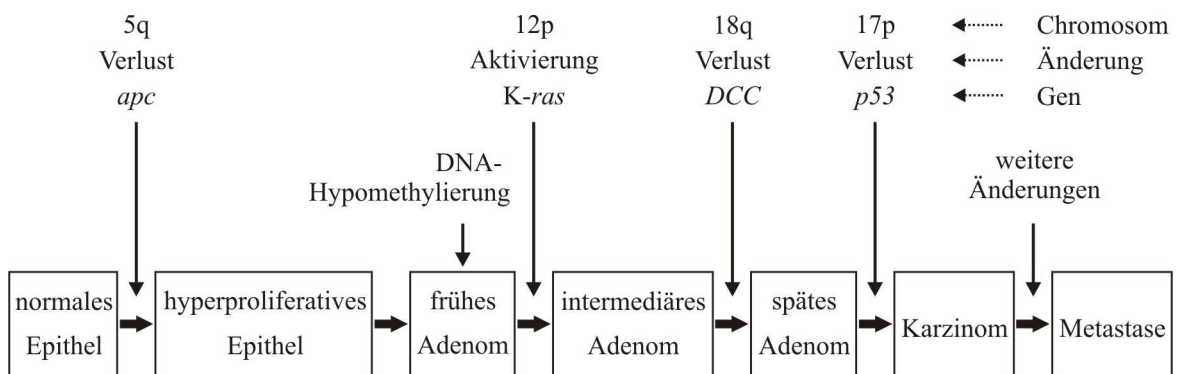


Abbildung 2.1: Adenom-Karzinom-Sequenz, modifiziert nach Fearon und Vogelstein (1990). Zur Entstehung eines invasiven Karzinoms aus normaler Darmmukosa sind mehrere molekulare Veränderungen der DNA notwendig.

Initial entsteht aus dem normalen Darmepithel ein hyperproliferatives Epithel (Abbildung 2.1). Dieser Schritt der kolorektalen Karzinogenese ist meistens mit dem Funktionsverlust des *apc*-Gens und einer damit einhergehenden vermehrten Zellteilung verbunden. So ist eine Mutation im *apc*-Gen bei fast allen sporadischen und durch erbliche Prädisposition entstandenen kolorektalen Karzinomen nachweisbar (Powell et al., 1992;

Miyaki et al., 1999). Ein weiteres frühes Ereignis, welches in der Tumorentstehung involviert sein kann, ist die Hypomethylierung. Der Verlust von Methylgruppen der DNA hemmt die Chromosomenkondensation und führt zur Instabilität des Genoms (Schmid et al., 1984). In etwa 50 % aller Karzinome tritt eine aktivierende Mutation im *ras*-Gen auf, die zur weiteren Tumorprogression führt, da das nun konstitutiv aktive Ras Protein dauerhaft wachstumsfördernde Signale zum Zellkern sendet (Bos et al., 1987; Forrester et al., 1987). Der Verlust der Funktionalität der Tumorsuppressorgene *DCC* (deleted in colon carcinoma) und *p53* kann im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung zur Entstehung eines Karzinoms führen. Ein Fehlen des DCC Proteins führt zum Verlust des Zellzusammenhalts und wurde in mehr als 70 % der kolorektalen Karzinome nachgewiesen (Vogelstein et al., 1988). Ein defektes *p53*-Gen wurde sogar in mehr als 75 % der kolorektalen Karzinome gefunden (Vogelstein et al., 1988). *p53* Protein ist entscheidend an der Regulation der G₁- und G₂- Kontrollpunkte im Zellzyklus beteiligt und verhindert die Replikation geschädigter DNA vor deren Reparatur oder regt Zellen mit geschädigter DNA zur Apoptose an. Der Verlust des Proteins führt zum Ausbleiben apoptotischer Signale und folglich zum ungehinderten Wachstum der Tumorzellen.

2.1.2 Diagnostik des kolorektalen Karzinoms

Die Prognose für Patienten mit kolorektalem Karzinom hängt entscheidend vom Krankheitsstadium ab, in welchem der Darmkrebs diagnostiziert wird. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für lokal begrenzte Tumoren (UICC-Stadium I) bei etwa 93 %, für Tumoren, die bereits Metastasen gebildet haben (UICC-Stadium IV), hingegen nur noch bei etwa 8 % (O'Connell et al., 2004). Wird der Tumor also in einem frühen Stadium erkannt, bestehen sehr gute Heilungschancen. Allerdings zeigt das kolorektale Karzinom im Frühstadium in der Regel keine Symptome und kann daher in diesem Stadium nur durch entsprechende Vorsorgeuntersuchungen aufgespürt werden (Stewart und Kleihues, 2003). Durch bestimmte Untersuchungsmethoden können auch Adenome diagnostiziert und entfernt werden, bevor sie das Stadium eines malignen Tumors erreichen.

Im Rahmen der diagnostischen Früherkennung von kolorektalen Karzinomen und Adenomen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Die „American Cancer Society“ empfiehlt eine Untersuchung mittels „fecal occult blood test“ (FOBT), „fecal immunochemical test“ (FIT), DNA-Stuhltest, Sigmoidoskopie, Koloskopie, Barium-

Kontrast-Röntgen oder CT-Kolonografie (Smith et al., 2009). Für Deutschland hingegen existiert eine „S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom“, in der nur der FOBT, die Koloskopie und die Sigmoidoskopie empfohlen werden (Schmiegel et al., 2008).

Mittels des FOBT kann das durch kolorektale Karzinome verursachte Blut im Stuhl nachgewiesen werden. Der Test ist leicht und kostengünstig durchführbar. Durch seinen Einsatz konnte eine Senkung der durch kolorektale Karzinome bedingten Mortalität um 23 % gezeigt werden (Towler et al., 1998). Nachteilig ist allerdings, dass der FOBT über eine nur mäßige Sensitivität für Karzinome sowie eine geringe Sensitivität für Adenome verfügt (Schmiegel et al., 2008), so dass dieser Test nicht zur Identifizierung von Krebsvorstufen geeignet ist. Zur Absicherung der Diagnose schließt sich an einen positiven FOBT immer eine Koloskopie an.

Bei der Koloskopie wird die gesamte Schleimhaut des Dickdarms endoskopisch begutachtet. Dieses Verfahren gilt als Goldstandard, da es die höchste Sensitivität und Spezifität für das Auffinden von kolorektalen Karzinomen und Adenomen besitzt (Schmiegel et al., 2008). Ein weiterer Vorteil der Koloskopie ist, dass auch nicht blutende Karzinome und Adenome nachgewiesen werden können. Außerdem können während der Untersuchung Biopsien von verdächtigen Veränderungen entnommen und verdächtige Polypen entfernt werden (Polypektomie). Durch diese Polypektomie konnte die Inzidenz von Darmkrebs um 66-90 % gesenkt werden (Winawer et al., 1993; Citarda et al., 2001). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass es sich um einen invasiven Eingriff handelt, der von vielen Patienten als unangenehm empfunden wird.

Bei der Sigmoidoskopie werden etwa die letzten 60 cm des Dickdarms endoskopisch untersucht, so dass im Gegensatz zur Koloskopie die Detektion proximaler Karzinome nicht möglich ist. Daher sollte bei diesem Verfahren zusätzlich der FOBT eingesetzt werden (Schmiegel et al., 2008). Die Mortalität durch Karzinome des Rektosigmoids konnte durch Anwendung der Sigmoidoskopie, bei der ebenfalls Biopsien entnommen und Polypen entfernt werden können, um etwa 60-80 % gesenkt werden (Muller und Sonnenberg, 1995; Newcomb et al., 1992; Selby et al., 1992). Auch hierbei handelt es sich um eine als unangenehm empfundene invasive Untersuchungsmethode.

Obwohl zur diagnostischen Früherkennung von kolorektalen Karzinomen verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung stehen und bereits seit langem bekannt ist, dass das regelmäßige Screening der asymptomatischen Bevölkerung auf kolorektale Karzinome

die Mortalität dieser Krankheit deutlich reduzieren kann (Winawer, 1997), werden nur 39 % der Tumoren in einem frühen Stadium detektiert (American Cancer Society, 2008). Als wesentlicher Grund hierfür gilt die Abneigung der Bevölkerung gegen die Durchführung der oben genannten Vorsorgeuntersuchungen. Daher sind alternative, nicht invasive diagnostische Verfahren zur Früherkennung kolorektaler Karzinome durchaus erforderlich. Aufgrund der positiven Prognose bei frühzeitiger Erkennung des Tumors sollte ein solches Verfahren in der Lage sein, bereits die Vorstufen eines Karzinoms sicher zu erkennen.

2.1.3 Marker und Modellsysteme zur Untersuchung intestinaler Neoplasien

Da die meisten Darmtumoren durch die Entartung von Epithelzellen entstehen, muss eine Frühdiagnose des Darmkrebses über Unterschiede zwischen der entarteten und gesunden Epithelschicht des Darms erfolgen. Einen solchen Unterschied auf zellulärer Ebene bezeichnet man als Tumormarker. Meistens handelt es sich dabei um Proteine oder Stoffwechselprodukte, die nur vom entarteten Epithel gebildet werden. Aber auch morphologische Unterschiede zwischen gesunden und entarteten Zellen sind prinzipiell zur Tumorzellerkennung geeignet, sofern sie detektierbar sind. Um solche molekularen, metabolischen oder morphologischen Marker zu identifizieren und ihre Nutzbarkeit in der Diagnostik zu überprüfen, sind Tiermodelle erforderlich.

Im Fall des kolorektalen Karzinoms bietet sich als Modellsystem die von Moser et al. (1990) etablierte „multiple intestinal neoplasia“ (MIN) -Maus (C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J) an, welche einen Defekt im *apc*-Gen aufweist (Su et al., 1992). MIN-Mäuse entwickeln im Dünndarm und unter einer besonders fettreichen Diät auch im Dickdarm (Wasan et al., 1997) spontan zahlreiche adenomatöse Polypen, an denen morphologische Unterschiede von entarteten Epithelzellen *in vivo* gesucht oder überprüft werden können. Auch zur Validierung eines diagnostischen Testsystems für Darmpolypen sollte dieses Modell gut geeignet sein.

2.2 Die Epithelschicht der intestinalen Mukosa

Die einschichtige, hochprismatische Epithelschicht der Darmschleimhaut, die *Lamina epithelialis*, grenzt unmittelbar an das Darmlumen. Die wichtigsten Aufgaben dieses Epithels stellen die Resorption und die Sekretion dar. Zur Resorption von Nahrungsbestandteilen im Dünndarm sowie von Wasser und Elektrolyten im Dickdarm ist die Vergrößerung der Schleimhautoberfläche wesentlich. Dies wird durch Bildung von Querspalten (Kerkring-Falten), Zotten (Villi) und Krypten erreicht (Hees und Sinowatz, 2000).

Die Epithelschicht besteht hauptsächlich aus resorbierenden Enterozyten, deren apikale Zellmembran durch einen dichten Besatz von Mikrovilli (Bürstensaum) zur weiteren Oberflächenvergrößerung beiträgt. Oberhalb der Mikrovilli befindet sich eine ausgeprägte Glykocalyx, durch welche die Enterozyten gegen das Lumen abgeschirmt sind. Zwischen den Enterozyten liegen einzelne Becherzellen, die zum Schutz der Mukosa Mucine produzieren und sekretieren. In den Krypten finden sich zusätzlich Paneth-Körnerzellen und endokrine Zellen. Die Paneth-Körnerzellen, die am Grunde der Krypten lokalisiert sind, sezernieren ein antimikrobielles Sekret, die endokrinen Zellen produzieren Serotonin, welches die Darmperistaltik anregt, und die Verdauungshormone Sekretin, Enterogastron und Pankreozymin-Cholezystokinin (Hees und Sinowatz, 2000).

Die Regeneration des Darmepithels geht von undifferenzierten Zellen aus, die sich in der Seitenwand der Krypten befinden. Während sich diese Zellen in Enterozyten oder Becherzellen differenzieren, wandern sie in Richtung Zottenspitze, wo sie etwa drei Tage nach Verlassen des Kryptengebietes abgestoßen werden. Das Darmepithel erneuert sich so innerhalb einiger Tage (Hees und Sinowatz, 2000).

2.2.1 Die Glykocalyx des Intestinaltrakts

Die apikale Oberfläche intestinaler Enterozyten ist durchgängig von einer ausgeprägten Glykocalyx bedeckt (Ito, 1965; Maury et al., 1995a; Maury et al., 1995b), wie in Abbildung 2.2 am Beispiel der Enterozyten des Kolons und Rektums einer Balb/c-Maus gezeigt ist. Die Glykocalyx besteht aus stark glykosylierten Proteinen und Lipiden, die in der Zellmembran verankert sind, und bildet eine dichte Barriere, die den Zugang von Mikroorganismen und Fremdpartikeln zur apikalen Zellmembran verhindert (Frey et al.,

1996). Außerdem schützt sie die Mukosa vor Selbstverdauung und übt über integrierte Verdauungsenzyme eine wesentliche Funktion bei der Nährstoffaufnahme aus (Kato und Owen, 1994).

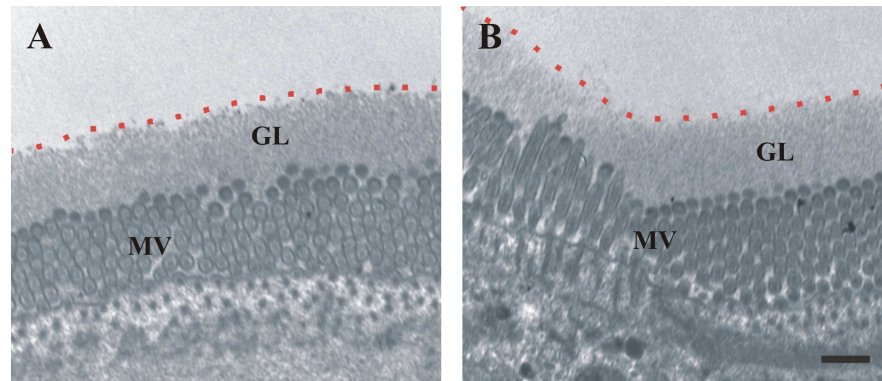


Abbildung 2.2: Ultrastruktur der apikalen Oberfläche von Epithelzellen des Kolons und des Rektums einer Balb/c-Maus. Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Enterozyten des Kolons (A) und des Rektums (B), deren Mikrovilli (MV) mit einer Glykocalyx (GL) bedeckt sind. Die rot gepunktete Linie markiert die Grenze zwischen Glykocalyx und Darmlumen. Balken: 500 nm.

2.2.2 Die Glykocalyx humaner Kolonkarzinomzellen

Frey et al. (1996) konnten durch eine Analyse der Oberflächenstruktur humaner Kolonkarzinomzellen (Caco-2_{BBE2}) im Zellkulturmodell zeigen, dass Tumorzellen *in vitro* keine oder nur eine sehr schwach ausgeprägte Glykocalyx tragen (Abbildung 2.3).

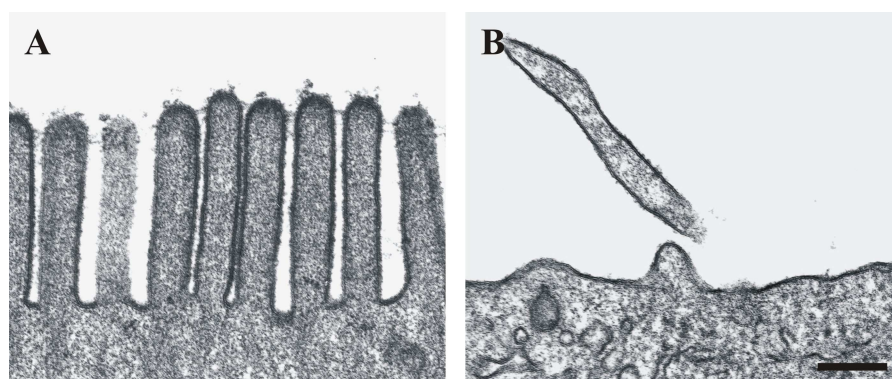


Abbildung 2.3: Ultrastruktur der Zelloberfläche der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2_{BBE2}. In der elektronenmikroskopischen Aufnahme A ist die apikale Zelloberfläche einer differenzierten Caco-2 Zelle und in Aufnahme B die einer undifferenzierten Zelle gezeigt. Aus Frey et al. (1996). Balken: 500 nm.

Durch die Kultivierung auf Glasdeckgläschen bildeten die Caco-2 Zellen einen Monolayer aus differenzierten Zellen. Diese Zellen besaßen regelmäßige, dicht beieinanderstehende Mikrovilli, auf deren Spitzen eine rudimentäre Glykocalyx nachgewiesen werden konnte (Abbildung 2.3 A). Doch innerhalb des Monolayers verblieben kleine „Inseln“ mit undifferenzierten Zellen, bei denen die Glykocalyx vollständig fehlte und auch Mikrovilli kaum noch vorhanden waren (Abbildung 2.3 B).

Sollte man diese Beobachtung *in vivo* für entartetes Darmgewebe bestätigen können, so könnte die fehlende Glykocalyx einen neuartigen Marker für Darmkrebs darstellen.

2.3 Partikuläre Kontrastmittel

Das Fehlen eines Moleküls oder einer Struktur ist jedoch erheblich schwieriger zu visualisieren als das Auftreten eines neuen Proteins oder Stoffwechselproduktes. Eine Möglichkeit, das Fehlen der Glykocalyx selektiv sichtbar zu machen, wäre die Ausnutzung der Barrierefunktion einer intakten Glykocalyx, denn durch die Abwesenheit der Glykocalyxbarriere auf entartetem Gewebe sollten oberflächenassoziierte Rezeptoren der Zellmembran selektiv besser zugänglich sein. Mit anderen Worten: gelingt es, einen Liganden für eine Zellmembrankomponente so groß zu gestalten, dass er nicht in eine intakte Glykocalyx eindringen kann, dann sollte er selektiv nur glykocalyxfreies, neoplastisches Gewebe markieren.

Verschiedenste ubiquitär auf der Außenseite der Epithelzellmembran vorkommende Rezeptoren könnten zur Markierung von entarteten Geweben, z.B. durch einen partikulären Liganden bzw. ein partikuläres Kontrastmittel, genutzt werden (Abbildung 2.4 A). Ein bekannter Plasmamembranrezeptor ist das Gangliosid GM₁ (Lencer et al., 1992), ein Glykolipid, welches über seinen Lipidanteil in der äußeren Zellmembran verankert ist, während sein Kohlenhydratanteil ins Lumen ragt (McDaniel et al., 1986). GM₁ sollte zur selektiven Markierung von entartetem Gewebe gut geeignet sein, da die spezifische Bindung partikulärer Kontrastmittel an den Kohlenhydratanteil des Gangliosids bereits nachgewiesen werden konnte. Frey et al. (1996) konnten zeigen, dass Nanopartikel, die mit spezifisch an GM₁ bindendem Choleratoxin B (CTB) beschichtet waren, *in vivo* selektiv an M-Zellen mit fehlender Glykocalyxbarriere binden. Und auch *in vitro* konnte eine selektive Bindung von CTB-Partikeln an undifferenzierte Caco-2 Kolonkarzinomzellen (siehe Kapitel 2.2.2) mit vollständig fehlender Glykocalyx

nachgewiesen werden, während die etwa 40-60 nm hohe Glykocalyx auf differenzierten Caco-2 Zellen eine Bindung verhinderte (Abbildung 2.4 B) (Frey et al. 1996).

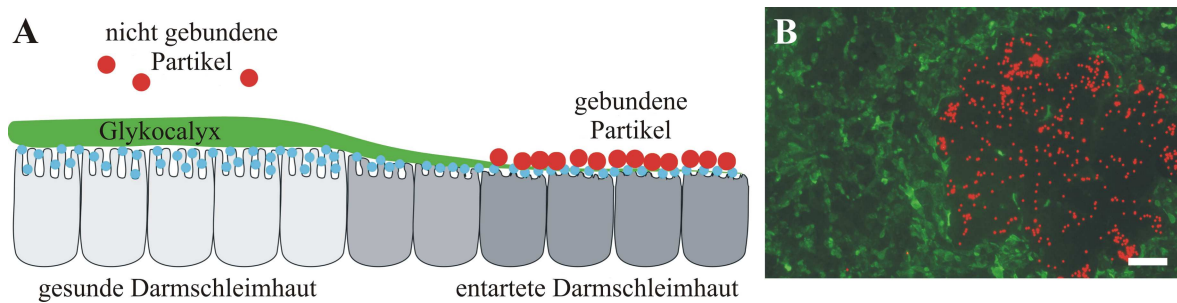


Abbildung 2.4: Modell zur Nutzung der Glykocalyx als Biomarker für die Erkennung von kolorektalen Karzinomen. **A:** Partikuläre Kontrastmittel (rot) binden selektiv an membranassoziierte Rezeptoren (blau) der entarteten Darmschleimhaut (dunkelgrau), auf der die Glykocalyx (grün) fehlt, nicht aber an die Rezeptoren der gesunden Schleimhaut (hellgrau), welche durch die ausgeprägte Glykocalyx der Epithelzellen vom Darmlumen abgeschirmt werden. **B:** CTB-beschichtete Mikropartikel (rot) binden selektiv an undifferenzierte Caco-2 Kolonkarzinomzellen, nicht aber an redifferenzierte Zellen mit rudimentärer Glykocalyx, welche mit Erdnuss-Agglutinin-FITC (grün) gefärbt wurde. Balken: 100 μm .

Für verschiedene Partikel, die als Targeting-Systeme im Darm eingesetzt wurden, wurde eine starke Bindung an intestinalen Schleim, den Mukus, beobachtet (Pappo und Ermak, 1989; Porta et al., 1992). Ein Abfangen von partikulären Kontrastmitteln zur optischen Markierung entarteter Darmschleimhaut durch Mukus muss daher ausgeschlossen sein, um die Selektivität und Spezifität der Bindung zu garantieren.

2.4 Mucine

Der Hauptbestandteil des Mukus sind die Mucine. Mucine sind hochmolekulare Glykoproteine mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 2×10^6 Da (Forstner et al., 1973). Sie werden von Becherzellen synthetisiert, welche im Epithel über die gesamte Länge des Dün- und Dickdarms lokalisiert sind. Die Anzahl dieser exokrinen Zellen nimmt im Verlauf des Darms vom Duodenum zum Rektum zu (Specian und Oliver, 1991).

Mucine bestehen aus linearen und verzweigten Oligosaccharidketten, die an einen Proteinkern gebunden sind. Der Kohlenhydratanteil der Mucine macht etwa 80 % der Molmasse aus (Wesley et al., 1985; Podolsky und Isselbacher, 1983) und enthält die Zucker Fucose, Galactose, N-Acetyl-Galactosamin, N-Acetyl-Glucosamin und Sialinsäure,

während Glucose fehlt und Mannose nur in Spuren vorkommt (Allen, 1978). Die Oligosaccharidketten bestehen aus 2-20 Zuckern und sind über O-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetyl-Galactosamin und der Hydroxyl-Seitengruppe der Aminosäuren Serin und Threonin an den Proteinkern gekoppelt (Podolsky, 1985). Der Proteinkern kann in zwei Bereiche gegliedert werden. Der zentrale Bereich besitzt bis zu 100 „Tandem-Repeats“ und enthält einen hohen Anteil an den Aminosäuren Serin und Threonin (41 %) und an Prolin (15 %). Aufgrund des Serin- und Threoninreichtums ist dieser Bereich stark glykosyliert (Wesley et al., 1985). Prolin verhindert die Bildung von α -Helices, so dass der Proteinkern in einer expandierten Konformation vorliegt (Allen, 1978). Der Amino- und Carboxy-terminale Bereich des Proteinkerns ist nur sehr wenig glykosyliert und bildet über die vorhandenen Cysteine Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Proteinketten aus. Diese sind vermutlich für das Auftreten linearer Mucinketten mit etwa der zwanzigfachen Masse eines einzelnen Mucins verantwortlich. Die schematische Darstellung eines Mucin-Dimers ist in Abbildung 2.5 gezeigt (Cornberg et al., 2001).

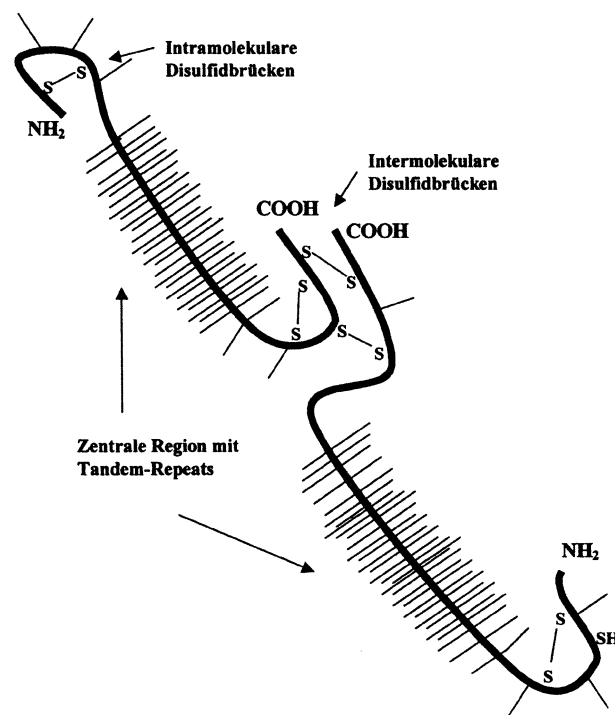


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung eines Mucin-Dimers. Die Amino- und Carboxy-terminalen Bereiche werden durch intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert und sind für die Oligomerisierung verantwortlich, während die zentralen Bereiche dicht O-glykosyliert sind. Aus Cornberg et al., (2001), modifiziert nach Forstner und Forstner (1994).

2.4.1 Funktion der Mucine

Die Oligosaccharide verleihen den Mucinen eine hohe Wasserbindungskapazität und führen so zu einer gelartigen Konsistenz der Mukusschicht, die eine physikalische und chemische Barriere zum Schutz des Epithels bildet. Indem der Mukus die Reibung, die durch den Weitertransport der Nahrung entsteht, reduziert, werden mechanische Schäden durch harte Nahrungsbestandteile vermieden und die Passage der Nahrung durch den Darm erleichtert (Specian und Oliver, 1991). Außerdem schützen die Mucine die Mukosa vor mikrobiellem Überwachsen und dem Eindringen von Pathogenen, indem sie diese Organismen binden und einfangen. Dies kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen: Einerseits können Pathogene von bestimmten Kohlenhydratstrukturen der Mucine immobilisiert werden, indem epitheliale Glykoproteine oder andere Komponenten der Zellmembran imitiert werden, die von Pathogenen erkannt werden und an die diese binden (Chadee et al., 1987, Sajjan und Forstner, 1990a; Sajjan und Forstner, 1990b). Andererseits können Mucine durch die Interaktion mit sekretiertem IgA Bakterien einfangen, die mit diesem Immunglobulin beschichtet sind (Phalipon et al., 2002; Magnusson und Stjernstrom, 1982). Eine weitere wichtige Funktion der Mukusschicht ist der Schutz der Epithelschicht vor Verdauung, da sie als Substrat für Verdauungsenzyme dient (Variyam und Hoskins, 1981).

Die Erhaltung der Mukusschicht wird durch eine langsame, kontinuierliche Basis-Sekretion von Mucin durch die Becherzellen gewährleistet (Neutra et al., 1977). Werden Becherzellen gereizt, z.B. durch cholinerge Stimulation (Specian und Neutra, 1980; Specian und Neutra, 1981; Specian und Neutra, 1982), intestinale Anaphylaxie (Lake et al., 1980) oder chemische und physikalische Irritationen (Neutra et al., 1982), so kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer Sekretion der gespeicherten Mucine. Nach der Ausschüttung der Mucine regenerieren sich die Becherzellen innerhalb kurzer Zeit vollständig und füllen ihre Speichervesikel mit neusynthetisierten Mucinen wieder auf.

2.4.2 Heterogenität der Mucine

Olivier (2003) konnte zeigen, dass die Glykosylierung nasaler Mucine beim Menschen eine hohe individuelle Variabilität aufweist und vermutlich unter anderem vom Gesundheitszustand der Menschen zum Zeitpunkt der Mucinspende abhängt. Auch eine

Blutgruppen-abhängige Bindung von CTB und N-Acetyl-Galactosamin-spezifischen Lektinen an diese Mucine konnte nachgewiesen werden (Olivier, 2003). Diese Individualität stellt im Hinblick auf die Anwendung von partikulären Kontrastmitteln insofern ein Problem dar, als das sichergestellt sein muss, dass selbst durch die verschiedensten Mucine das Kontrastmittel nicht abgefangen wird. Daher ist es zwingend erforderlich, potentielle partikuläre Kontrastmittel vor ihrem Einsatz im Menschen auf ihre Abfangrate durch Mucine zu testen.

Um die Mucin-Bindungseigenschaften neuer Kontrastmittel im Hochdurchsatz analysieren zu können, bieten sich Festphasen-basierte Verfahren mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes Mucin an. Da von den sekretierten Mucinen des Verdauungstraktes MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6 (Cornberg et al., 2001) das Mucin MUC5AC am besten zugänglich ist, weil es auch ein Hauptbestandteil des nasalen Mukus ist (Groneberg et al., 2003), bietet sich dieses Mucin zur Entwicklung eines entsprechenden *in vitro* Testsystems an. Darüber hinaus existieren bereits diverse kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen humanes MUC5AC (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Kommerziell erhältliche Antikörperklone gegen humanes MUC5AC Protein.

Immunogen	Spezifität	Klon
MUC5AC Mucin aus der Flüssigkeit einer humanen, ovarialen, muzinösen Zyste	Ein Epitop des Proteinkerns im humanen MUC5AC-Protein	1-13M1 / 2-11M1 / 2-12M1 / 9-13M1 / 45M1 / O.N.457 / O.N.458 / 2X123 / 3G199 / 8L839 / LS-C45654 / LS-C16664 / LS-C16665 / LS-C9122
Rekombinantes humanes MUC5AC Protein	Rekombinantes humanes MUC5AC Protein	2H7 / LS-B1927 / SPM488
Synthetisches Peptid der „Tandem-Repeat“ Sequenz des humanen MUC5AC Proteins	„Tandem-Repeat“ des humanen MUC5AC Proteins	CLH2 / CLH5 / 2Q445 / LS-C16663

Die Bezeichnungen der jeweiligen Klone sind durch Schrägstriche getrennt.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Fehlen einer Glykocalyx auf den Epithelzellen entarteter Darmschleimhaut könnte zur Früherkennung von Darmkrebs genutzt werden. Bis jetzt wurde die Abwesenheit einer Glykocalyx allerdings nur anhand von *in vitro* Untersuchungen an einer humanen Darmkrebszelllinie nachgewiesen.

Daher war ein Ziel dieser Arbeit die Überprüfung der *in vivo* Situation anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen muriner und humaner Darmschleimhaut. Die MIN-Maus wurde zur Untersuchung der Vorstufen kolorektaler Karzinome ausgewählt, da sie spontan zahlreiche adenomatöse Polypen im Darm entwickelt. Im humanen Gewebe sollte vor allen die Schleimhaut von kolorektalen Karzinomen untersucht werden, welche den Patienten operativ entfernt wurde. Wurden im Darmresektat der Patienten auch Polypen diagnostiziert, so konnten zusätzlich auch diese humanen Krebsvorstufen untersucht werden.

Erste Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die optische Markierung von entartetem Darmgewebe z.B. durch partikuläre Kontrastmittel erfolgen könnte. Allerdings dürfen diese Partikel nicht vom Mukus im Darmlumen abgefangen werden. Um die Abfangrate möglicher Kontrastmittel durch Mucin im Vorfeld zu testen, muss ein entsprechendes Testsystem zur Verfügung stehen. Voraussetzung hierfür sind monoklonale Antikörper, die nicht die variablen Strukturen des Mucins erkennen. Auf ihre Eignung in einem solchen *in vitro*-Testsystem wurden daher zunächst im Rahmen dieser Arbeit einige kommerziell erhältliche anti-MUC5AC-Antikörper analysiert und schließlich selbst monoklonale Antikörper gegen humanes MUC5AC Protein hergestellt und auf ihr Bindungsverhalten untersucht.

3.2 Spezielle Geräte und Apparaturen

Bezeichnung	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Dot Blotter SRC 96D Minifold I	Schleicher & Schuell (Dassel)
ELISA-Reader Versa Max	Molecular Devices (Ismaning)
ELISA-Washer Columbus Pro	Tecan (Crailsheim)
Gelelektrophoreseapparatur Owl P8DS	Owl Separation Systems (Portsmouth, NH, USA)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
Pyramitom 11800	LKB (Stockholm, Schweden)
Transmissionselektronenmikroskop EM910	Zeiss (Oberkochen)
Ultrotom 4801 A (Mikrotom)	LKB

3.3 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Dialyseschlauch Spektra/Por MWCO 12000-15000	Spektrum (Rancho Dominguez, USA)
Dünnstegnetzchen (400 mesh)	Plano (Wetzlar)
Küvetten UVette	Eppendorf
<u>96-Loch Mikrotiterplatten</u>	
hochbindend, Polystyrol, Flachboden	Corning (Wiesbaden)
unbehandelt, Polystyrol, Flachboden	Corning
Nitrocellulosemembran Protran, 0,2 µm	Whatman (Dassel)
Vivaspin 20 Zentrifugal-Konzentratoren mit Diafiltration Cups	Sartorius (Göttingen)
<u>Zellkultur-Zubehör</u>	
Zellkulturflaschen, 75 und 175 cm ²	Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturplatten, 6- und 96-Loch	Nunc
Klonierungsplatten, 24-Loch	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Kryoröhrchen	Nunc

3.4 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien wurden in p.a. Qualität von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) erworben und werden hier nicht detailliert aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid 4K Lösung (40 %) Mix 29:1	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie
Blei(II)nitrat	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Cacodylsäure, Natriumsalz Trihydrat	Roth
Cystein·HCl	Pierce Biotechnology (Bonn)
Dodecenybernsteinsäureanhydrid (DDSA)	Polysciences Europe (Eppelheim)
N,N'-Dimethylacetamid	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP 30)	Polysciences Europe
di-Na-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Epon 812	Serva (Heidelberg)
37 %ige Formaldehydlösung (w/w)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
25 %ige Glutaraldehydlösung (w/w)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Glycerin	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Glycin	Roth
Isofluran	Baxter (Unterschleißheim)
Kaisers Glyceringelatine	Merck
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Kupfer-(II)-sulfat	Roth
N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin	Calbiochem (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie
di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Merck
Natriumthiosulfat	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
N-Hydroxy-Succinimidyl (NHS) -Bromacetat	Molecular Biosciences (Boulder, CO, USA)
NHS-PEG ₄ -Biotin	Interchim (Montlucon, Frankreich)
Nadic Methyl Anhydride (NMA)	Polysciences Europe

Osmiumtetroxid	Polysciences Europe
Polyethylenglycol (PEG) 1500	Roche (Mannheim)
Propylenoxid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Silbernitrat	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Tetrabutylammoniumborhydrid (TBABH)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Chemie
Toluidinblau	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Trypanblau	Invitrogen
Türkislösung	Merck
Tween 20	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Uranylacetat	Merck
30 %ige Wasserstoffperoxidlösung (w/v)	Applichem

3.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
BM Condimed H1	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie
Dulbecco's PBS (1×) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories (Pasching)
Fötale Rinderserum (FCS) „Gold“ Category „EU“	PAA Laboratories
D-Glukose Monohydrat	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Hanks' BSS (1×) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories
HAT (50×)	Invitrogen
HT (50×)	Invitrogen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	Invitrogen
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA Laboratories

3.6 Proteine und Peptide

Bezeichnung	Hersteller
Rinderserumalbumin (BSA), kohlenhydratfrei	MP Biomedicals (Heidelberg)
BSA, Fraktion V	Sigma-Aldrich Chemie
Casein, Hammarsten Qualität	BDH Laboratory Supplies (Poole, UK)
Magermilchpulver	Lactoland (Dülmen)
humane, nasale Mucine	Dr. Verena Olivier (Forschungszentrum Borstel)
Myoglobin	Sigma-Aldrich Chemie
Protein A-Sepharose CL-4B	GE Healthcare (München)
Peptide zur Immunisierung	Rainer Bartels (Forschungszentrum Borstel)

3.7 Antikörper, Lektine und Streptavidin

Bezeichnung	Hersteller
Maus IgG ₁	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach)
Ziege anti-Maus IgG (γ -kettenspezifisch)	Southern Biotech, (Birmingham, AL, USA)
Maus IgG (polyklonal)	Serotec (Oxford, UK)
Maus anti-human MUC5AC IgG ₁ (Klon 1-13M1)	Monosan (Uden, Niederlande)
Maus anti-human MUC5AC IgG ₁ (Klon 2-11M1)	Monosan
Maus anti-human MUC5AC IgG ₁ (Klon 9-13M1)	Monosan
Maus anti-human MUC5AC IgG ₁ (Klon 45M1) Biotin-markiert	NeoMarkers (Fremont, CA, USA)
Ziege anti-Maus IgG (γ -kettenspezifisch) Meerretichperoxidase (HRP)-markiert	Southern Biotech
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor 680-markiert	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Concanavalin A (Con A) Biotin-markiert	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

Ulex europaeus Lektin I (UEA I)

Biotin-markiert

Vector Laboratories

Streptavidin

HRP-markiert

Vector Laboratories

3.8 Nachweissysteme

Bezeichnung

D_C Protein Assay (Lowry)

IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody

(Isotypisierungskit)

Micro BCA Assay

Sigma Marker Wide Range

Hersteller

Bio-Rad (München)

Roche

Pierce Biotechnology

Sigma-Aldrich Chemie

3.9 Software

Bezeichnung

Adobe Photoshop 7

CorelDraw 11 Graphics Suite

EndNote 7

GraphPad Prism 5

ImageJ 1.40g

Microsoft Office 2000

Odyssey Application Software 1.2

SoftMax Pro 4.8

Hersteller

Adobe Systems (München)

Corel (Unterschleißheim)

Thomson ResearchSoft (Carlsbad, CA, USA)

GraphPad Software (San Diego, CA, USA)

NIH (Bethesda, MD, USA)

Microsoft (Unterschleißheim)

LI-COR Biosciences (Bad Homburg)

Molecular Devices

3.10 Häufig verwendete Puffer

D-PBS (10×) Dulbecco's Phosphate-buffered saline

80 g	NaCl
11,5 g	Na ₂ HPO ₄
2 g	KCl
2 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	<i>A. bidest.</i>

D-PBS (1×) 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ (pH 7,3)

100 ml	D-PBS (10×)
ad 1000 ml	<i>A. bidest.</i>

D-PBST D-PBS × 0,05 % (w/v) Tween 20

1 l	D-PBS (1x)
5 ml	10 % (w/v) Tween 20

L-PBS (1×) "Lite" PBS, 10 mM Natriumphosphatpuffer, 10 mM NaCl

0,584 g	NaCl
1,38 g	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O
ad 1000 ml	<i>A. bidest.</i>

mit 1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt

SIF (10×) Simulierte Intestinalflüssigkeit nach Lockwood und Randall (1949)

57,6 g	NaCl
8,67 g	Na ₂ HPO ₄
2,21 g	KCl
2,22 g	KH ₂ PO ₄
ad 1000 ml	<i>A. bidest.</i>

SIF (1×) 8 mM Phosphatpuffer, 4,6 mM K⁺, 111,3 mM Na⁺, 101,5 mM Cl⁻ (pH 7,2)

100 ml	SIF (10×)
ad 1000 ml	<i>A. bidest.</i>

4 Methoden

4.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Darmgewebe

Die Morphologie muriner und humaner Darmschleimhaut wurde elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein oder Fehlen einer Glykocalyx untersucht. Dazu wurde das Gewebe mit Hilfe von Kaliumhexacyanoferrat(II)-reduziertem Osmiumtetroxid fixiert und eingebettet. Nach der Begutachtung von Semidünnschnitten der Gewebeproben wurden Ultradünnschnitte angefertigt und am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ausgewertet.

4.1.1 Murines Gewebe

Zur histologischen Untersuchung der Morphologie muriner Darmschleimhaut wurden multiple intestinal neoplasia (MIN) -Mäuse (C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J) verwendet. MIN-Mäuse entwickeln aufgrund eines genetischen Defekts im *apc*-Gen spontan Adenome im Dün- und Dickdarm (Su et al., 1992). Die Mäuse wurden mit einem Spezial-Futtermittel mit 10 % Fettgehalt gefüttert, da hierdurch die Anzahl an Adenomen erhöht werden kann (Wasan et al., 1997). Gesundes Darmgewebe von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J) diente als Kontrolle. Diese Mäuse wurden mit einem Standard-Futtermittel mit normalem Fettgehalt (3,3 %) ernährt. Die Schleimhaut der Adenome sowie gesunde Darmschleimhaut von MIN- und Wildtyp-Mäusen wurden elektronenmikroskopisch untersucht und verglichen.

Die MIN-Mäuse wurden während ihrer Aufzucht regelmäßig gewogen und bei Gewichtsverlust getötet, da dieser einen Hinweis auf zahlreiche Adenome im Darm und einen dadurch bedingten eventuellen Darmverschluss gibt (Wasan et al., 1997). Die Wildtyp-Mäuse wurden im Alter von 13 bzw. 16 Wochen getötet, um das Darmgewebe zu gewinnen.

Am Morgen der Gewebepreparation wurden die Mäuse für 4-7 h mit Wasser *ad libitum* gefastet. Danach wurden die Tiere in gesättigter Isofluran-Atmosphäre unter Vollnarkose gesetzt und durch zervikale Dislokation getötet. Es wurde eine Laparatomie durchgeführt, der Darm freigelegt und entnommen. Der Dünndarm wurde in die Bereiche Duodenum, Jejunum und Ileum eingeteilt. Das Duodenum umfasste den ersten Zentimeter des

Dünndarms, das Jejunum 2/3 und das Ileum 1/3 des übrigen Dünndarms. Der Dickdarm wurde nicht weiter unterteilt. Die Darmabschnitte wurden längs eröffnet und auf das Vorhandensein von Polypen untersucht. Aus unterschiedlichen Bereichen der Darmschleimhaut (Polyp, gesundes Darmgewebe) wurden Gewebestückchen von etwa 2×2×4 mm Größe zurechtgeschnitten. Diese wurden vorsichtig mit 37 °C warmem D-PBS gespült und anschließend in Gläschen mit 5 ml Natriumcacodylatpuffer gegeben. Sobald von einem Bereich der Darmschleimhaut die Gewebestückchen zurechtgeschnitten und in ein Gläschen überführt waren, wurde mit der Fixierung begonnen (siehe 4.1.3).

4.1.2 Humanes Gewebe

Analysiert wurde Darmgewebe von Patienten der Asklepios Klinik Bad Oldesloe, welches den Patienten aufgrund ihrer Erkrankung (Darmkrebs, Divertikulitis) operativ entfernt worden war.

Zur Untersuchung der Glykocalyx muss das Darmgewebe möglichst schnell fixiert werden, um einen eventuellen Abbau der Glykocalyx, z.B. durch Selbstverdauung, zu vermeiden. Dazu wurde das Darmresektat direkt nach dem chirurgischen Eingriff aus der Asklepios Klinik Bad Oldesloe abgeholt, auf zerstoßenem Eis gekühlt und in die Laborgruppe Klinische und Experimentelle Pathologie des Forschungszentrums Borstel transportiert. Dort wurde das Resektat von einem Pathologen längs eröffnet und unter fließendem Wasser vorsichtig von vorhandenem Darminhalt befreit. Das Gewebe wurde vom Pathologen begutachtet und eingestuft, bevor mit einem Skalpell Gewebestücke (etwa 1 cm³) aus unterschiedlichen Bereichen der Darmschleimhaut (Tumor, gesundes Kolongewebe, falls vorhanden Polypen und Ileum) entnommen wurden. Die entnommenen Gewebestücke wurden dann unmittelbar im Labor weiterverarbeitet. Es wurden Gewebestückchen von etwa 2×2×4 mm Größe zurechtgeschnitten. Diese wurden vorsichtig mit 37 °C warmem D-PBS gespült und in Gläschen mit 5 ml Natriumcacodylatpuffer gegeben. Sobald von einem Bereich der Darmschleimhaut die Gewebestückchen zurechtgeschnitten und in ein Gläschen überführt waren, wurde mit der Fixierung begonnen (siehe 4.1.3).

4.1.3 Fixierung, Entwässerung und Einbettung von Gewebe

Während der Fixierung mit Osmiumtetroxid werden die Gewebestückchen sehr hart. Dadurch wird die Glykocalyx sehr empfindlich gegenüber Scherkräften. Um ein Abbrechen der Glykocalyx durch Bewegungen der Gewebe zu vermeiden, wurden alle Lösungen, die für die Fixierung, Entwässerung und Einbettung der Gewebestückchen eingesetzt wurden, sehr vorsichtig in die Gläschen pipettiert bzw. abpipettiert.

Der Natriumcacodylatpuffer wurde abpipettiert und durch 1 ml Fixativ ersetzt, welches erst direkt vor der Zugabe angesetzt wurde. Während der 90-minütigen Fixierung wurde das Fixativ alle 10 min durch frisches ersetzt. Nach der Fixierung wurde das Gewebe 10 min in 5 ml Natriumcacodylatpuffer gewaschen. Die Entwässerung erfolgte durch eine in der Konzentration ansteigende Ethanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 2×100 %), wobei die Gewebestückchen jeweils 15 min in 2 ml Ethanol inkubiert wurden. Anschließend folgte eine zweimalige fünfminütige Inkubation in 2 ml Propylenoxid. Die Gewebestückchen wurden nun schrittweise mit Epon 1:1 Einbettmedium infiltriert: über Nacht (ü.N.) bei 4 °C in einem Gemisch aus 50 % Epon 1:1 und 50 % Propylenoxid, am nächsten Tag für mindestens 3 h bei Raumtemperatur (RT) in Epon 1:1. Anschließend wurden die Gewebestückchen zusammen mit Epon 1:1 sowie Markierungsschildern in Einbettformen gegeben und über 48 h bei 60 °C ausgehärtet.

Die ausgehärteten Gewebeblöcke konnten nun für die Auswertung des Gewebes mittels Semidünnschnitten (siehe 4.1.4) und Ultradünnschnitten (siehe 4.1.5) verwendet werden.

Natriumcacodylatpuffer	0,1 M Cacodylsäure, Natriumsalz (pH 7,4)
Fixativ	0,25 ml Kaliumhexacyanoferrat(II)-Stammlösung 0,25 ml 2 % Osmiumtetroxid 0,5 ml Fixativ-Vormischung
Kaliumhexacyanoferrat(II)-SL	1,5 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat ad 100 ml A. <i>bidest.</i> (Lösung nicht länger als einen Tag verwenden)
2 % Osmiumtetroxid (w/v)	1 g Osmiumtetroxid 50 ml A. <i>bidest.</i>

Fixativ-Vormischung	2 ml 25 %ige Glutaraldehydlösung 5 ml 0,2 M Cacodylsäure, Natriumsalz (pH 7,4) 3 ml A. <i>bidest.</i> (Lösung nicht länger als einen Tag verwenden)
Epon 1:1	2 Teile Epon-SL A 1 Teil Epon-SL B 2 % (v/v) DMP 30
Epon-SL A	6,2 ml Epon 812 10 ml DDSA
Epon-SL B	10 ml Epon 812 8,9 ml NMA

4.1.4 Herstellung, Färbung und Bewertung von Semidünnschnitten

Beim humanen Gewebe wurden von den eingebetteten Gewebestücken zunächst Semidünnschnitte von etwa 200 nm Dicke angefertigt, welche durch einen Pathologen mikroskopisch begutachtet und eingestuft wurden. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Pyramitoms sowie Glasmessern angefertigt, dann auf einen mit einem Wassertropfen benetzten Objektträger überführt und zur Anheftung getrocknet. Die Anfärbung der Schnitte erfolgte für 2-4 min mit Toluidinblaulösung. Anschließend wurden sie in Kaisers Glyceringelatine eingebettet. Die Semidünnschnitte wurden lichtmikroskopisch beurteilt und fotografiert. Anhand der Schnitte wurden die Bereiche ausgewählt, die im TEM untersucht werden sollten.

Die eingebetteten Gewebestücke der MIN- und Wildtyp-Mäuse mussten nicht pathologisch begutachtet werden. Hier wurden Semidünnschnitte angefertigt, um die Bereiche auszuwählen, die im TEM untersucht werden sollten. Die Schnitte wurden dafür nicht angefärbt.

Toluidinblaulösung 0,1 % (w/v) Toluidinblau in 2,5 %iger (w/v) Natriumcarbonatlösung

4.1.5 Herstellung, Färbung und Auswertung von Ultradünnschnitten

Von den ausgewählten Bereichen, welche im TEM untersucht werden sollten, wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Hierzu wurde mit Hilfe des Pyramitoms eine Pyramide an der ausgewählten Position der Gewebeblöcke geschnitten. Mit einem Diamantmesser wurden nun am Mikrotom Ultradünnschnitte von 50-100 nm Dicke angefertigt. Diese wurden auf Dünnsteg-Netzchen aufgezogen und nach dem Trocknen mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Dazu wurden die Netzchen erst 5 min mit den Schnitten nach unten auf einen Tropfen Uranylacetatlösung gelegt, kurz in *A. bidest.* gewaschen, dann 15 min auf einen Tropfen Bleicitratlösung gelegt, kurz in Waschlösung sowie in *A. bidest.* gewaschen und anschließend getrocknet. Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte am TEM.

Von jedem Patienten wurden pro vorhandenem Bereich der Darmschleimhaut zwei Gewebeblöcke ausgewertet. Je Block wurden zwei repräsentative Aufnahmen aus nicht überlappenden Regionen der Epithelschicht angefertigt, die das Vorhandensein bzw. das Fehlen einer Glykocalyx dokumentieren. Diese Aufnahmen wurden eingescannt und anschließend mit Hilfe der Bildanalyse-Software CorelDraw und ImageJ analysiert. Dabei wurde zunächst die Höhe der Glykocalyx vermessen (5 Messwerte pro Aufnahme) und auf das Vorliegen einer Normalverteilung untersucht. Dann wurde basierend auf einer Normalverteilung das 5 % Perzentil, also der Wert, oberhalb dessen 95 % aller Werte der Normalverteilung lagen, bestimmt. Bereiche, in denen die Glykocalyx-Höhe unter diesem Wert lag, wurden als Bereiche ohne Glykocalyx eingestuft. Die Länge der Epithelschicht mit und ohne Glykocalyx wurde anschließend quantifiziert.

Die statistische Analyse erfolgte mittels der GraphPad Prism-Software. Es wurden receiver operator characteristic (ROC) -Kurven erstellt, und für jede Kurve wurde die area under curve (AUC) errechnet. Sensitivität und Spezifität der Glykocalyx als Biomarker zur Unterscheidung von gesundem und entartetem Gewebe wurden am optimalen Grenzwert (cut-point) der ROC-Kurven bestimmt.

Uranylacetatlösung 1 ml Uranylacetat-SL
 1 ml Aceton

Uranylacetat-SL	1,6 g Uranylacetat ad 20 ml <i>A. bidest.</i>
Bleicitratlösung	0,665 g Blei(II)nitrat 0,88 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat 20 ml kochendes <i>A. bidest.</i> 20 min schütteln 0,16 g Natriumhydroxid ad 25 ml <i>A. bidest.</i> Ultraschallbehandlung, bis Lösung klar ist pH mit NaOH auf 12,0 einstellen
Waschlösung	10 ml <i>A. bidest.</i> 1 Tropfen 1 M NaOH

4.2 Allgemeine Proteinchemische Arbeiten

4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurden die Verfahren nach Lowry et al. (1951) und nach Smith et al. (1985) verwendet. Diese basieren beide auf einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ . Im ersten Fall erfolgt der Nachweis von Cu^+ mit Folin-Ciocalteu-Reagenz und im zweiten Fall mit Bicinchoninsäure (BCA).

4.2.1.1 Proteinbestimmung mittels DC Protein Assay (Lowry)

In einer unbehandelten Mikrotiterplatte mit Flachboden wurden vom Proteinstandard Duplikate verschiedener Verdünnungen in einem Gesamtvolumen von 5 μl *A. bidest.* pro Kavität angefertigt. Auch von den zu analysierenden Proben wurden unterschiedliche Verdünnungen angefertigt. Eine Reaktionslösung von 25 μl Reagenz A+S und 200 μl Reagenz B des D_C Protein Assays wurde zu jeder Probe gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 15 min bei RT inkubiert und danach die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm im ELISA-Reader gemessen. Der Proteingehalt wurde mittels einer Eichgeraden des Proteinstandards bestimmt.

Reagenz A+S 49 Volumenteile Reagenz A + 1 Volumenteil Reagenz S

4.2.1.2 Proteinbestimmung mittels Micro BCA Assay

In einer unbehandelten Mikrotiterplatte mit Flachboden wurden vom Proteinstandard Duplikate verschiedener Verdünnungen in einem Gesamtvolumen von 100 µl D-PBS pro Kavität angefertigt. Auch von den zu analysierenden Proben wurden verschiedene Verdünnungen angefertigt. Zu jeder Probe wurden 100 µl einer frisch bereiteten Reaktionslösung des Micro BCA Assays hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde 60 min bei 60 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm im ELISA-Reader gemessen. Der Proteingehalt wurde mittels einer Eichgeraden des Proteinstandards bestimmt.

Reaktionslösung 25 Volumenteile Lösung A
 24 Volumenteile Lösung B
 1 Volumenteil Lösung C

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteinfärbung

Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli, 1970) werden Proteine in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Dazu werden die Proben vor der Elektrophorese in SDS-Probenauftragspuffer denaturiert. Durch das enthaltene β -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken reduziert. Nach der Gelelektrophorese können die Proteinbanden z.B. durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht werden.

4.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gel

Zwei gesäuberte und entfettete Glasplatten wurden in einem dafür vorgesehenen Kunststoffbeutel übereinandergelegt und so eingespannt, dass durch zwei Abstandshalter zwischen den Platten ein Hohlraum von 1 mm Dicke entstand. Darin wurde bis zu einer Höhe von 7 cm ein 10 %iges Trenngel gegossen und zur Ausbildung einer ebenen Grenzfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, die Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und ein Taschenformer eingesetzt. Die Polymerisation des Gels erfolgte innerhalb von 30-45 min bei RT.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels.

	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
<i>A. bidest.</i>	3,05 ml	2,63 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,88 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	0,47 ml
40 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (29:1)	2,48 ml	0,62 ml
10 % SDS (w/v)	75 µl	38 µl
TEMED	11,25 µl	7,5 µl
10 % APS (w/v)	45 µl	30 µl

4.2.2.2 Elektrophorese

Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamid-Gel mit $\frac{1}{4}$ Endvolumen reduzierendem Probenauftragspuffer versetzt, 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend kurz auf zerstoßenes Eis gestellt. Dann wurden die Proben sowie ein Molekulargewichts-Standard in separate Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Vertikal-Gelelektrophoreseapparatur bei 12 mA.

Probenauftragspuffer (4×) 40 % (w/v) Glycerin

8 % (w/v) SDS

25 % (v/v) β -Mercaptoethanol

0,004 % (w/v) Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer 25 mM Tris-Base

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

4.2.2.3 Silberfärbung

Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden einer Silberfärbung (Oakley, 1980) unterzogen, da sich mit dieser Methode weniger als 1 ng Protein pro Bande nachweisen lässt. Die Färbung erfolgte in einer Glasschale bei RT auf einem Wippschüttler nach folgendem Schema:

Vorfixierer I	30 min
Vorfixierer II	ü.N.
<i>A. bidest.</i>	2 × 10 min
Fixierer	15 min
<i>A. bidest.</i>	3 × 10 min
Silber-Färbelösung	20 min
<i>A. bidest.</i>	maximal 15 min
Entwickler	5-30 min (je nach gewünschter Färbeintensität)
<i>A. bidest.</i>	3 × 5 min
Entfärber	bis zum gewünschten Hintergrund
Stoppbad	10 min
<i>A. bidest.</i>	3 × 5 min

Danach wurden die Gele in *A. bidest.* gelagert.

Vorfixierer I	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Vorfixierer II	5 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure
Fixierer	1,98 g di-Natriumtetraborat-Decahydrat ad 100 ml <i>A. bidest.</i> , lösen, 4,17 ml 25 %ige Glutaraldehydlösung
Silber-Färbelösung	19,2 ml <i>A. bidest.</i> 1,84 ml 1 M NaOH 2 ml 25 %ige Ammoniaklösung 4 ml 20 % (w/v) AgNO ₃ langsam unter Rühren zutropfen, ad 100 ml <i>A. bidest.</i>
Entwickler	10 ml Ethanol 60 µl 10 %ige (w/v) Zitronensäurelösung 26 µl 37 %ige Formaldehydlösung ad 100 ml <i>A. bidest.</i>

Entfärber	1 ml Entfärbelösung A 1 ml Entfärbelösung B ad 100 ml A. <i>bidest.</i>
Entfärbelösung A	1,76 M Natriumthiosulfat (frisch zubereitet)
Entfärbelösung B	0,633 M NaCl 0,148 M ammoniakalisches Kupfer-(II)-sulfat (soviel NH ₃ zugeben, dass sich das Hydroxid gerade wieder löst)
Stoppbad	10 % (v/v) Essigsäure

Der Fixierer, die Silber-Färbelösung, der Entwickler und der Entfärber wurden jeweils frisch angesetzt.

4.3 Immunoverfahren

4.3.1 Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Dot Blot)

Das Dot Blot-Verfahren ist eine Methode zur schnellen Immobilisierung von Proteinen ohne vorherige gelelektrophoretische Separation. Die zu untersuchende Probe wird direkt auf die Nitrocellulosemembran aufgebracht und das enthaltene Protein durch Trocknen immobilisiert. Dieses wird dann mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die Detektion der Proteine erfolgte indirekt, indem die Bindung eines unmarkierten, spezifischen Primärantikörpers an das Zielmolekül durch einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde.

Die Proteinlösungen (humane, nasale Mucine) wurden entweder manuell (< 5 µl) auf trockene Nitrocellulosemembranen getüpfelt oder bei größeren Volumina (50 µl) mittels des vakuumbetriebenen Dot Blotter SRC 96D Minifold-Systems nach Protokoll des Herstellers auf die Membran transferiert. Hierfür wurde die Nitrocellulosemembran zuvor mit A. *bidest.* befeuchtet.

Nach der Immobilisierung der Mucine wurden die Nitrocellulosemembranen jeweils für 5-10 min erst 3× in D-PBS und anschließend 2× in Waschpuffer gewaschen. Zum Blockieren freier Proteinbindestellen wurden die Membranen danach für mindestens 90 min bei RT in Blocking-Puffer inkubiert. Alle Inkubations- und Waschzyklen wurden

auf einem Wippschüttler durchgeführt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (kommerziell erhältliche anti-MUC5AC-Antikörper: 300 ng/ml; selbst hergestellte anti-MUC5AC-Antikörper: 1 µg/ml) erfolgte in Blocking-Puffer ü.N. bei 4 °C. Anschließend wurden die Membranen 6× für jeweils 5-10 min in Waschpuffer gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Blots wurden für 90 min bei RT mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG-Alexa Fluor 680, 1:5000 in Inkubationspuffer) inkubiert. Dann wurden die Membranen erneut jeweils 5-10 min gewaschen, erst 4× in Waschpuffer und danach 2× in D-PBS, um das im Waschpuffer enthaltene Detergenz zu entfernen. Der Nachweis des Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging Systems bei einer Wellenlänge von 700 nm. Die Signalintensitäten der einzelnen Dots wurden mit Hilfe der Odyssey Application Software ausgewertet.

Waschpuffer 0,1 % (w/v) Tween 20 in D-PBS

Blocking-Puffer 1 % (w/v) Casein bzw. 5 % (w/v) Magermilchpulver in D-PBS

Inkubationspuffer 0,05 % (w/v) Tween 20 in Blocking-Puffer

4.3.2 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dem Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion detektiert werden können. Durch den Signalverstärkungseffekt der Enzymreaktion sind dabei schon geringe Mengen an Antigen / Antikörper nachweisbar.

4.3.2.1 Test von Absättigungsreagenzien

Etablierte Absättigungsreagenzien wurden mit einem neuartigen Absättigungsreagenz verglichen. Hierzu wurde das Austauschverhalten der Reagenzien gegen Proteine und die Sensitivität eines Immunglobulin-Capture-ELISA unter Verwendung der Absättigungsreagenzien überprüft.

4.3.2.1.1 Austausch-ELISA

Die Bindestellen hochbindender Mikrotiterplatten wurden mit den zu testenden Absättigungsreagenzien blockiert. Dazu wurden in jede Kavität 250 µl Absättigungsreagenz pipettiert und die Platten für 7-8 h bei RT inkubiert. Danach wurde 4× mit 300 µl D-PBS pro Kavität gewaschen und eine Verdünnungsreihe mit fötalem Rinderserum (FCS) aufgetragen. Hierfür wurden 75 µl FCS mit 75 µl Absättigungsreagenz gemischt und in die Startkavitäten der Verdünnungsreihen pipettiert. In die übrigen Kavitäten wurden je 75 µl Absättigungsreagenz vorgelegt und mit 75 µl der FCS-Lösung der vorherigen Kavität versetzt, so dass durch das Transferieren das FCS 1:2 seriell verdünnt wurde. Die Platten wurden dann ü.N. bei 4 °C inkubiert und anschließend 4× mit 300 µl D-PBS pro Kavität gewaschen. Nun wurden 75 µl des biotinylierten Lektins Concanavalin A (ConA) in einer Konzentration von 1 µg/ml in Absättigungsreagenz in die Kavitäten gegeben und die Platten für 3 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden 6× mit 300 µl D-PBST pro Kavität gewaschen. Dann wurden pro Kavität 75 µl Meerrettichperoxidase-markiertes Streptavidin (SA-HRP 1 µg/ml in Absättigungsreagenz) aufgetragen und für 90 min bei RT inkubiert. Zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrundes wurde eine Spalte nur mit Absättigungsreagenz und SA-HRP behandelt. Nach nochmaligem, wiederholtem Waschen der Platten mit D-PBST wurden pro Kavität 75 µl TMB-Substratlösung aufgetragen und die Farbentwicklung nach 10 min durch Zugabe von 125 µl 1 M H₂SO₄ pro Kavität gestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader ermittelt.

TMB-Substratlösung nach Frey et al. (2000)

Lösung A (205 mM Kaliumcitratpuffer × 3,075 mM H₂O₂)

172,2 ml Kaliumcitratpuffer

ad 210 ml *A. bidest.*

66 µl 30 % (w/v) H₂O₂

Aufbewahrung bei 4 °C

250 mM Kaliumcitratpuffer 52,5 g Zitronensäure × H₂O

ad 1000 ml *A. bidest.*

Mit KOH auf pH 4,0 eingestellt, sterilfiltriert

Lösung B (41 mM TMB × 8,2 mM TBABH in Dimethylacetamid)

52,2 mg TMB

4,38 ml Dimethylacetamid

868 µl 50 mM TBABH

Lösung B wurde in Mikroreaktionsgefäßen mit geringem Luftvolumen verschlossen; die Gefäße wurden in Gegenwart von Trockenmittel bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

50 mM TBABH

12,9 mg TBABH

987 µl Dimethylacetamid

Ansetzen der Substratlösung

Ein Aliquot von Lösung A und B wurden auf RT angewärmt. Etwa 10 min vor der Verwendung wurden 25 µl Lösung B pro 1 ml Lösung A zugegeben. Nach Durchmischung wurde die Substratlösung bis zur Verwendung im Dunkeln aufbewahrt.

4.3.2.1.2 Sensibilitäts-ELISA

Hochbindende Mikrotiterplatten wurden ü.N. bei 4 °C mit 75 µl pro Kavität einer 7,2 ng/ml Ziege anti-Maus IgG-Lösung in L-PBS beschichtet und anschließend 3× mit 300 µl pro Kavität D-PBST gewaschen. Wie unter 4.3.2.1.1 beschrieben, wurden freie Bindestellen blockiert und die Platten mit D-PBST gewaschen, bevor eine Verdünnungsreihe einer Maus IgG-Lösung (Startkonzentration: 4,8 µg/ml) aufgetragen wurde. Zur Bestimmung der unspezifischen und konzentrationsabhängigen Anheftung des Mausantikörpers an die Mikrotiterplatte wurde für jedes zu testende Absättigungsreagenz eine weitere Verdünnungsreihe angefertigt, bei der die Kavitäten nicht mit dem Ziege anti-Maus IgG beschichtet waren. Die Platten wurden ü.N. bei 4 °C inkubiert und anschließend 4× mit D-PBST gewaschen. Die weitere Durchführung erfolgte analog zu der in 4.3.2.1.1 beschriebenen, aber anstelle von SA-HRP wurde ein Ziege anti-Maus IgG-HRP-Antikörper (1:2000 in Absättigungsreagenz verdünnt) aufgetragen und die Farbentwicklung nach 30 min gestoppt.

4.3.2.2 Sandwich-ELISA

Im Sandwich-ELISA sollen humane Mucine über einen an die Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper eingefangen und durch einen weiteren Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurde zunächst der Assay-Hintergrund bestimmt.

Die Durchführung erfolgte analog zu der unter 4.3.2.1.2 beschriebenen. Die Mikrotiterplatten wurden mit 150 ng/ml bzw. 1 µg/ml der kommerziell erhältlichen anti-MUC5AC-Antikörper in SIF beschichtet. Unspezifische Bindestellen wurden mit dem optimierten Absättigungsreagenz blockiert und die Platten gewaschen. Danach wurden 75 µl biotinylierter anti-MUC5AC-Antikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/ml in Absättigungsreagenz in die Kavitäten gegeben und die Platten für 3 h bei RT inkubiert. Zur Bestimmung des Hintergrundes ohne den biotinylierten Antikörper wurde dieser in einer Spalte weggelassen. Die Platten wurden 4× mit D-PBST gewaschen, dann wurde anstelle des Ziege anti-Maus IgG-HRP-Antikörpers SA-HRP aufgetragen.

4.3.2.3 Nachweis von Antikörpern in Mäuseseren

Mit Hilfe dieses ELISA wurde die Immunreaktion der immunisierten Mäuse überprüft. Die während der Immunisierung gesammelten Mäuseseren (siehe 4.5.4) wurden auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper getestet. Die Antikörpertiter wurden bestimmt, um die Mäuse für die Herstellung monoklonaler Antikörper (siehe 4.5) auszuwählen.

Die Durchführung des ELISA erfolgte analog zu dem unter 4.3.2.1.2 beschriebenen. Die Mikrotiterplatten wurden mit Myoglobin-Peptid-Konjugaten (2 µg/ml) (siehe 4.5.2.2) beschichtet. Als Kontrolle wurde dieselbe Menge einer Myoglobinlösung verwendet. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde Blotto-PBS eingesetzt. Nach dreistündiger Inkubation wurden die Platten gewaschen, bevor eine Verdünnungsreihe der Mäuseseren (Startverdünnung bis zu 1:500000) aufgetragen wurde und die Platten erneut für 3 h bei RT inkubiert wurden. Für die Myoglobin-beschichteten Kavitäten wurde jeweils das zuletzt gewonnene Mäuseserum, das den höchsten Antikörpertiter aufweisen sollte, verwendet. Die Farbentwicklung wurde nach 10 bzw. 30 min gestoppt.

Zur Bestimmung der Antikörpertiter wurde zunächst von den Kontrollwerten ein „Cut-Off“ (CO) nach der von Frey et al. (1998) entwickelten Methode für eine Konfidenz

von 99 % berechnet. Bei zehn mitgeführten Kontrollwerten errechnet sich der CO nach folgender Formel:

$$CO = MW + (STABW \times 2,959)$$

mit MW Mittelwert der Kontrollwerte
 STABW Standardabweichung der Kontrollwerte

Der Antikörpertiter wurde definiert als die höchste Verdünnung der Seren, bei der die Extinktion bei 450 nm oberhalb des errechneten CO lag.

Blotto-PBS 5 % (w/v) Magermilchpulver in D-PBS

4.3.2.4 Test der Hybridomzellen auf Produktion spezifischer Antikörper

Die Zellkulturüberstände der während der Kultivierung (siehe 4.5.8) und Klonierung (siehe 4.5.9) der Hybridomzellen bewachsenen Kavitäten wurden auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper überprüft. Als Antigene wurden die zur Immunisierung eingesetzten Peptide (siehe 4.5.1) und natives, humanes, nasales Mucin (NaA3) verwendet.

4.3.2.4.1 Test der Hybridomzellüberstände mittels Peptid-ELISA

Die Durchführung erfolgte analog zum unter 4.3.2.1.2 beschriebenen ELISA. 1/3 der Kavitäten der Mikrotiterplatten wurde mit 500 ng/ml einer spezifischen Myoglobin-Peptid-Lösung beschichtet. Als Negativkontrolle wurde 1/3 der Kavitäten mit einer unspezifischen Myoglobin-Peptid-Lösung beschichtet und 1/3 mit L-PBS befüllt. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Platten für mindestens 1 h mit Blotto-PBS inkubiert und anschließend gewaschen. Nun wurden 75 µl pro Kavität der Zellkulturüberstände in einer Verdünnung von 1:2 (Peptid 1 und 4) bzw. 1:15 (Peptid 2 und 3) aufgetragen und 2 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Auch die 60-minütige Inkubation mit dem Ziege anti-Maus IgG-HRP-Antikörper erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

4.3.2.4.2 Test der Hybridomzellüberstände mittels Mucin-ELISA

Die Durchführung erfolgte analog zum unter 4.3.2.1.2 beschriebenen ELISA. Die Mikrotiterplatten wurden mit humanem, nasalem Mucin (NaA3, 8 µg/ml) beschichtet. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Platten für mindestens 1 h mit Blotto-PBS inkubiert und anschließend gewaschen. Nun wurden die Zellkulturüberstände entweder unverdünnt oder 1:2 in Blotto-PBS verdünnt aufgetragen und 3 h bei RT inkubiert.

4.4 Biotinylierung von Antikörpern

Antikörper können durch die kovalente Kopplung von Biotin markiert werden. Hierfür wurde N-Hydroxy-Succinimidyl (NHS) -PEG₄-Biotin genutzt, wobei das Biotin über den NHS-Ester an freie Aminogruppen der Antikörper gebunden wurde.

Als Kopplungspuffer wurde D-PBS eingesetzt. Da die zu markierenden anti-MUC5AC-Antikörper nicht in diesem Puffer vorlagen, wurde ein Pufferaustausch durch Dialyse gegen D-PBS durchgeführt.

Je Antikörper wurden 400 µl einer 100 µg/ml Antikörperlösung eingesetzt. Direkt vor Gebrauch wurden 100 µg NHS-PEG₄-Biotin in 100 µl *A. bidest.* gelöst. Das gelöste NHS-PEG₄-Biotin wurde dann in einem 50-fachen molaren Überschuss zum Antikörper zugegeben, die Lösungen wurden sofort gemischt und für 30 min bei RT im Schüttler inkubiert. Danach wurden die Reaktionsmischungen kurz zentrifugiert, um eventuelle Präzipitate zu sedimentieren. Zur Entfernung überschüssigen NHS-PEG₄-Biotins wurden die Überstände gegen D-PBS dialysiert. Die biotinylierten Antikörper wurden portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.5 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes MUC5AC Protein

Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das humane MUC5AC Protein erfolgte nach der Methode von Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975). Milzzellen (B-Lymphozyten), die den gewünschten Antikörper produzieren, werden bei diesem Verfahren mit immortalen Myelomzellen zu sogenannten Hybridomzellen fusioniert. Diese

vereinigen dann die Eigenschaften beider Ausgangszellen. Somit können hochspezifische Antikörper in beliebigen Mengen in der Zellkultur generiert werden.

4.5.1 Auswahl der Peptide

Zur Immunisierung wurden synthetische Peptide aus der Primärsequenz des humanen MUC5AC Proteins eingesetzt. Hierfür wurde über die Suchmaschine Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) nach der Aminosäuresequenz des Proteins gesucht. Da die vollständige Aminosäuresequenz zum Zeitpunkt der Auswahl der Peptide noch nicht bekannt war, konnten nur einzelne Sequenzabschnitte des Proteins ermittelt werden. Für diese Sequenzabschnitte erfolgte eine Vorhersage von Glykosylierungsstellen mit Hilfe des Programms NetOGlyc 3.1 (www.cbs.dtu.dk/services/netoglyc; Julenius et al, 2005). Die nicht glykosylierten Bereiche wurden nach Kyte und Doolittle (1982) bezüglich ihrer Hydrophilie analysiert (www.expasy.org/tools/protscale.html, Fenstergröße 17). Für die Immunisierung wurden vier unterschiedliche, möglichst hydrophile 16-18mer Peptidmotive ausgewählt.

Die Peptide wurden freundlicherweise von Herrn Rainer Bartels (Laborgruppe Strukturbiochemie, Forschungszentrum Borstel) mittels Festphasensynthese nach Standard-Fmoc-Methode synthetisiert. Am Carboxy-terminalen Ende der Peptide wurde jeweils ein Cystein angehängt, über das die Kopplung der Peptide an Rinderserumalbumin (BSA) und Myoglobin erfolgte (siehe 4.5.2).

4.5.2 Kopplung der Peptide an BSA und Myoglobin

Moleküle mit einem Molekulargewicht von unter 10 kDa sind normalerweise nicht oder nur sehr schwach immunogen (Ritter und Ladyman, 1995). Um für die zur Immunisierung (siehe 4.5.4) ausgewählten Peptide (etwa 2 kDa) trotzdem eine gute Immunantwort zu erhalten, wurden diese an immunogene Trägerproteine gekoppelt. Als Trägerprotein wurde kohlenhydratfreies BSA eingesetzt.

Für die Testung der Zellkulturüberstände der Hybridomzellen im Peptid-ELISA (siehe 4.3.2.4.1) wurden die Peptide an das Trägermolekül Myoglobin gekoppelt. Die Kopplung erfolgte durch Reaktion der cysteinylierten Peptide mit bromacetyliertem Protein unter Ausbildung einer S-Carboxymethylcysteinbrücke.

4.5.2.1 Kopplung an BSA

Da das zur Kopplung eingesetzte NHS-Bromacetat lichtempfindlich ist, wurde die Reaktion im Dunkeln durchgeführt. Als Kopplungspuffer wurde SBC-EDTA verwendet. In diesem wurden je Peptid 10 mg BSA in einer Konzentration von 30 mg/ml gelöst. Kurz vor Gebrauch wurde eine 100 mg/ml NHS-Bromacetatlösung in DMF hergestellt. Zur Bromacetylierung von BSA wurde zu der auf 4 °C temperierten BSA-Lösung ein 5-facher molarer Überschuss NHS-Bromacetat zum BSA zugegeben. Nach Mischen des Ansatzes wurde die Lösung für 30 min im Über-Kopf-Schüttler bei RT inkubiert. Die Lösung wurde wieder auf 4 °C abgekühlt, erneut ein 5-facher molarer Überschuss NHS-Bromacetat zum BSA zugegeben und wie oben beschrieben inkubiert. Durch Zugabe eines 100-fachen molaren Überschusses an Glycin zum NHS-Bromacetat wurde die Reaktion abgestoppt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 45 min im Über-Kopf-Schüttler. Nach der Aktivierung des BSA wurde die Lösung im Dunkeln gegen SBC-EDTA dialysiert.

Die Peptide wurden in einem 10-fachen molaren Überschuss zum aktivierten BSA eingesetzt. Sie wurden in neue Reaktionsgefäße abgewogen und in je 10 µl DMF gelöst. Dann wurden je 10 mg aktiviertes BSA zugegeben und gemischt. Die Ansätze wurden für 4 h bei RT im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines 10-fachen molaren Überschusses an Cystein zum für die Bromacetylierung eingesetzten NHS-Bromacetat. Die Lösungen wurden bei RT für 90 min im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Danach folgte eine Dialyse der Reaktionsmischungen gegen D-PBS. Die Konzentrationen der Konjugate wurden mit Hilfe des Micro BCA Assays und nach Lowry (siehe 4.2.1) bestimmt. Die Konjugate wurden portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

SBC-EDTA 1 mM EDTA

3 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat, pH 8,3

4.5.2.2 Kopplung an Myoglobin

Je Peptid wurden 10 mg Myoglobin eingesetzt. Die Kopplung der Peptide an Myoglobin erfolgte analog der Kopplung an BSA (siehe 4.5.2.1). Allerdings wurden 20 mg/ml Myoglobin-SL verwendet und das Myoglobin durch einen insgesamt 5-fachen molaren

Überschuss NHS-Bromoacetat zum Myoglobin aktiviert. Die Peptide wurden in einem 10-fachen molaren Überschuss zum Myoglobin eingesetzt.

4.5.3 Versuchstiere

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das humane MUC5AC Protein wurden weibliche Balb/c-Mäuse verwendet, die zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung sieben Wochen alt waren.

4.5.4 Immunisierung

Um die Immunreaktion während der Immunisierungen zu überprüfen, wurde den Mäusen vor der Erstimmunisierung (Präimmunserum) und vor jeder Booster-Immunisierung Blut aus der Schwanzvene entnommen. Das Blut wurde ü.N. bei RT aufbewahrt und anschließend eine weitere Stunde bei 4 °C. Dann wurde es 15 min bei $16100 \times g$ und 4 °C zentrifugiert, um die geronnenen Bestandteile abzutrennen und das Serum zu gewinnen. Das Serum wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Antikörpertiter der Seren wurden im ELISA (siehe 4.3.2.3) bestimmt. Die Mäuse mit den besten Antikörpertitern wurden für die Fusion (siehe 4.5.7) ausgewählt.

Erstimmunisierung: Die Mäuse wurden mit je 50 µg Peptid-Konjugat in Kombination mit 50 µg N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin als Adjuvans, gelöst in 200 µl sterilem D-PBS, immunisiert. Die Applikation erfolgte intraperitoneal.

Booster-Immunisierungen: Es erfolgten zwei bis fünf Booster-Immunisierungen mit der gleichen Menge an Antigen und Adjuvans wie bei der Erstimmunisierung, um die Antikörper-Produktion weiter zu stimulieren. Die erste Booster-Immunisierung erfolgte drei Wochen nach der Erstimmunisierung, die weiteren Booster-Immunisierungen erfolgten in Abständen von zwei bis vier Wochen.

„Final Boost“: Abschließend wurden die Mäuse, deren Milzzellen zur Fusion eingesetzt werden sollten, an drei aufeinander folgenden Tagen immunisiert. Hierbei wurden den Mäusen je 50 µg Peptid-Konjugat in 200 µl sterilem D-PBS ohne Zusatz von Adjuvans intraperitoneal injiziert. Zwei Tage später wurden die Milzzellen für die Fusion gewonnen (siehe 4.5.6).

4.5.5 Vorbereitung der Myelomzelllinie P3X63Ag8/653 für die Fusion

Am Tag der Fusion wurden die kultivierten Myelomzellen (siehe 4.6.1) geerntet. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei $200 \times g$ und RT zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die Zellen resuspendiert, in einem Röhrchen mit 50 ml 37°C warmem Zellwaschmedium (ZWM) vereinigt und nochmals zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 25 ml ZWM resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden $10 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension mit $90 \mu\text{l}$ Trypanblau versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden bis zur Verwendung auf zerstoßenem Eis aufbewahrt.

Zellwaschmedium 45 ml FCS
202,5 ml Hanks BSS
202,5 ml PBS

4.5.6 Präparation der Milzzellen

Zur Gewinnung der Milzzellen wurde den immunisierten Mäusen nach Anästhesierung in gesättigter Isofluran-Atmosphäre und Tötung mittels zervikaler Dislokation die Milz steril entnommen und in eine Petrischale mit 37°C warmem ZWM überführt. Auch alle nachfolgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Um unerwünschte Zellfusionen mit Fett- oder Bindegewebszellen zu vermeiden, wurde das umgebende Fettgewebe der Milzen entfernt. Die Milzen wurden dann in eine neue Petrischale mit 5 ml ZWM überführt und mit einer mit 5 ml ZWM gefüllten Spritze gründlich perfundiert und ausgespült. Anschließend wurden weitere Milzzellen durch sanftes Klopfen mit einer Pinzette aus den Milzen herausgedrückt. Die in Suspension befindlichen Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt, die noch an der Petrischale haftenden Zellen wurden durch einmaliges Waschen der Schale mit 5 ml ZWM abgelöst und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen verbracht. Die vereinigte Suspension wurde für 10 min in ein Eisbad gestellt, um größere Gewebestücke zu sedimentieren. Dann wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei $200 \times g$ und RT zentrifugiert. Die sedimentierten Milzzellen wurden in 30 ml ZWM resuspendiert. Zur Bestimmung der

Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Türks-Lösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

1/3 der Milzzellen wurden als Feederzellen verwendet. Diese wurden vor der Fusion abgenommen und bis zur Verwendung auf zerstoßenem Eis aufbewahrt.

4.5.7 Fusion

Die Milzzellen wurden mit den Myelomzellen in einem Verhältnis von 2:1 in einem Zentrifugenröhrchen gemischt, die Mischung mit ZWM auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei $200 \times g$ und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet vorsichtig aufgeklopft und 1 ml 37°C warmes PEG 1500 zugegeben. Nach einminütiger Einwirkzeit unter vorsichtigem Schnippen gegen das Röhrchen wurde das PEG 1500 durch tropfenweise Zugabe von 37°C warmem Ausverdünnungspuffer (AVP) nach folgendem Schema langsam verdünnt, wobei das Röhrchen ununterbrochen in der Hand gerollt wurde:

in der 1. Minute: 0,5 ml AVP

in der 2. Minute: 0,5 ml AVP

in der 3. Minute: 1 ml AVP

in der 4. Minute: 1 ml AVP

in der 5. Minute: 2 ml AVP

Innerhalb der nachfolgenden 10 min wurde bis zum Erreichen von 50 ml Endvolumen weiterhin AVP zugegeben. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Kippen des Röhrchens resuspendiert und für 10 min bei $200 \times g$ und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in HAT-Medium resuspendiert und mit den Feederzellen (siehe 4.5.6) versetzt. Dann wurde 1 ml dieser Suspension je Kavität in 24-Loch Klonierungsplatten ausgesät und bei 37°C , 95 % Luftfeuchtigkeit und 7,5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

Ausverdünnungspuffer 60 ml Hanks BSS
 60 ml PBS

HAT-Medium	500 ml RPMI 1640
	6,25 ml L-Glutamin
	6,25 ml Penicillin/Streptomycin
	6,25 ml 25 % (w/v) D-Glukose
	93,75 ml FCS
	312,5 µl 0,1 M β -Mercaptoethanol
	12,5 ml HAT

4.5.8 Selektion der Hybridomzellen

Die Hybridomzellen wurden nach der Fusion zur Selektion in HAT-Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, kultiviert. Die Selektion erfolgte über die Nukleotidsynthese. Die Nukleotide (ATP, GTP, CTP, TTP) werden entweder über den „*De Novo pathway*“ (Neusynthese von Nukleotiden) oder den „*Salvage pathway*“ (Nukleotidsynthese über den Umbau von Vorstufen) synthetisiert. Der verwendeten Myelomzelllinie fehlt das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT), sie weist daher einen Defekt im „*Salvage pathway*“ auf. Zur Selektion der Hybridomzellen blockiert man den „*De Novo pathway*“ durch Verwendung von Aminopterin im HAT-Medium. Dadurch sind bei den Myelomzellen beide Stoffwechselwege zur Synthese von Nukleotiden blockiert, sie sterben im HAT-Medium ab. B-Lymphozyten hingegen können über das Enzym HGPRT Purine und Pyrimidine aus Hypoxanthin und Thymidin über den „*Salvage pathway*“ synthetisieren. Als Folge hiervon können im HAT-Medium nur fusionierte Zellen überleben, da die Zellen zum Wachstum sowohl die Eigenschaft der GTP-Synthese (B-Lymphozyten vermittelt) als auch unbegrenzte Teilungsfähigkeit (Myelomzellen vermittelt) benötigen.

Zur Selektion der fusionierten Zellen wurden diese zunächst zwei Wochen in HAT-Medium kultiviert, wobei nach einer Woche ein Mediumwechsel mit frischem HAT-Medium durchgeführt wurde. Nicht fusionierte Myelomzellen starben in dieser Zeit ab. Anschließend wurde das HAT-Medium schrittweise durch HT-Medium ersetzt. Hierzu wurde über den Verlauf von zwei Wochen einmal wöchentlich das halbe Volumen des vorhandenen Mediums durch neues Medium ersetzt. Danach erfolgte ein wöchentlicher Austausch gegen das halbe Volumen Basismedium.

Sobald ein gelber Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators beobachtet wurde oder mindestens 1/16 der Kavität bewachsen war, wurden die Überstände im Peptid-ELISA (siehe 4.3.2.4.1) auf die Sekretion spezifischer Antikörper untersucht.

HT-Medium 500 ml RPMI 1640
 6,25 ml L-Glutamin
 6,25 ml Penicillin/Streptomycin
 6,25 ml 25 % (w/v) D-Glukose
 93,75 ml FCS
 312,5 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol
 12,5 ml HT

Basismedium 500 ml RPMI 1640
 6,1 ml L Glutamin
 6,1 ml Penicillin/Streptomycin
 6,1 ml 25 % (w/v) D-Glukose
 91,5 ml FCS
 305 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol

4.5.9 Klonierung nach dem Prinzip der limitierten Verdünnung

Nach der Fusion (siehe 4.5.7) können pro Kavität der Klonierungsplatten auch mehrere Klone mit unterschiedlicher Spezifität wachsen, so dass die Möglichkeit besteht, dass spezifische Hybridomzellen von unspezifischen oder nicht-Antikörper-produzierenden Hybridomzellen überwachsen werden oder dass Mischungen spezifischer Antikörper entstehen. Um dies zu verhindern und die Monoklonalität einer Antikörper-produzierenden Hybridomzelle zu gewährleisten, wurden die im Peptid-ELISA (siehe 4.3.2.4.1) positiv getesteten Zellen nach dem Prinzip der limitierten Verdünnung (Coller und Coller, 1983) vereinzelt.

Die Zellen der positiv getesteten Überstände wurden in Eppendorfgefäße überführt. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension so verdünnt, dass ein Ansatz mit 5 Zellen/ml zur Verfügung stand. 100 µl dieser Zellsuspension (0,5 Zellen) wurden in jede Kavität einer 96-Loch Kulturplatte pipettiert und bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 7,5 % CO₂ inkubiert. Für die Klonierung wurde das bereits auf den Zellen befindliche Medium weiterverwendet, allerdings wurden diesem

noch 10 % (v/v) BM Condimed H1 zugesetzt. Nach sieben Tagen erfolgte die Zugabe von 100 µl Medium + 10 % (v/v) BM Condimed H1 und nach weiteren sieben Tagen von 50 µl Medium + 10 % (v/v) BM Condimed H1.

Sobald sich die Zellkulturüberstände gelb verfärbten, wurden diese im Peptid-ELISA auf die Produktion spezifischer Antikörper getestet. Die Zellen positiv getesteter Kavitäten wurden aufgeteilt. Ein Teil wurde nach dem Prinzip der limitierenden Verdünnung erneut ausgedünnt, während der andere Teil als Vorrat eingefroren wurde (siehe 4.6.2). Um sicherzustellen, dass alle ausgewählten Klone aus nur einer Ursprungszelle hervorgegangen waren, wurden für jeden Klon insgesamt vier Klonierungen durchgeführt. Ob die spezifischen Antikörper auch in der Lage waren, Mucin als Gesamtprotein zu erkennen, wurde im Laufe der Klonierungen mittels Mucin-ELISA (siehe 4.3.2.4.2) überprüft.

Nach der 4. Klonierung wurden die Hybridomzellen in 6-Loch Kulturplatten überführt und schrittweise auf Basismedium umgestellt. Hierzu wurde bei jeder Teilung die Konzentration des BM Condimed H1 im Basismedium um $\frac{1}{4}$ verringert. Nach dem Entfernen des BM Condimed H1 wurden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen transferiert, expandiert und schließlich in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingefroren (siehe 4.6.2).

4.5.10 Isotypisierung monoklonaler Antikörper

Die Bestimmung des Isotyps der monoklonalen Antikörper erfolgte mit Hilfe des IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche), welcher sowohl die verschiedenen Antikörperklassen IgA, IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ als auch die leichten Ketten λ und κ detektiert.

Die Zellkulturüberstände ausgewählter Hybridome wurden 1:20 in D-PBS verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 150 µl in das Entwicklungsröhrchen des Kit gegeben und nach einer 30-sekündigen Inkubation am Vortexmischer gemischt. Anschließend wurde der Detektionsstreifen in das Röhrchen gegeben. Nach 10 min konnten sowohl die Art der leichten Kette als auch die Antikörpersubklasse auf dem Streifen abgelesen werden.

4.5.11 Produktion monoklonaler Antikörper

Zur Gewinnung größerer Mengen der monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper wurden die entsprechenden Hybridomzellklone in Basismedium expandiert. Die Zellkulturüberstände von zehn konfluent bewachsenen 175 cm² Zellkulturflaschen wurden mit einem Teil der Zellen in neue Kulturflaschen überführt und kultiviert, bis die Mehrzahl der Hybridomzellen abgestorben war. Nun wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und der Zelldebris durch Zentrifugation bei 200 × g für 10 min sedimentiert. Die Antikörper-haltigen Zellkulturüberstände wurden gesammelt und bis zur weiteren Reinigung (siehe 4.5.12) bei -20 °C gelagert.

4.5.12 Affinitätschromatographische Reinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturüberständen

Die Affinitätschromatographie mit Protein A ist eine weit verbreitete Methode zur Antikörperreinigung, bei der die spezifische Affinität des Zellwandproteins Protein A aus *Staphylococcus aureus* zur Fc-Region von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) genutzt wird. Für die Reinigung der Antikörper wurde Protein A-Sepharose CL-4B verwendet, deren Bindungsaffinität pH-abhängig ist, so dass sich die Immunglobuline nach ihrer Bindung in Gegenwart leicht alkalischer Puffer durch einen abfallenden pH-Gradienten eluieren lassen.

250 µg lyophilisierte Protein A-Sepharose CL-4B, welche über eine IgG-Bindungs Kapazität von circa 20 mg/ml verfügt, wurden in 10 ml *A. bidest.* aufgeschwemmt. Dann wurde das Säulenmaterial 5× mit je 10 ml autoklaviertem *A. bidest.* und anschließend 3× mit Auftragspuffer gewaschen. Hierzu wurde das Material jeweils aufgeschwemmt, 15 min zum Absetzen ruhen gelassen und dann der Überstand vorsichtig abgenommen. Nach dem letzten Aufschwemmen wurde das Säulenmaterial 2 h im Auftragspuffer äquilibriert. Dieser wurde danach durch frischen Auftragspuffer ersetzt, dann wurde die Säule gepackt. Der Zellkulturüberstand (siehe 4.5.11) wurde auf die zuvor mit 2 ml Auftragspuffer gespülte Säule aufgebracht.

Zur Antikörperreinigung wurden maximal 48 ml der Zellkulturüberstände aufgetaut, sterilfiltriert (0,2 µm), 1:1 mit Auftragspuffer gemischt und auf die Säulen gegeben.

Anschließend wurden die Säulen mit 5 ml Auftragspuffer gewaschen und die an das Protein A gebundenen Antikörper eluiert. Je nach Isotyp wurden hierfür Elutionspuffer mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet. IgG₁-Antikörper wurden mit Elutionspuffer 1, IgG₂-Antikörper mit Elutionspuffer 2 eluiert. Gesammelt wurden 1 ml Fraktionen, wobei in die Sammelgefäße der IgG₂-Antikörper 2 ml Elutionspuffer 1 vorgelegt und direkt nach der Elution der Antikörperfraktionen noch 3 ml D-PBS zugegeben wurden, um den niedrigen pH-Wert des Elutionspuffers 2 zu neutralisieren und so eine irreversible Denaturierung der Antikörper zu vermeiden. Nach der Elution wurden die Säulen mit 5 ml Auftragspuffer und anschließend mit 2 ml 20 %igem Ethanol gewaschen und bei 4 °C gelagert.

Fraktionen mit einer OD_{280 nm} > 0,02 wurden vereinigt und mit Hilfe von Vivaspin 20 Zentrifugal-Konzentratoren (MWCO 30000) nach Herstellerangaben konzentriert. Danach wurde mit Hilfe von Diafiltration Cups für die Zentrifugal-Konzentratoren ein Pufferaustausch gegen D-PBS durchgeführt. Die gereinigten Antikörper wurden portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationen der Antikörperlösungen wurden mit Hilfe des Micro BCA Assays und nach Lowry (siehe 4.2.1) bestimmt.

Auftragspuffer 0,1 M Natriumphosphat
 3 M NaCl
 pH 8,5

Elutionspuffer 1 0,1 M Citratpuffer, pH 6,0

Elutionspuffer 2 0,1 M Citratpuffer, pH 3,0

4.6 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturmedien wurden vor dem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Bezeichnung PBS kennzeichnet die Verwendung von käuflich erworbenem, sterilem Dulbecco's PBS (ohne Ca & Mg).

4.6.1 Kultivierung der Myelomzelllinie P3X63Ag8.653

Als Partner für die Fusion mit Milzzellen (siehe 4.5.7) wurde die in der Herstellung von monoklonalen Antikörpern etablierte murine Myelomzelllinie P3X63Ag8/653 (Kurzname „Ag8“) eingesetzt. Diese eukaryotische Zelllinie stammt ebenso wie die Milzzellen aus Balb/c-Mäusen und gewährleistet somit eine hohe Kompatibilität bei der Fusion. Ag8 Zellen produzieren selbst keine Antikörper und sind aufgrund eines Defekts im „*Salvage pathway*“ der Nukleotid-Synthese HAT sensitiv, was eine Selektion der Hybridomzellen (siehe 4.5.8) ermöglicht.

Die Ag8 Zellen wurden zwei Wochen vor der Fusion aufgetaut und in einer 75 cm² Zellkulturflasche mit 40 ml Myelomzellmedium bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 7,5 % CO₂ kultiviert. Einen Tag nach der Aussaat wurden die Myelomzellen in eine 175 cm² Kulturflasche passagiert. Hierzu wurden die Zellen durch leichtes Schlagen gegen den Flaschenboden suspendiert und dann mit dem vorhandenem und 30 ml frischem Medium in die neue Kulturflasche überführt. Danach wurden die Zellen je nach Wachstum alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:18 passagiert.

Myelomzellmedium 500 ml RPMI 1640
5,75 ml L-Glutamin
5,75 ml Penicillin/Streptomycin
5,75 ml 25 % (w/v) D-Glukose
57,5 ml FCS
288 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol

4.6.2 Einfrieren von Hybridomzellen

Da sich die Hybridomzellen je nach Stadium der Selektion bzw. Klonierung in unterschiedlichen Medien befanden, wurden auch zum Einfrieren der Zellen die entsprechenden Medien eingesetzt. Kryoröhrchen wurden mit je 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) befüllt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die Hybridomzellen wurden in sterile Eppendorfgefäße überführt und für 10 min bei 200 × g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 900 µl 4 °C kaltem Medium resuspendiert, in die Kryoröhrchen überführt und durch sofortiges Invertieren der Röhrchen mit dem DMSO vermischt. Die Kryoröhrchen wurden in Einfrierboxen, die eine optimale Absenkung der Temperatur um

1 °C pro Stunde ermöglichen, gegeben und zunächst für 24 h bei -80 °C gelagert, bevor sie langfristig in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

5 Ergebnisse

Gesunde Darmepithelzellen scheinen *in vivo* durchgängig von einer dichten Glykocalyx bedeckt zu sein, während an Kolonkarzinomzellen *in vitro* keine oder eine nur sehr rudimentär ausgeprägte Glykocalyx beobachtet wurde. Ob ein solcher Verlust der Glykocalyx auch bei neoplastischen Veränderungen *in vivo* auftritt, war bislang nicht bekannt. Da eine fehlende Glykocalyx bei entarteten Zellen möglicherweise zur Früherkennung von Darmkrebs genutzt werden kann, z.B. durch die spezifische Bindung partikulärer Kontrastmittel an zugänglich gewordene Oberflächenrezeptoren der Zellmembran, sollte die Glykocalyx von Darmtumorgewebe untersucht werden.

Um die Spezifität eines solchen Kontrastmittels zu gewährleisten, muss sichergestellt sein, dass es nicht unspezifisch an die Glykocalyx selbst oder an abundante Glykocalyx-ähnliche Substanzen wie z.B. Mucine bindet. Daher wurden anti-Mucin-Antikörper auf ihre Eignung für ein *in vitro* Testsystem untersucht und letztlich selbst monoklonale Antikörper gegen das humane Mucin MUC5AC hergestellt, welche zur Analyse der Abfangrate möglicher Kontrastmittel durch natives Mucin eingesetzt werden könnten.

5.1 Vergleichende Analyse der Glykocalyx von neoplastischem und gesundem intestinalen Epithel bei Maus und Mensch

Da die Analyse von Humanmaterial immer mit großem administrativen und logistischen Aufwand verbunden ist, wurde die An- oder Abwesenheit einer Glykocalyx auf Darmtumoren zunächst in einem murinen Darmtumormodell studiert und später auf Humanmaterial ausgedehnt.

5.1.1 Analyse der Glykocalyx des murinen Darmepithels

Das am besten untersuchte murine Darmtumormodell ist die MIN (multiple intestinal neoplasia) -Maus (C57BL/6J-*Apc*^{Min}/J). MIN-Mäuse entwickeln aufgrund eines genetischen Defektes im *apc* (*adenomatous polyposis coli*) -Gen spontan zahlreiche adenomatöse Polypen entlang des gesamten Darms (Moser et al., 1990; Su et al., 1992).

Um zu überprüfen, ob sich die Morphologie gesunder Darmschleimhaut der MIN-Maus durch die Mutation des *apc*-Gens von der Schleimhaut der Wildtyp-Maus (C57BL/J) unterscheidet, wurde zunächst das Darmgewebe der Wildtyp-Maus analysiert. Hierzu wurde Gewebe aus den Bereichen Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon einer 13 Wochen alten Wildtyp-Maus präpariert und anschließend am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ausgewertet. Abbildung 5.1 zeigt repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Darmabschnitte dieser Maus. Für alle Abschnitte konnte gezeigt werden, dass die Epithelzellen dicht beieinander stehende Mikrovilli (weiße Pfeile) besaßen, die stets von einer durchgehenden, dichten Glykocalyx (schwarze Pfeile) bedeckt waren.

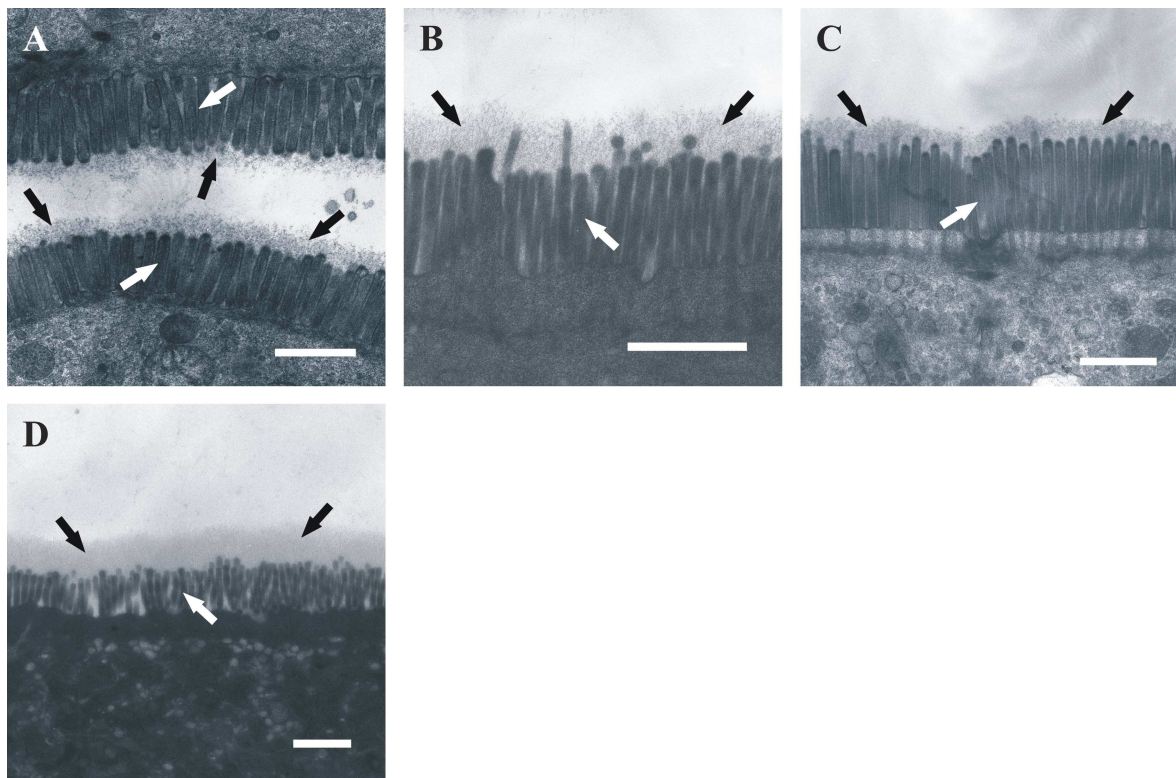


Abbildung 5.1: Elektronenmikroskopische Analyse der Glykocalyx der verschiedenen Darmabschnitte der C57BL/6J Wildtyp-Maus. Gezeigt sind Epithelzellen des Duodenums (A), Jejunums (B), Ileums (C) und Kolons (D). Weiße Pfeile: Mikrovilli, schwarze Pfeile: Glykocalyx. Balken: 1 µm.

Eine mit der C57BL/6J Wildtyp-Maus vergleichbare Morphologie der Darmepithelzellschicht konnte auch im gesunden Darmgewebe der MIN-Mäuse beobachtet werden. Die gesunde Darmschleimhaut der MIN-Mäuse wies weder im Kolon (Abbildung 5.2 A-C) noch im Jejunum oder Ileum (Abbildung 5.3 B und C) Unterschiede zur Schleimhaut der Wildtyp-Maus (Abbildung 5.1 B-D) auf. Auf den Epithelzellen war stets ein Bürstensaum (weiße Pfeile) vorhanden, auf dem sich eine durchgehende,

ausgeprägte Glykocalyx (schwarze Pfeile) befand. Lediglich auf den Epithelzellen des Duodenums der MIN-Mäuse konnten Unterschiede zwischen den MIN-Mäusen und der Wildtyp-Maus festgestellt werden. Während die Glykocalyx bei der Wildtyp-Maus immer vorhanden war (siehe Abbildung 5.1 A, schwarze Pfeile), konnte bei den MIN-Mäusen meist eine Glykocalyx nachgewiesen werden (Abbildung 5.3 A, schwarze Pfeile), aber nicht immer (keine Aufnahme gezeigt). Weitere morphologische Unterschiede im Duodenum der MIN- und Wildtyp-Maus konnten nicht beobachtet werden.

Da beim Menschen Darmtumoren vorwiegend im Kolon und Rektum auftreten, sollten auch im Mausmodell vor allem Polypen des Kolorektums untersucht werden. MIN-Mäuse entwickeln in diesem Bereich bei der Ernährung mit einem Standard-Futtermittel mit 3,3 % Fettgehalt allerdings kaum Polypen. Durch eine fettreiche Ernährung kann die Anzahl an Adenomen aber erhöht werden (Wasan et al., 1997). Daher wurden die MIN-Mäuse mit einem Spezial-Futtermittel mit einem Fettgehalt von 10 % gefüttert.

Die MIN-Mäuse wurden während ihrer Aufzucht regelmäßig gewogen. Im Alter von 13 Wochen hatten die Tiere zwischen 6,8 % und 17,7 % ihres Maximalgewichts verloren (Daten nicht gezeigt). Da diese Gewichtsreduktion einen Hinweis auf Adenome im Darm gibt, wurden die Mäuse getötet, die Därme entnommen und längs eröffnet. Alle MIN-Mäuse hatten Adenome im Dün- und Dickdarm entwickelt. Diese Adenome waren mit bloßem Auge erkennbar und unterschieden sich deutlich vom gesunden Darmgewebe.

Von jeder MIN-Maus wurden zwei präparierte Gewebestücke von Adenomen des Kolons untersucht und mit gesunder Kolonschleimhaut verglichen. Abbildung 5.2 zeigt repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der gesunden und adenomatösen Schleimhaut der drei analysierten MIN-Mäuse. Im Gegensatz zu den Epithelzellen des gesunden Kolongewebes der MIN-Mäuse (Abbildung 5.2 A-C), welche stets eine durchgehende, dichte Glykocalyx (schwarze Pfeile) sowie dicht beieinander stehende Mikrovilli (weiße Pfeile) aufwiesen, konnte auf den Epithelzellen der Adenome (Abbildung 5.2 D-F) keine Glykocalyx nachgewiesen werden. Des Weiteren waren Mikrovilli nur noch rudimentär (Abbildung 5.2 D und F, rote Pfeile) oder nicht mehr (Abbildung 5.2 E) vorhanden.

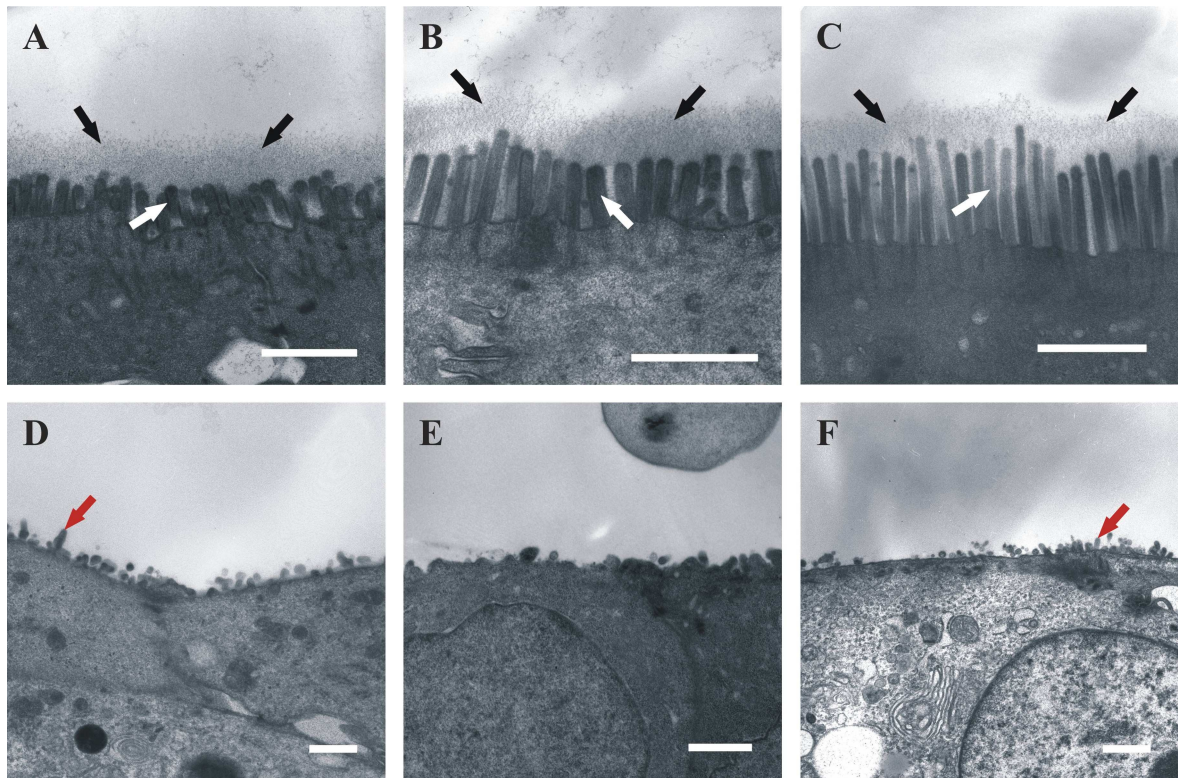


Abbildung 5.2: Elektronenmikroskopische Analyse der Glykocalyx gesunder und adenomatöser Kolonschleimhaut von drei MIN-Mäusen. Gezeigt ist gesundes (A-C) und adenomatöses (D-F) Gewebe der MIN-Mäuse. Weiße Pfeile: Mikrovilli, schwarze Pfeile: Glykocalyx, rote Pfeile: rudimentäre Mikrovilli. Balken: 1 µm.

Ein morphologischer Unterschied zwischen gesunder und tumoröser Schleimhaut konnte auch im Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) der MIN-Mäuse beobachtet werden (Abbildung 5.3). Wie im Kolon konnte auch hier gezeigt werden, dass auf den Epithelzellen der Adenome (Abbildung 5.3 D-F) die Glykocalyx vollständig fehlte. Während bei den entarteten Zellen des Kolons (siehe Abbildung 5.2 D-F) jedoch z.T. noch rudimentäre Mikrovilli (rote Pfeile) zu erkennen waren, fehlten diese im Dünndarm stets vollständig.

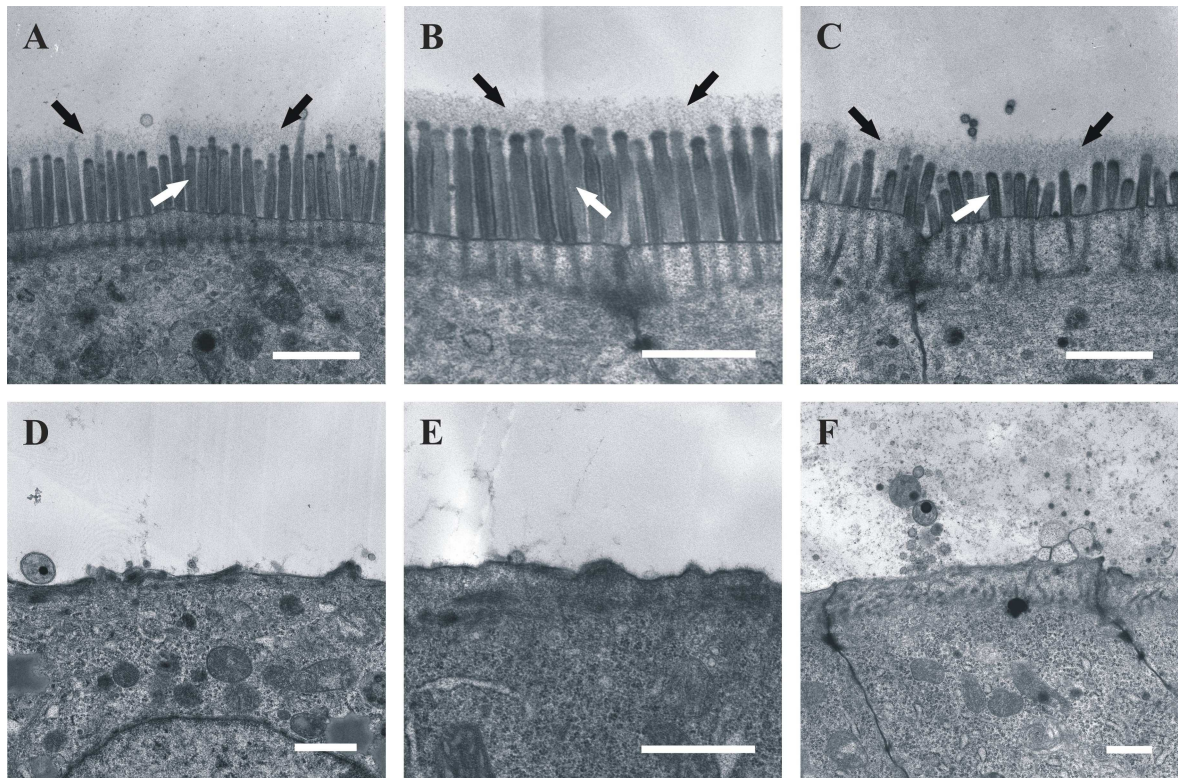


Abbildung 5.3: Elektronenmikroskopische Analyse der Glykocalyx gesunder und adenomatöser Schleimhaut der verschiedenen Dünndarmabschnitte von MIN-Mäusen. Die Aufnahmen A-C zeigen gesunde Epithelzellen des Duodenums (A), Jejunums (B) und Ileums (C). Auf den Aufnahmen D-F sind Epithelzellen von Adenomen des Duodenums (D), Jejunums (E) und Ileums (F) gezeigt. Weiße Pfeile: Mikrovilli, schwarze Pfeile: Glykocalyx. Balken: 1 µm.

Zusammengenommen bedeutet dies, dass zumindest im murinen MIN-Mausmodell bereits Adenome, aus denen sich bösartige Geschwulste entwickeln können, keine Glykocalyx mehr besitzen und sie sich damit deutlich von gesundem Gewebe mit ausgeprägter Glykocalyx unterscheiden lassen.

5.1.2 Analyse der Glykocalyx des humanen Darmepithels

Da die *in vitro* Beobachtungen durch die Studien im Mausmodellsystem bestätigt werden konnten, wurde nun in Hinblick auf die diagnostische Relevanz überprüft, ob sich die *in vivo* Situation der MIN-Maus auch auf die gesunde und entartete Schleimhaut des Menschen übertragen lässt. Hierzu wurde Darmgewebe von zehn Patienten mit Darmkrebs (sieben Frauen und drei Männer) und von drei Frauen mit Divertikulitis analysiert. Die Patienten waren zwischen 54 und 86 Jahre alt. Ihre klinischen Daten sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Klinische Daten und präpariertes Darmgewebe der Patienten.

Patient Nr. / Alter / Geschlecht	Diagnose	Lage	präpariertes Darmgewebe				
			Kolon				Ileum
			gesund	AdCa	Polyp	CIS	gesund
1 / 84 / m	AdCa	CA	X	X			X
2 / 86 / w	AdCa	CA	X	X			X
3 / 74 / w	AdCa	Caecum	X	X	X		X
4 / 64 / w	Divertikulitis	unbekannt	X				
5 / 76 / w	AdCa	CS	X	X			
6 / 76 / w	Divertikulitis	CS	X				
7 / 72 / m	AdCa	CA	X	X	X		X
8 / 78 / w	AdCa	CA		X			X
9 / 79 / w	AdCa	Caecum	X	X	X	X	X
10 / 54 / w	Divertikulitis	CS	X				
11 / 75 / w	AdCa	LF	X	X			
12 / 71 / w	AdCa	CA	X	X	X		
13 / 78 / m	AdCa	CS	X	X	X		

Angegeben sind das Alter, das Geschlecht, die Diagnose und die Lage der Adenokarzinome bzw. der Divertikulitis. Zusätzlich ist das präparierte Darmgewebe jedes Patienten aufgelistet. Von Patient 12 wurden Gewebe von vier Polypen präpariert. Abkürzungen: m männlich; w weiblich; AdCa Adenokarzinom; CA *Colon ascendens*; CS *Colon sigmoideum*; LF linke Flexur; CIS *Carcinoma in situ*.

Das Darmgewebe wurde den Patienten in der Asklepios Klinik Bad Oldesloe aufgrund ihrer Erkrankung operativ entfernt und anhand einer zunächst optischen und später auch histologischen Begutachtung durch einen Pathologen in die folgenden vier Kategorien eingeteilt: gesunde Schleimhaut (Kolon bzw. Ileum), Adenokarzinom, Polyp und *Carcinoma in situ*. Von jedem Darmresektat wurden Gewebestücke aller verfügbaren Kategorien für die elektronenmikroskopische Auswertung präpariert. In Tabelle 5.1 ist angegeben, welche Darmgewebe bei den jeweiligen Patienten verwendet wurden. Von den präparierten Geweben wurden jeweils zwei Gewebestücke analysiert.

Im Falle von Adenokarzinomen wurden die Gewebestücke der entarteten Schleimhaut vom Pathologen aus dem Randbereich mit Übergang zum gesunden Darmgewebe entnommen, da das Gewebe im Zentrum von Tumoren nekrotisch und daher für eine Analyse der Epithelzellschicht nicht geeignet ist. Bei den Polypen und dem *Carcinoma in situ* wurden aufgrund deren geringer Größe (0,4-2 cm Durchmesser) auch Bereiche gesunden Gewebes mit entnommen. Von der präparierten Darmschleimhaut jedes Patienten wurden zwei

Gewebeblöcke untersucht. Der Übergang zwischen entartetem und gesundem Gewebe war allerdings bei der Präparation der entnommenen Gewebestücke nicht immer eindeutig zu erkennen, so dass von den präparierten Gewebestücken Semidünnschnitte angefertigt werden mussten, die von einem Pathologen lichtmikroskopisch erneut begutachtet und klassifiziert wurden.

5.1.2.1 Lichtmikroskopische Diskriminierung von neoplastischem und gesundem humanem Darmepithel

Wie die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte, war die gesunde, humane Kolonschleimhaut (Abbildung 5.4 A und D) durch eine gleichmäßig hohe, einschichtige Epithelschicht (schwarze Pfeile) gekennzeichnet. Die Enterozyten besaßen ovale Zellkerne auf ihrer basalen Seite (in der Abbildung nicht erkennbar). Außerdem waren in der Epithelschicht viele Becherzellen (rote Pfeile) lokalisiert.

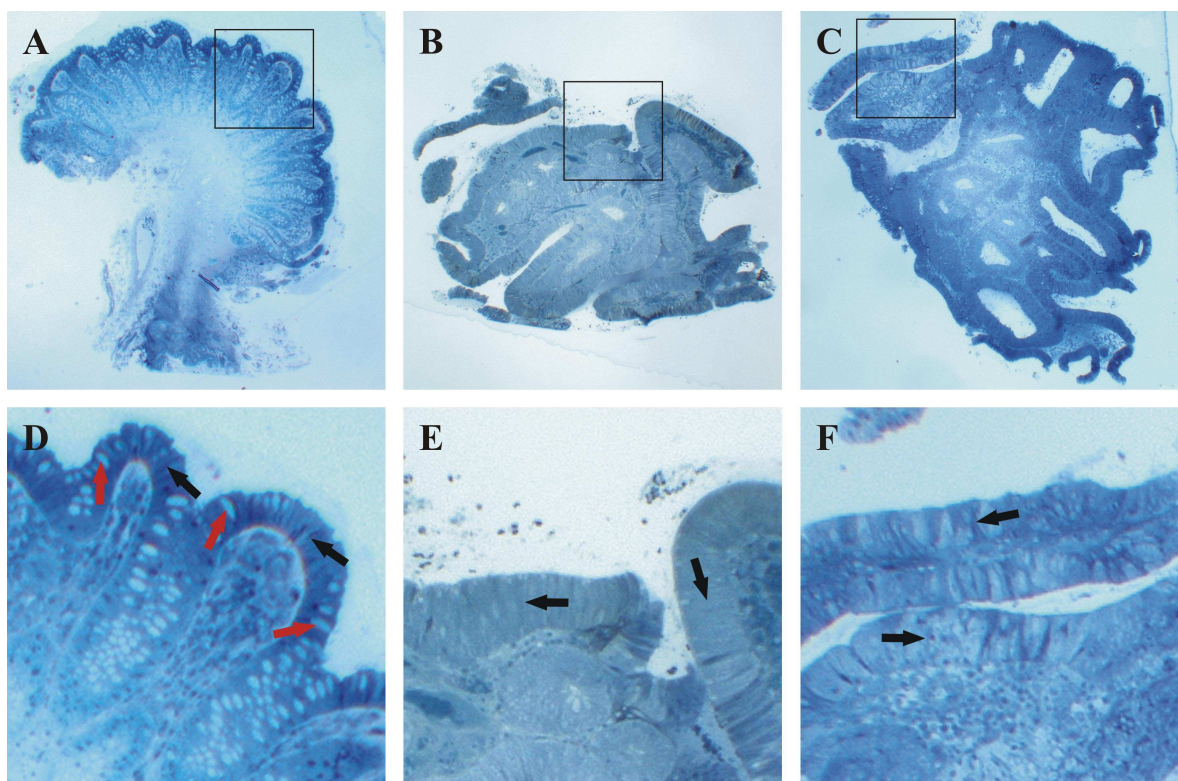


Abbildung 5.4: Semidünnschnitte gesunder und entarteter humaner Kolonschleimhaut. Die Aufnahmen A-C zeigen Semidünnschnitte eines gesunden Kolongewebes (A), eines Polypen (B) und eines Adenokarzinoms (C). Die in D-F dargestellten Abbildungen wurden aus den Aufnahmen A-C heraus vergrößert (markierte Bereiche). Schwarze Pfeile: einschichtige Epithelschicht, rote Pfeile: Becherzellen.

Auch die Darmschleimhaut von Polypen (Abbildung 5.4 B und E) besaß ein gleichmäßig hohes, einschichtiges Epithel (schwarze Pfeile) mit ovalen Zellkernen auf der basalen Seite. Die Epithelzellen waren im Vergleich zu denen der gesunden Schleimhaut (vergleiche Abbildung 5.4 D und E) allerdings länger. Außerdem waren in der Epithelschicht von Polypen kaum bzw. keine Becherzellen vorhanden. In der Schleimhaut der analysierten Adenokarzinome (Abbildung 5.4 C und F) fehlten die Becherzellen vollständig, und es war nur eine ungleichmäßige, einschichtige Epithelschicht (F, schwarze Pfeile) ausgebildet. Die Enterozyten besaßen auffallend große Zellkerne (in der Abbildung nicht erkennbar). Oftmals war trotz der Verwendung von Gewebe aus dem Randbereich der Tumoren auch nekrotisches Gewebe erkennbar (nicht gezeigt).

Somit konnten bereits durch die lichtmikroskopische Analyse von Semidünnschnitten deutliche Unterschiede zwischen den analysierten Gewebeabschnitten beobachtet und das Gewebe der gesunden Kolonschleimhaut, der Polypen und der Adenokarzinome sicher identifiziert werden.

5.1.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Glykocalyx von neoplastischem und gesundem humanem Darmepithel

Nach der lichtmikroskopischen Validierung der Gewebebereiche wurden die Gewebestücke im TEM analysiert. Zunächst wurde das gesunde Kolongewebe ausgewertet (Abbildung 5.5). Die Epithelzellen besaßen dicht beieinander stehende Mikrovilli (weiße Pfeile), die meist, aber nicht bei allen Proben, von einer ausgeprägten Glykocalyx (schwarze Pfeile) bedeckt waren. Die Aufnahmen G und K zeigen exemplarisch Epithelzellen, auf denen die Glykocalyx fehlt.

Da bei der operativen Entfernung von Darmtumoren im vorderen Teil des Dickdarms (Caecum und *Colon ascendens*) auch immer ein Teil des Ileums mit entfernt wurde, konnte von diesen Darmresektaten auch gesundes Dünndarmgewebe entnommen und analysiert werden (Abbildung 5.6). Die Mikrovilli (weiße Pfeile) der gezeigten Epithelzellen waren durchgängig von einer dichten Glykocalyx bedeckt. Doch auch im Ileum fehlte bei einigen Proben die Glykocalyx teilweise (nicht gezeigt). Für Patient 1 (A) wurde zusätzlich zu den von einer Glykocalyx bedeckten Enterozyten auch eine Mukus-produzierende Becherzelle (roter Pfeil) erfasst.

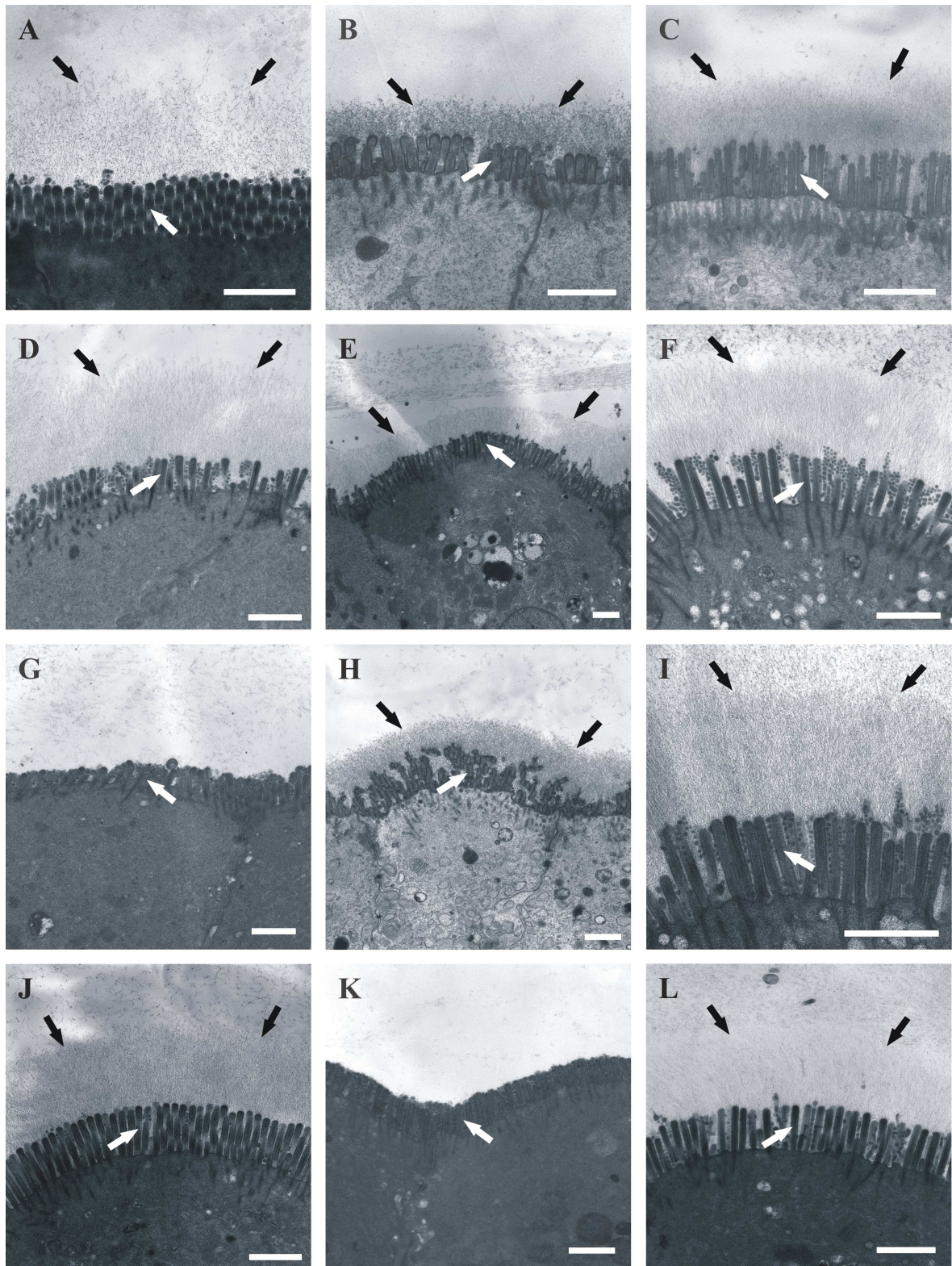


Abbildung 5.5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen gesunder humaner Kolonschleimhaut. Dargestellt sind Epithelzellen des Kolons der Patienten 1-7 (A-G) und 9-13 (H-L). Weiße Pfeile: Mikrovilli, schwarze Pfeile: Glykocalyx. Balken: 1 µm.

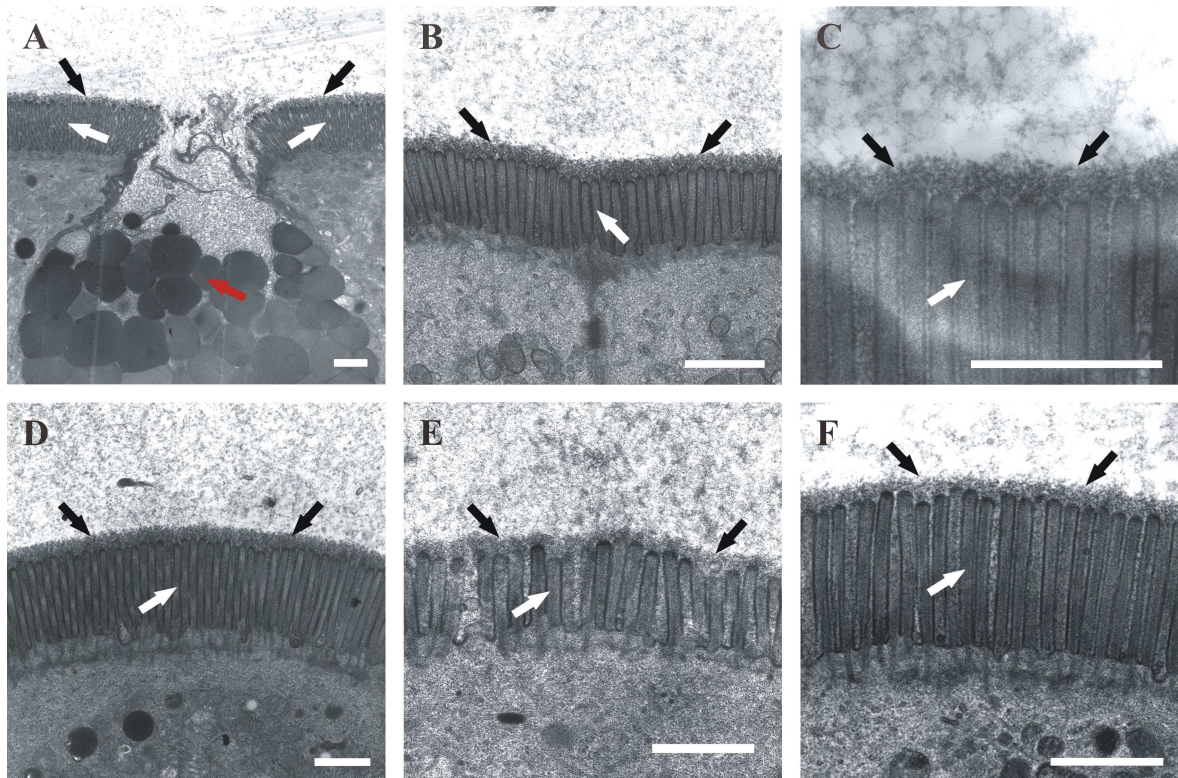


Abbildung 5.6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen gesunder humaner Schleimhaut des Ileums. Gezeigt sind Epithelzellen der Patienten 1 (A), 2 (B), 3 (C), 7 (D), 8 (E) und 9 (F). Weiße Pfeile: Mikrovilli, schwarze Pfeile: Glykocalyx, roter Pfeil: Becherzelle. Balken: 1 µm.

Beim Vergleich der Epithelzellen des Kolons (Abbildung 5.5) mit denen des Ileums (Abbildung 5.6) fällt auf, dass die Höhe der Glykocalyx in den beiden Darmabschnitten unterschiedlich ist.

Im Vergleich zur gesunden Darmschleimhaut (Abbildung 5.5 und 5.6) wies die Schleimhaut der Adenokarzinome (Abbildung 5.7), der Polypen (Abbildung 5.8 A-H) und des *Carcinoma in situ* (Abbildung 5.8 I) deutliche morphologische Unterschiede auf. Die Morphologie der Epithelzellschicht dieser drei entarteten Gewebetypen war miteinander vergleichbar. So waren die Mikrovilli der Epithelzellen bei allen entarteten Geweben nur noch rudimentär vorhanden (rote Pfeile in Abbildung 5.7 und 5.8) oder fehlten. Die Glykocalyx fehlte bei dem *Carcinoma in situ*, bei sieben von zehn Adenokarzinomen und bei vier von acht Polypen vollständig. Doch auf Teilen der Epithelzellschicht von drei Adenokarzinomen und vier Polypen war eine Glykocalyx vorhanden. Dies ist exemplarisch für ein Adenokarzinom (Abbildung 5.7 G) und einen Polypen (Abbildung 5.8 C) gezeigt, wobei die Glykocalyx durch schwarze Pfeile markiert wurde.

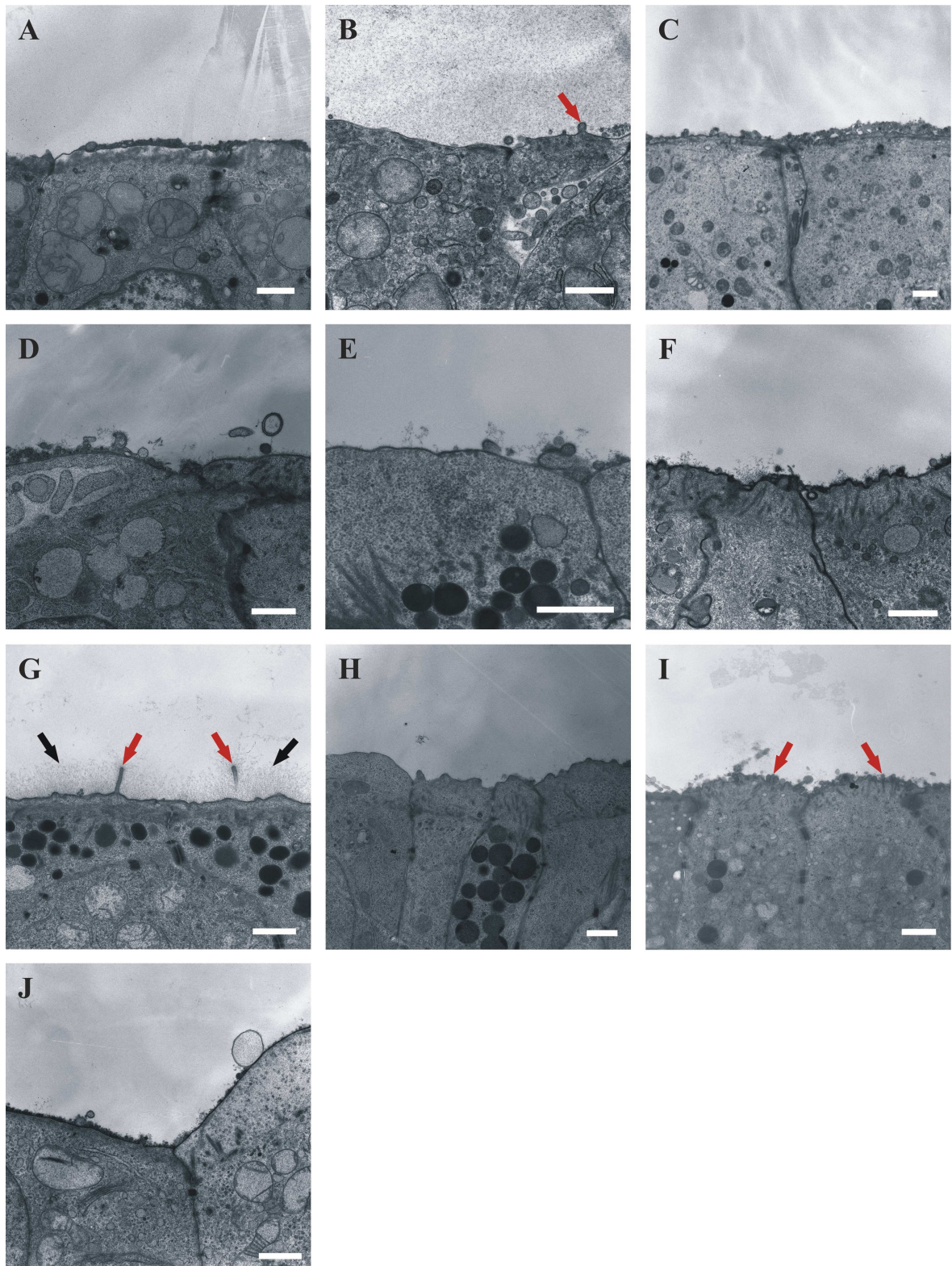


Abbildung 5.7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Adenokarzinomen der humanen Kolonschleimhaut. Gezeigt sind Epithelzellen der Adenokarzinome der Patienten 1 (A), 2 (B), 3 (C), 5 (D), 7 (E), 8 (F), 9 (G), 11 (H), 12 (I) und 13 (J). Schwarze Pfeile: Glykocalyx, rote Pfeile: rudimentäre Mikrovilli. Balken: 1 μ m.

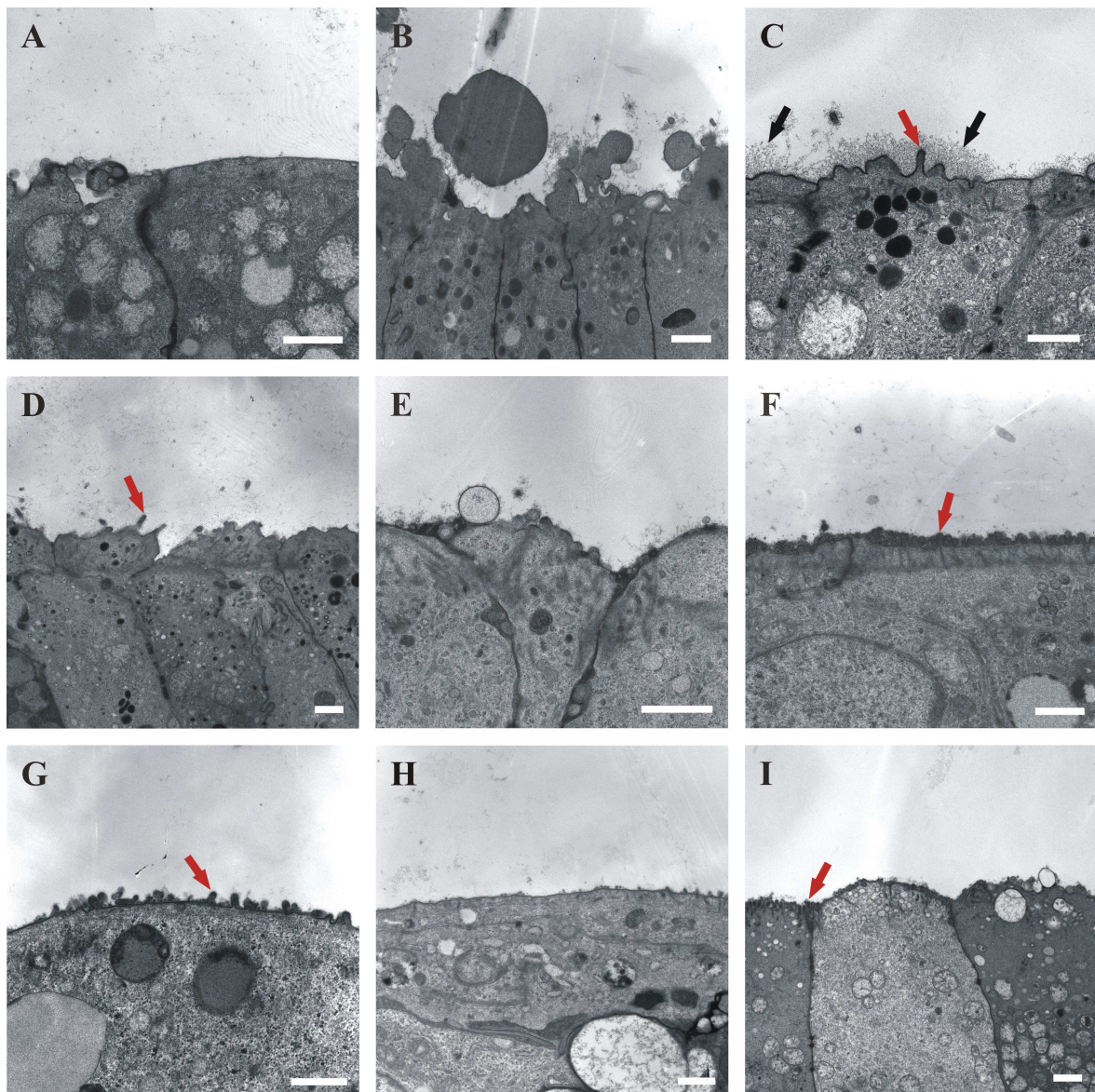


Abbildung 5.8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Polypen und des *Carcinoma in situ* der humanen Kolonschleimhaut. Die Aufnahmen A-H zeigen Epithelzellen der Polypen der Patienten 3 (A), 7 (B), 9 (C), 12 (D-G, Aufnahmen von vier Polypen) und 13 (H). Auf der Aufnahme I sind Epithelzellen des *Carcinoma in situ* von Patient 7 zu sehen. Schwarze Pfeile: Glykocalyx, rote Pfeile: rudimentäre Mikrovilli. Balken: 1 µm.

Die im Mausmodell fehlende Glykocalyx auf entartetem Darmgewebe konnte somit für entartetes, humanes Gewebe bestätigt werden. Auch hier konnte das entartete Gewebe deutlich von gesundem Gewebe unterschieden werden. Ob die An- oder Abwesenheit der Glykocalyx als alleiniges Unterscheidungskriterium ausreicht, sollte eine statistische Analyse der histologischen Daten zeigen.

5.1.2.3 Statistischer Vergleich der Glykocalyx von neoplastischem und gesundem humanem Darmepithel

Für eine statistische Analyse der Glykocalyxaberration muss zunächst festgelegt werden, durch welches Kriterium eine gesunde Glykocalyx definiert werden soll. Mögliche Unterscheidungsmerkmale sind eine bestimmte Glykocalyx-Höhe, ein bestimmter Bedeckungsgrad oder beides. Da in dem anvisierten Nachweisszenario (siehe Kapitel 2.3) Höhenunterschiede nicht erfasst werden können, wurde der Bedeckungsgrad als Variable gewählt und die Intaktheit einer Glykocalyx anhand ihrer Höhe definiert. Um dabei ein bestimmtes Höhenmaß nicht willkürlich festlegen zu müssen, wurde diese auf insgesamt 56 Aufnahmen des Kolons und 29 Aufnahmen des Ileums vermessen, wobei pro Aufnahme fünf Messwerte erhoben wurden (aufgeführt im Anhang). Diese Messwerte wurden mittels D'Agostino-Pearson Omnibus-Test (D'Agostino, 1986) auf Normalverteilung geprüft (Abbildung 5.9).

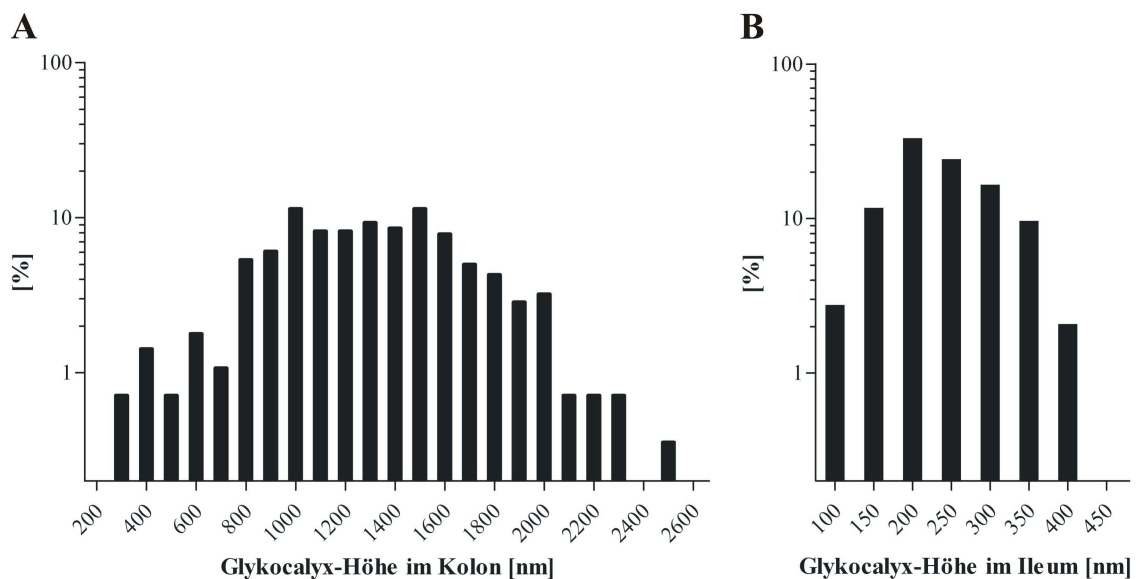


Abbildung 5.9: Verteilung der gemessenen Glykocalyx-Höhen der humanen gesunden Schleimhaut des Kolons und des Ileums. Die Abbildung zeigt eine Normalverteilung der Glykocalyx-Höhe im Kolon (A) und im Ileum (B) (D'Agostino-Pearson Omnibus-Test; Kolon: $p > 0,875$; Ileum: $p > 0,160$). Angegeben ist jeweils der prozentuelle Anteil der Messwerte (Kolon: $n = 280$; Ileum: $n = 145$) für 100 nm Intervalle (Kolon) bzw. 50 nm Intervalle (Ileum).

Sowohl für die ermittelten Glykocalyx-Höhen des Kolons als auch für die des Ileums ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Normalverteilung (Kolon: $p > 0,875$; Ileum: $p > 0,160$). Im Kolongewebe betrug die Glykocalyx-Höhe zwischen 273 nm und 2503 nm. Als durchschnittliche Höhe wurden 1305 nm ermittelt (Abbildung 5.9 A). Die

Glykocalyx-Höhe im Ileum lag zwischen 108 nm und 420 nm und betrug durchschnittlich 238 nm (Abbildung 5.9 B). Als statistischer Grenzwert zur Unterscheidung von intakter und reduzierter bzw. fehlender Glykocalyx wurde basierend auf der vorliegenden Normalverteilung das 5 % Perzentil verwendet, also der Wert, oberhalb dessen 95 % aller Werte der Normalverteilung lagen. Für das Kolongewebe betrug der Schnittpunkt zum 5 % Perzentil 713,8 nm und für die Schleimhaut des Ileums 132,6 nm. Eine Glykocalyx wurde somit als intakt, d.h. als vorhanden angenommen, wenn sie im Kolon höher als 714 nm und im Ileum höher als 133 nm war. Die Glykocalyx galt als defekt, d.h. als abwesend, wenn sie diese Höhen nicht erreichte.

Auf Basis dieser Annahmen wurde der Glykocalyxbedeckungsgrad von Tumoren und gesundem Gewebe bestimmt. Dazu wurde die Länge der mit intakter Glykocalyx bedeckten, angeschnittenen luminalen Plasmamembran und die Gesamtlänge der angeschnittenen luminalen Plasmamembran vermessen (aufgeführt im Anhang) und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Resultate für die einzelnen Patienten - im folgenden Bedeckungsgrad genannt - sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Über alle Patienten gemittelt waren 76,8 % der angeschnittenen Membranen der gesunden Epithelzellen des Kolons und 94,1 % der Membranen der gesunden Epithelzellen des Ileums von einer intakten Glykocalyx bedeckt. Im Gegensatz dazu wurde im Mittel auf den angeschnittenen Membranen von Epithelzellen der Adenokarzinome nur bei 4,7 % und auf den Zellen der Polypen nur bei 5,5 % eine intakte Glykocalyx nachgewiesen. Beim *Carcinoma in situ* fehlte die Glykocalyx stets. Die Schwankungsbreite der jeweiligen Bedeckungsgrade innerhalb der Patientenkohorte war allerdings beträchtlich. Der Glykocalyxbedeckungsgrad von gesundem Kolongewebe reichte von 11 % bis 100 % und der von gesundem Ileumgewebe von 77 % bis 100 %, während bei Adenokarzinomen Bedeckungsgrade von 0 % bis 45 % und bei Polypen Bedeckungsgrade von 0 % bis 15 % gefunden wurden. Trotz dieser Variationen waren die Unterschiede im Glykocalyxbedeckungsgrad von gesundem Kolon und Adenokarzinomen (paired t-test, $p = 0,0007$) bzw. von gesundem Kolon und Polypen (paired t-test, $p = 0,0327-0,0568$ ¹ für Polypen) signifikant. Allerdings geben signifikante Unterschiede noch keine Aussage über

¹ Bei Patient 12 wurden vier Polypen gefunden. Abhängig vom Polypen, den man in der statistischen Analyse berücksichtigt, ergibt sich ein p-Wert von 0,0327 (bei 0 % Bedeckungsgrad) bis zu 0,0568 (bei 14,9 % Bedeckungsgrad).

die zu erwartende diagnostische Sensitivität und Spezifität. Dies wurde mittels der sogenannten „Receiver Operator Characteristic“-Analyse, kurz ROC-Analyse, bestimmt.

Tabelle 5.2: Bedeckungsgrad der Epithelschicht der Patienten mit intakter Glykocalyx.

Patient Nr.	Bedeckungsgrad (Länge) der Epithelschicht mit intakter Glykocalyx [%]				
	Kolon				Ileum
	gesund	AdCa	Polyp	CIS	gesund
1	75,8	0			76,5
2	75,4	0			99,1
3	65,4	0	0		98,3
4	100				
5	100	4,8			
6	90,6				
7	21,0	0,8	0		100
8		0			78,1
9	67,6	45,8	18,1	0	100
10	96,1				
11	84,2	0			
12	10,9	0	0 / 8,8 / 0 / 14,9		
13	100	0	6,3		

Die Länge der Epithelschicht, auf der eine intakte Glykocalyx vorhanden war, wurde bestimmt und als prozentualer Anteil der insgesamt vermessenen Epithelschicht angegeben. Von Patient 12 wurden vier Polypen analysiert, die Werte sind für jeden Polypen einzeln angegeben. AdCa Adenokarzinom; CIS *Carcinoma in situ*.

In der ROC-Analyse werden die Wertepaare von Spezifität (Anteil der richtig negativ erkannten Patienten an allen Nicht-Kranken) und Sensitivität (Anteil der richtig positiv erkannten Patienten an allen Kranken) eines diagnostischen Tests für alle möglichen Grenzwertpunkte innerhalb des Messbereiches aufgetragen. Abbildung 5.10 zeigt die für die intakte Glykocalyx der Adenokarzinome und der gesunden Kolonschleimhaut bzw. der Polypen und der gesunden Kolonschleimhaut erstellten ROC-Kurven. Ein Maß für die Güte ist die „area under curve“ (AUC). Die Fläche kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte anzeigt. Für Adenokarzinome wurde eine AUC von 0,908 errechnet, die AUC für Polypen betrug 0,909. Eine AUC von über 0,9 bedeutet, dass anhand des Glykocalyxbedeckungsgrades mit hoher Genauigkeit zwischen Adenokarzinomen bzw. Polypen und gesundem Gewebe unterschieden werden kann. Für

das *Carcinoma in situ* konnte aufgrund der wenigen vorhandenen Daten keine ROC-Analyse durchgeführt werden.

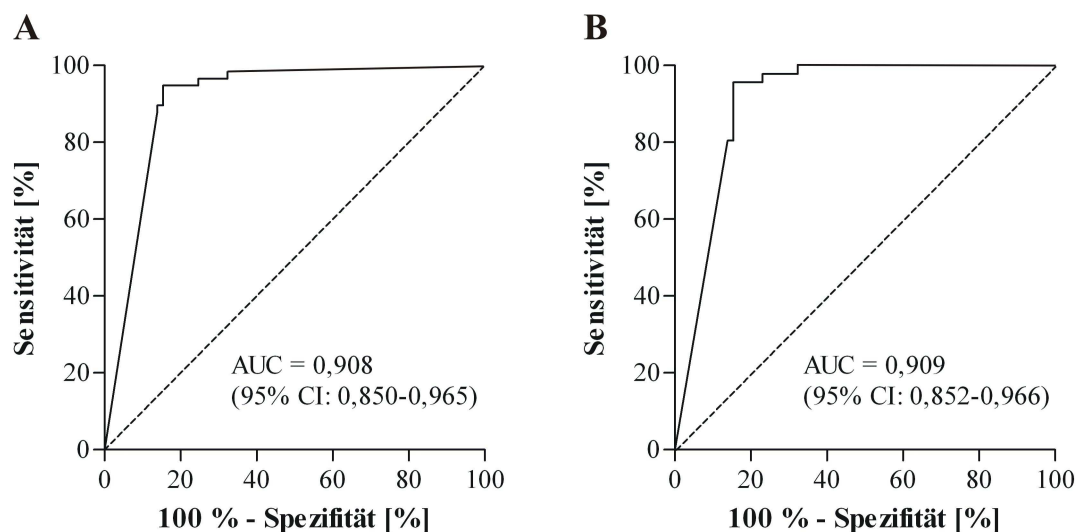


Abbildung 5.10: ROC-Analyse der Glykocalyx als Biomarker für Darmkrebs. Die ROC-Kurven wurden mit Hilfe der prozentualen Länge der Epithelschicht der Adenokarzinome und der gesunden Kolonschleimhaut (A) bzw. der Polypen und der gesunden Kolonschleimhaut (B), auf der eine intakte Glykocalyx vorhanden war, konstruiert. Hieraus wurden die AUCs und das jeweilige 95 % Konfidenzintervall ermittelt.

Über die ROC-Kurven wurde die Gesamtsensitivität und -spezifität der intakten Glykocalyx als Biomarker zur Unterscheidung von gesundem Gewebe und Adenokarzinomen bzw. Polypen am optimalen Grenzwert (Adenokarzinome < 24,00 % und Polypen < 30,58 % intakte Glykocalyx) bestimmt (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Sensitivität und Spezifität der Glykocalyx als Biomarker für Darmkrebs.

	Sensitivität		Spezifität	
	MW	95 % CI	MW	95 % CI
Adenokarzinome	94,8 %	85,6-98,9 %	84,6 %	73,5-92,4 %
Polypen	95,7 %	85,2-99,5 %	84,6 %	73,5-92,4 %

Die Sensitivität und Spezifität wurden am optimalen Grenzwert der ROC-Kurven bestimmt. MW Mittelwert; CI Konfidenzintervall.

Adenokarzinome bzw. Polypen und gesundes Gewebe konnten mit hoher Sensitivität und Spezifität unterschieden werden. Die fehlende Glykocalyx auf Darmneoplasien scheint daher ein vielversprechender Biomarker zur Früherkennung kolorektaler Karzinome zu sein.

5.2 Untersuchungen zur Etablierung eines Testsystems für Kontrastmittel-Mucin-Interaktionen

Der diagnostische Nachweis einer fehlenden Glykocalyx an Darmneoplasien erfordert den Einsatz von Kontrastmitteln, die nach luminaler Applikation selektiv an Glykocalyx-freie Areale im Darm binden. Um dies zu gewährleisten, muss das Kontrastmittel ungehinderten Zugang zur apikalen Tumorzelloberfläche haben und darf nicht von luminalen Substanzen wie z.B. Mukus absorbiert werden. Die mögliche Interaktion von Mucinen mit potentiellen Kontrastmitteln und ihren Bestandteilen ist daher bei der Entwicklung von neuen Bildgebungsmodalitäten für mukosale Neoplasien von großem Interesse. Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen hatten zum Ziel, den Aufbau eines Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstests und dafür benötigte Reagenzien herauszuarbeiten.

Die zeitgemäße Lösung für einen biochemischen Interaktionstest ist das Festphasenformat, insbesondere der Mikrotiterplattentest. Die Leistungsfähigkeit eines solchen Tests hängt maßgeblich davon ab, ob es gelingt, die beiden Bindungspartner möglichst effizient und spezifisch bei gleichzeitig geringem Hintergrund miteinander reagieren zu lassen.

5.2.1 Anvisierter Aufbau des Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstests

Um die Spezifität eines Mikrotiterplattentests zu gewährleisten, muss man entweder die Reaktanden in gereinigter Form vorliegen haben oder man reinigt „*in situ*“, indem man einen Reaktanden mit Hilfe einer Substanz, die spezifisch an diesen bindet, auf der Mikrotiterplatte „einfängt“, und dann Kontaminationen durch Waschen entfernt.

Bei der Analyse einer Kontrastmittel-Mucin-Interaktion werden verschiedene Kontrastmittelkandidaten und ihre Bestandteile auf ihre Bindung an humanes Mucin, welche aufgrund der starken Glykosylierung von Mucinen vor allem an die Kohlenhydratstrukturen erfolgt, getestet. Leider ist humanes Mucin in seiner Zusammensetzung und Glykosylierung sehr heterogen und die Reinigung schwierig (Olivier, 2003). Daher erschien es sinnvoller, statt viele Mucinproben von verschiedenen Individuen aufwändig zu reinigen, ein „Capture“-Format anzustreben, bei dem das Mucin von einem Mucin-spezifischen monoklonalen Antikörper eingefangen und dem Mucin

dann eine lösliche oder suspendierte Kontrastmittelkomponente angeboten wird. Durch eine geeignete Markierung an dieser Komponente – beispielsweise durch ein Fluorophor oder Biotin – kann die Interaktion visualisiert werden. Der anvisierte Aufbau des Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstests ist in Abbildung 5.11 schematisch dargestellt.

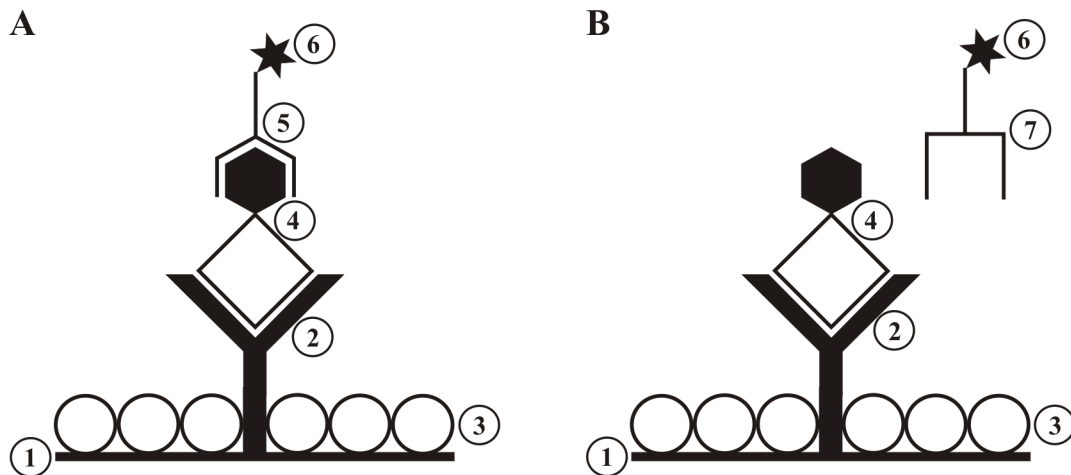


Abbildung 5.11: Modell des Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstests. Die Mikrotiterplatte (1) wird mit einem Mucin-spezifischen, monoklonalen Antikörper (2) beschichtet. Nach der Blockierung freier Proteinbindestellen der Platte durch ein Absättigungsreagenz (3) fängt der Antikörper (2) das Mucin (4) aus einer Mukusprobe ein. Nicht gebundene Mucine und andere Bestandteile des Mukus werden durch Waschen entfernt. Danach wird die Platte mit den zu testenden Kontrastmittelkomponenten inkubiert, wobei Komponenten, die Kohlenhydratstrukturen des eingefangenen Mucins erkennen (5), an diese binden und durch ihre Markierung (6) nachgewiesen werden (A). Komponenten, die diese Kohlenhydratstrukturen nicht erkennen (7), binden nicht an das Mucin (B). In diesem Fall werden die Komponenten durch Waschen entfernt, so dass keine Signale entstehen.

Zu seiner Realisierung werden Mucin-spezifische Antikörper sowie ein geeignetes Absättigungsreagenz benötigt, so dass bei der Untersuchung der möglichen Interaktion der Kontrastmittelkomponenten mit Mucinen keine unspezifischen Hintergrundsignale auftreten.

5.2.2 Identifizierung eines Absättigungsreagenzes für die Mucinanalytik in Mikrotiterplatten

Um den Hintergrund im oben beschriebenen Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstest gering zu halten, sollte das Reagenz zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen der Mikrotiterplatte selbst keine Glykane enthalten. Die üblicherweise zur Absättigung von Mikrotiterplatten verwendeten Absättigungsreagenzien wie Magermilchpulver, Rinderserumalbumin (BSA), Casein, Gelatine oder Serum können jedoch

Kohlenhydratkontaminationen enthalten und daher hohe Hintergrundsignale im Mikrotiterplattentest erzeugen. Synthetische oberflächenaktive Substanzen, wie z.B. das Detergenz Tween 20, besitzen diesen Nachteil zwar nicht, tendieren aber zum Austausch mit proteinösen Assaykomponenten, was wiederum zu hohen Hintergrundsignalen führen kann.

Es wurde daher nach neuen, kohlenhydratfreien und zugleich gut auf Mikrotiterplatten haftenden Absättigungsreagenzien gesucht. Dazu wurde ein Austauschassay angewendet, bei dem Mikrotiterplatten zunächst mit den zu testenden Absättigungsreagenzien behandelt wurden, bevor sie Serum in serieller Verdünnung ausgesetzt wurden. In Abwesenheit von Serum liefert der Test das durch Kohlenhydratkontaminationen im Absättigungsreagenz verursachte endogene Hintergrundsignal. Ein Signalanstieg bei steigender Serumkonzentration gibt Auskunft über das Haftungsvermögen und damit das Austauschverhalten eines Absättigungsreagenzkandidaten.

Unter Einsatz dieses Tests konnte ein neues Absättigungsreagenz identifiziert werden, welches den gewünschten Anforderungen gerecht wird (Abbildung 5.11). Aus schutzrechtlichen Gründen kann auf die Zusammensetzung dieses Reagenzes nicht näher eingegangen werden.

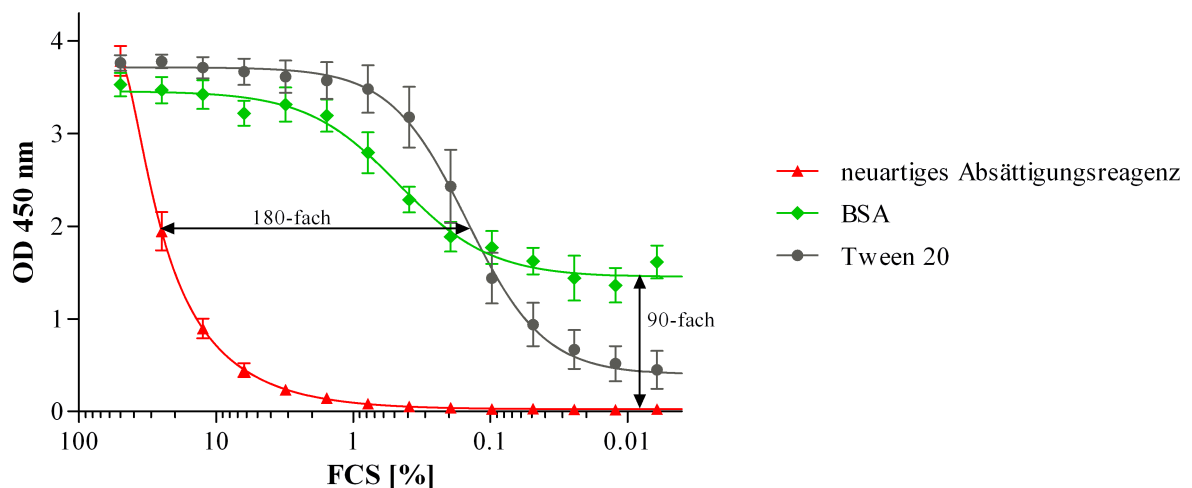


Abbildung 5.12: Austauschverhalten unterschiedlicher Absättigungsreagenzien gegen Serumproteine im ELISA. Mikrotiterplatten wurden mit dem neuartigen Absättigungsreagenz, BSA (1 % in PBS) oder Tween 20 (0,05 % in PBS) abgesättigt und danach mit seriellen Verdünnungen von fötalem Rinderserum (FCS) inkubiert. Unspezifisch an die Platte gebundene Glykoproteine des Serums wurden durch biotinyliertes Concanavalin A und Meerrettichperoxidase-markiertes Streptavidin nachgewiesen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler aus fünf unabhängigen Experimenten.

Das endogene Hintergrundsignal war mit dem neuen Reagenz über 90-fach niedriger als beim Absättigen der Mikrotiterplatten mit BSA, und das Haftungsvermögen des neuen Reagenzes war über 180-fach besser als das von Tween 20, wenn man das geringere Austauschverhalten als Maß für das Haftungsvermögen zugrundelegt.

Um sicherzustellen, dass das gute Absättigungsverhalten nicht zu Lasten der Sensitivität im Mikrotiterplattentest geht, wurde ein Standard-Immunglobulin-Quantifizierungs-ELISA mit dem neuen Absättigungsreagenz durchgeführt (Abbildung 5.13). Im Vergleich zum üblicherweise verwendeten Magermilchpulver wurde in diesem Immunglobulin-Capture-ELISA mit dem neuartigen Absättigungsreagenz eine 5,6-fach höhere Sensitivität (ermittelt am Wendepunkt der Kurven) sowie bis 2,4-fach höhere Signalstärken (Maximalwerte der Kurven) erreicht.

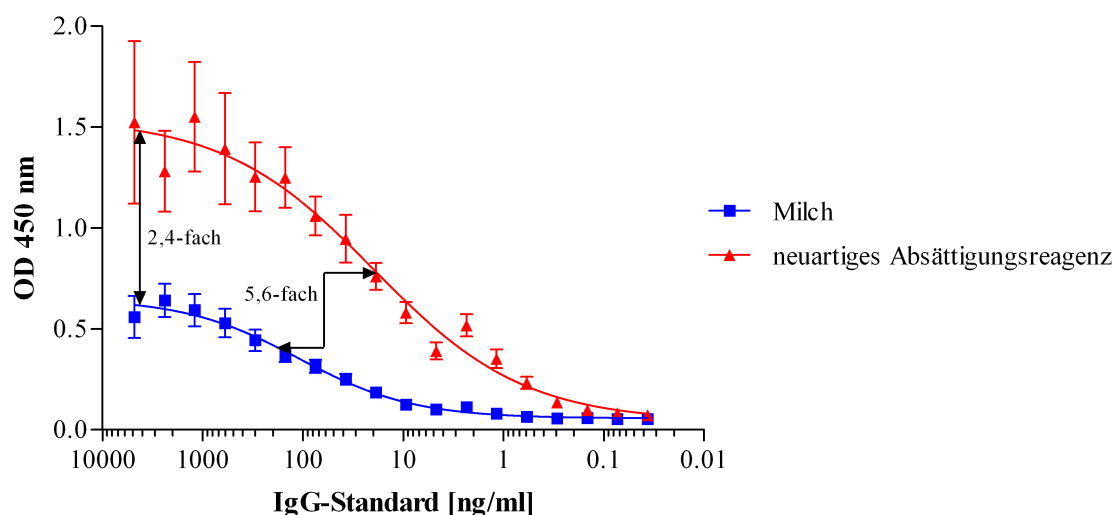


Abbildung 5.13: Einfluss von Absättigungsreagenzien auf die Sensitivität eines Immunglobulin-Capture-ELISA. Mikrotiterplatten wurden mit einem Ziege anti-Maus IgG-Antikörper (7,2 ng/ml) beschichtet und mit dem neuartigen Absättigungsreagenz bzw. Magermilchpulver (5 % in PBS) abgesättigt. Ein Maus-IgG-Antikörper wurde seriell verdünnt und durch einen Ziege anti-Maus IgG-HRP-Antikörper nachgewiesen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler aus sieben unabhängigen Experimenten.

Damit stand ein geeignetes Absättigungsreagenz für den Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstest zur Verfügung.

5.2.3 Untersuchung von monoklonalen Antikörpern für die Mucinanalytik in Mikrotiterplatten

Werden Kontrastmittel für Darmtumoren oral appliziert, kommen sie auf Ihrem Weg zum Kolon mit den sekretierten Mucinen MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6 in Kontakt. Da eine Reihe von Antikörpern gegen MUC5AC kommerziell erhältlich sind, wurde der Schwerpunkt auf dieses Mucin gelegt und zunächst vier kommerziell verfügbare monoklonale Antikörper gegen humanes MUC5AC auf ihre Eignung für den Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstest getestet.

Bei diesem Assay im „Capture“-Format sollten beim Einsatz von überschüssigem Mucin immer die gleichen Mengen MUC5AC auf der Platte immobilisiert werden und so Vergleichsstudien möglich und valide werden. Um dies zu überprüfen, soll in einem zusätzlichen Sandwich-ELISA mit zwei anti-MUC5AC-Antikörpern, einem Fänger- und einem Nachweisantikörper, sowie einem Mucinstandard die eingefangene Mucinmenge quantifiziert werden. Die vier ausgewählten monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper wurden daher auch auf ihre Eignung im Sandwich-ELISA getestet.

5.2.3.1 Charakterisierung der anti-MUC5AC-Antikörper 1-13M1, 9-13M1, 2-11M1 und 45M1

Um zu überprüfen, ob die vier kommerziell erhältlichen Antikörper in der Lage sind, humanes MUC5AC spezifisch zu erkennen, wurde zunächst eine Dot Blot-Analyse mit gereinigten, humanen, nasalen Mucinen durchgeführt. Die Mucine stammten von sechs verschiedenen Probanden und sollten einen hohen MUC5AC-Gehalt haben, da das *MUC5AC*-Gen im Atemwegsepithel stark exprimiert wird. Abbildung 5.14 zeigt das Ergebnis der Dot Blot-Analyse.

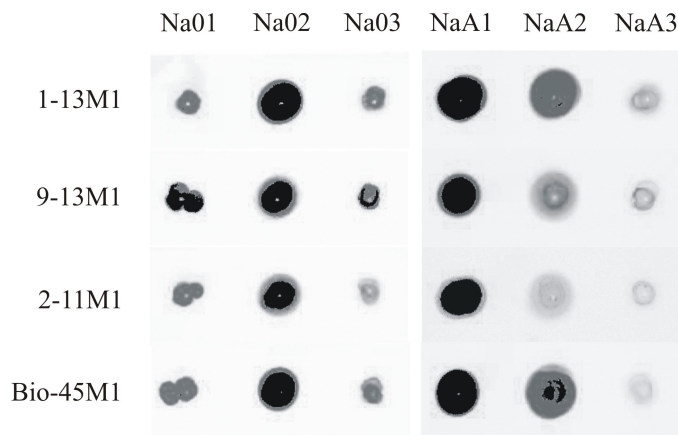


Abbildung 5.14: Bindung kommerziell erhältlicher anti-MUC5AC-Antikörper an humane, nasale Mucine im Dot Blot. Je Dot wurden 3 µg der humanen, nasalen Mucine Na01, Na02, Na03, NaA1, NaA2 und NaA3 auf Nitrocellulosemembran aufgetragen. Daran gebundene anti-MUC5AC-Antikörper (1-13M1, 9-13M1, 2-11M1 und biotinylierter 45M1) wurden mit Alexa Fluor 680-markiertem Ziege anti-Maus IgG bei 700 nm im Odyssey Infrared Imager detektiert.

Die vier Antikörper erkannten alle sechs nasalen Mucine, allerdings mit unterschiedlicher Affinität. Eine starke Bindung sämtlicher Antikörper konnte an die Mucine Na02 und NaA1 nachgewiesen werden. Die Bindung an Na01, Na03 und NaA2 war geringer, die an das Mucin NaA3 nur schwach. Da die Affinität der verschiedenen Antikörper zu den einzelnen Mucinen sehr ähnlich war, wurden alle vier Antikörper auf ihre Eignung als Fänger- und Nachweisantikörper im ELISA untersucht.

Zunächst wurde der unspezifische Hintergrund bestimmt, den die Antikörper 1-13M1, 9-13M1 und 2-11M1 in immobilisierter Form mit dem zur Visualisierung vorgesehenen Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (SA-HRP) im ELISA liefern (Abbildung 5.15). Während die Antikörper 9-13M1 und 2-11M1 sowie der Kontrollantikörper nicht mit SA-HRP interagierten ($OD_{450\text{ nm}}$: etwa 0,07), zeigte der Antikörper 1-13M1 mit SA-HRP einen unerwartet hohen unspezifischen Hintergrund ($OD_{450\text{ nm}}$: 0,231), was auf eine Reaktion von 1-13M1 mit Meerrettichperoxidase oder Streptavidin schließen lässt. Daher wurde dieser Antikörper aus allen weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Der Antikörper 45M1 wurde in diesem Aufbau nicht untersucht, da er nur in biotinylierter Form (Bio-45M1) verfügbar war.

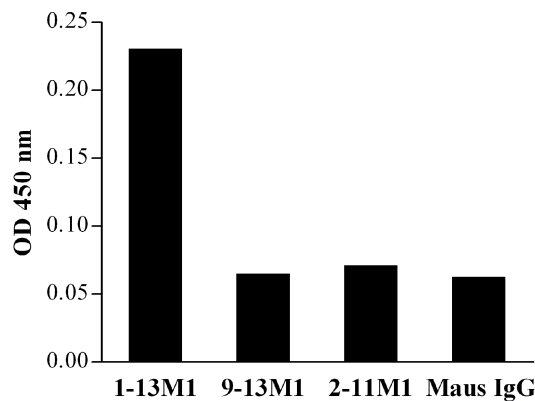


Abbildung 5.15: Bestimmung der unspezifischen Interaktion der kommerziell erhältlichen anti-MUC5AC-Antikörper mit SA-HRP. Eine Mikrotiterplatte wurde mit 1 µg/ml der anti-MUC5AC-Antikörper 1-13M1, 9-13M1 und 2-11M1 bzw. mit Maus IgG beschichtet. Nach dem Absättigen freier Bindestellen mit dem neuartigen Absättigungsreagenz wurde SA-HRP aufgebracht und die Platte nach der Farbentwicklung im ELISA-Reader ausgewertet.

Als nächstes wurden auch die Nachweisantikörper in die Bestimmung des Assay-Hintergrundes eingebunden. Dazu wurden die Antikörper 9-13M1 und 1-11M1 durch Umsetzung mit NHS-PEG₄-Biotin biotinyliert und die drei biotinylierten Antikörper auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht, die zuvor mit nicht-biotinyliertem Antikörper 9-13M1 oder 2-11M1 beschichtet und abgesättigt worden war. Das Ausmaß der unspezifischen Bindung der biotinylierten Nachweisantikörper mit der festen Phase wurde durch Zugabe von SA-HRP und anschließender Farbreaktion sichtbar gemacht (Abbildung 5.16).

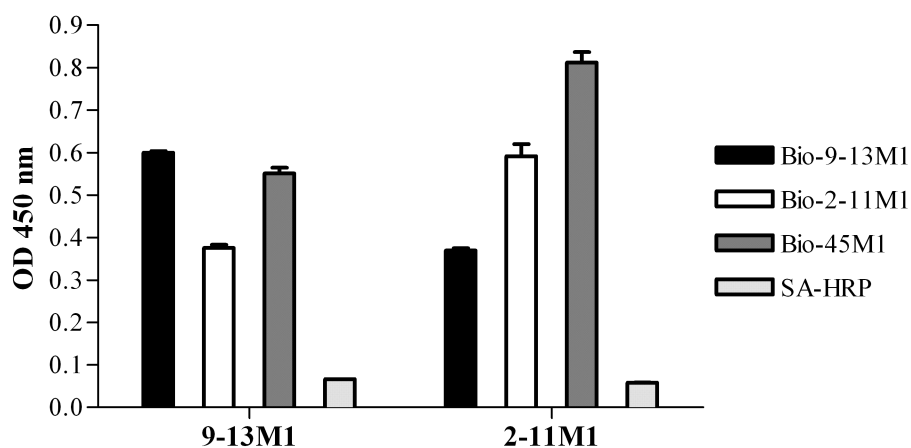


Abbildung 5.16: Hintergrund eines MUC5AC-Sandwich-ELISA bei Verwendung der kommerziell erhältlichen anti-MUC5AC-Antikörper 9-13M1, 2-11M1 und 45M1. Die Platten wurden mit 150 ng/ml der unmarkierten anti-MUC5AC-Antikörper 9-13M1 bzw. 2-11M1 beschichtet und nach Absättigung freier Bindestellen mit den biotinylierten anti-MUC5AC-Antikörpern 9-13M1, 2-11M1 und 45M1 inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch SA-HRP erfasst und durch nachfolgende Farbentwicklung nachgewiesen. Zum Vergleich wurde auch der Hintergrund ohne biotinylierte Antikörper (nur Beschichtung und SA-HRP) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler von 6 Messwerten.

Während der Hintergrund mit SA-HRP bei einem niedrigen Wert von 0,06-0,07 ($OD_{450\text{ nm}}$) lag und dem in Abbildung 5.15 gezeigten entsprach, lag der Hintergrund aller Antikörperkombinationen zwischen einer $OD_{450\text{ nm}}$ von 0,37 und 0,81. Die unmarkierten Fängerantikörper und die biotinylierten Nachweisantikörper interagierten somit in allen Antikörperkombinationen miteinander und erzeugten einen deutlich zu hohen unspezifischen Hintergrund, um für den Einsatz im Sandwich-ELISA geeignet zu sein.

Dies bedeutete, dass die vier analysierten, kommerziell erhältlichen anti-MUC5AC-Antikörper für den Einsatz im geplanten Testsystem ungeeignet waren.

5.2.3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen humanes MUC5AC

Da die gegenseitige Erkennung der kommerziell erhältlichen anti-MUC5AC-Antikörper von Kohlenhydratstrukturen verursacht worden sein könnte, die sowohl auf Immunglobulinen als auch auf MUC5AC vorkommen, wurden monoklonale Antikörper generiert, die das Mucin ausschließlich an dessen Proteinrückgrat erkennen sollen.

5.2.3.2.1 Peptidantigene zur Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes MUC5AC

Um eine ausschließliche Erkennung des Proteinrückgrates des MUC5AC zu gewährleisten, erfolgte die Immunisierung nicht gegen gereinigtes MUC5AC Protein, sondern gegen vier verschiedene aus MUC5AC abgeleitete synthetische Peptide.

Die zur Immunisierung eingesetzten Peptide (Tabelle 5.4) wurden durch computergestützte Analysen bekannter Aminosäuresequenzabschnitte des humanen MUC5AC Proteins ermittelt, da die vollständige Primärsequenz des Proteins zum Zeitpunkt der Auswahl der Peptide und der Immunisierung der Versuchstiere noch nicht bekannt war. Dabei wurde darauf geachtet, dass die gewählten Motive weder potentielle Glykosylierungsstellen, die durch das Programm NetOGlyc 3.1 vorhergesagt wurden, noch hydrophobe Sequenzabschnitte, ermittelt nach der Methode von Kyte & Doolittle (1982), enthielten, da diese Bereiche im nativen Mucin für Antikörper nicht oder nur schwer zugänglich sein können.

Tabelle 5.4: Zur Immunisierung eingesetzte Peptidantigene aus humanem MUC5AC.

Peptid	Sequenz	Swiss-Prot Accession No.	Position (aa-aa)	Hydrophilie
1	H ₂ N-LYPAGSTIYRHRDLAGH-COOH	CAA04738	217-233	-0,571
2	H ₂ N-PHGGDKETYNNIIRSGEK-COOH	CAC83674	1762-1779	-1,647
3	H ₂ N-RAEDAPGVPLRALGQRVQ-COOH	CAC83674	1430-1447	-0,388
4	H ₂ N-VTNTSKSPAHLFYPGE-COOH	CAA04738	880-895	-0,741

Die Sequenzmotive sind im Ein-Buchstaben-Code benannt und wurden aus der jeweils angegebenen Swiss-Prot Accession No. ermittelt. Die Aminosäuresequenzen beider Sequenzabschnitte sind im Anhang aufgeführt. Die Positionsangaben beziehen sich auf die jeweilige Swiss-Prot Accession No. Die Hydrophilie wurde nach Kyte & Doolittle bestimmt, kleinere Werte geben eine größere Hydrophilie an. aa Aminosäure.

5.2.3.2.2 Generierung der monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden je Peptid drei Balb/c-Mäuse intraperitoneal mit den an kohlenhydratfreies BSA gekoppelten Peptiden plus Muramyldipeptid-Adjuvanz immunisiert. Der Verlauf der Immunisierung wurde durch die Bestimmung der Antikörpertiter der Seren, die vor der Erstimmunisierung (Präimmunseren) und während der Immunisierung gewonnen worden waren, überprüft.

In den Seren aller immunisierten Mäuse konnten Antikörper gegen die zur Immunisierung eingesetzten Peptide nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Titerbestimmung erfolgte im Endpunkt-ELISA mit Myoglobin-Peptid Konjugaten.

Um eine möglichst hohe Ausbeute an Hybridomzellen mit spezifischer Antikörperproduktion zu erreichen, wurde für die Fusion für jedes Peptid diejenige Maus ausgewählt, die den höchsten Antikörpertiter aufwies. In Abbildung 5.17 sind Peptid-spezifische Antikörpertiter der für die Fusionen ausgewählten Mäuse gezeigt. Bei allen untersuchten Peptiden zeigten die Präimmunseren auch bei der geringsten eingesetzten Verdünnung (1:150) keine Signale. Im Vergleich hierzu konnte bereits zwei Wochen nach der Erstimmunisierung ein Antikörpertiter zwischen 1:9.600 und 1:153.600 nachgewiesen werden, der durch erneute Immunisierungen weiter anstieg (1:5.200.000 bis 1:64.000.000).

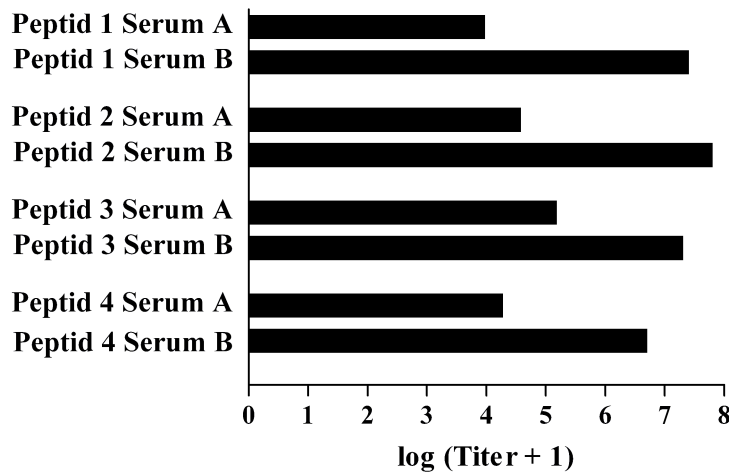


Abbildung 5.17: Peptid-spezifischer Antikörpertiter der vier für die Fusionen ausgewählten Mäuse. Der Titer wurde im Endpunkt-ELISA bestimmt. Die Platten wurden mit 150 ng/ml Myoglobin-Peptid Konjugat beschichtet und gebundene Antikörper mit HRP-markiertem anti-Maus IgG und nachfolgender Farbentwicklung nachgewiesen. Der Titer ist als $\log(\text{Titer} + 1)$ der höchsten Verdünnung der Seren angegeben, bei der die Extinktion oberhalb des errechneten Signalschwellenwertes (siehe Kapitel 4.3.2.3) lag. Serum A wurde zwei Wochen nach der Erstimmunisierung gewonnen, Serum B eine Woche nach der dritten (Peptid 3 und 4) bzw. fünften Immunisierung (Peptid 1 und 2).

Zur Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper wurden die präparierten Milzzellen der ausgewählten Mäuse mit der Myelomzelllinie P3X63Ag8/653 fusioniert. Nach der Selektion der Hybridomzellen der vier Fusionen in HAT-Medium wuchsen in 66-91 % der Kavitäten Hybridomzellen. Die Zellkulturüberstände dieser Kavitäten wurden im Peptid-ELISA mit Myoglobin-Peptid Konjugat (37,5 ng/Kavität) auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gescreent. Als Negativ-Kontrollen dienten ein Myoglobin-Peptid Konjugat mit irrelevanter Peptidsequenz und freies Myoglobin. Die Hybridomzellen der positiv getesteten Überstände wurden nach dem Prinzip der limitierten Verdünnung kloniert und nach weiterem Wachstum auf die Produktion spezifischer Antikörper im Peptid-ELISA gescreent. Alle Klone mit stabilem Wachstum und stabiler Produktion spezifischer Antikörper wurden insgesamt viermal rekloniert. Nach der vierten Reklonierung konnten je nach Peptid zwischen 4 und 13 Hybridomzellklone erhalten werden.

Die Hybridomzellüberstände wurden zusätzlich im Mucin-ELISA (600 ng/Kavität Mucin NaA3) auf die Erkennung des nativen Antigens getestet. Je nach Peptid wurde das humane Mucin von 2-5 stabilen Klonen spezifisch erkannt. Die Resultate zur Generierung der monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

Tabelle 5.5: Zusammenfassung der Fusionsergebnisse.

Peptid	verwendete Kavitäten	Kavitäten mit Zellwachstum	Klone mit spezifischer Antikörperproduktion (1. Screening)	stabile Klone nach 4. Reklonierung	
				spezifische Antikörperproduktion	spezifische Erkennung von humanem Mucin
1	464	426	21	4	3
2	467	380	25	13	5
3	414	301	18	13	4
4	567	375	8	4	2

Von den Antikörpern, welche natives humanes MUC5AC erkannten, wurden für jedes Peptid zwei Kandidaten ausgewählt, die Hybridomzellklone expandiert und die Antikörper näher charakterisiert.

5.2.3.3 Charakterisierung der ausgewählten monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper

Um die monoklonalen Antikörper mittels Protein A-Affinitätschromatographie reinigen und gegebenenfalls einen Sandwich-ELISA unter Ausnutzung der Antikörpersubklassen aufbauen zu können, wurden die Klassen und Subklassen der ausgewählten Kandidaten mit Hilfe des IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit bestimmt (Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6: Bestimmung der Immunglobulinklassen der Antikörperklone.

Peptid	1		2		3		4	
Klon	1-2-23	1-5-14	2-3-22	2-19-2	3-5-13	3-15-12	4-1-1	4-10-4
Subklasse	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁	IgG _{2b}	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁

Alle Antikörper gehörten zur Klasse G. Davon wurden sieben als zur Subklasse IgG₁ und einer als zur Subklasse IgG_{2b} zugehörig identifiziert.

Für den Einsatz in einem Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstest oder in der Mucinquantifizierung sind voraussichtlich größere Mengen gereinigter Antikörper erforderlich. Daher wurden die ausgewählten Klone im semipräparativen Maßstab expandiert, die Kulturüberstände gesammelt, die Antikörper affinitätschromatographisch gereinigt und die Eluate mittels Zentrifugal-Konzentratoren konzentriert. Aus im Mittel 468 ± 68 ml Zellkulturüberstand konnten im Durchschnitt $3,9 \pm 2,6$ mg gereinigter

monoklonaler Antikörper gewonnen werden. Die jeweiligen Kennzahlen zur Antikörperreinigung sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tabelle 5.7: Kennzahlen zur Gewinnung und Reinigung der im semipräparativen Maßstab hergestellten anti-MUC5AC-Antikörper.

Peptid	Klon	Volumen [ml]		Antikörperkonzentration [mg/ml]			Antikörperausbeute [mg]
		Zellkulturüberstand	Antikörperlösung	nach BCA	nach Lowry	im Mittel	
1	1-2-23	451	3,36	0,23	0,29	0,25	0,83
	1-5-14	472	3,54	0,89	0,93	0,91	3,21
2	2-3-22	485,5	3,65	0,70	0,77	0,72	2,65
	2-19-2	276,5	2	1,72	1,77	1,74	3,47
3	3-5-13	454,5	1	8,08	7,53	7,91	7,91
	3-15-12	449	1	8,01	8,10	8,04	8,04
4	4-1-1	476,5	1,4	1,64	1,78	1,68	2,35
	4-10-4	462,5	1	2,82	3,14	2,91	2,91

Angegeben ist das jeweilige zur Immunisierung verwendete Peptid, die Bezeichnung der untersuchten Antikörperklone, die zur Reinigung eingesetzte Menge Zellkulturüberstand, die nach der Konzentrierung des Eluats erhaltene Menge Antikörperlösung, deren Proteinkonzentration nach Lowry und mittels BCA-Assay, die daraus ermittelten durchschnittlichen Proteinkonzentrationen sowie die Menge der gereinigten Antikörper. Da sich der BCA-Assay durch eine höhere Empfindlichkeit und eine geringere Störanfälligkeit als die Methode von Lowry auszeichnet, wurden für den Mittelwert die durch den BCA-Assay bestimmten Proteinkonzentrationen zu 70 % und die nach Lowry ermittelten zu 30 % gewichtet. Alle Konzentrationsbestimmungen wurden in Duplikat durchgeführt.

Die Reinheit der isolierten monoklonalen Antikörper wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung der separierten Proteine überprüft (Abbildung 5.18).

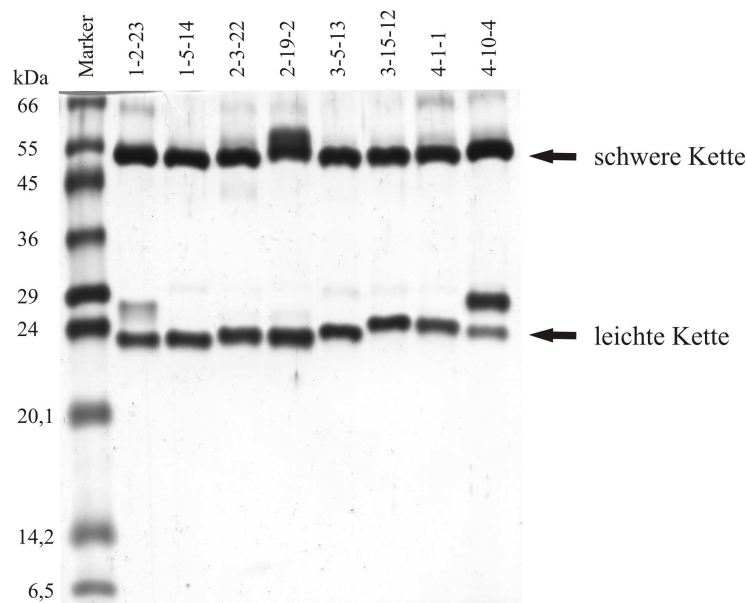


Abbildung 5.18: Gelelektrophoretische Analyse der Reinheit der isolierten Antikörper. Je Klon wurden 0,4 µg Protein in reduzierendem Probenauftragspuffer auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Silberfärbung.

Bei allen Antikörpern waren zwei prominente Banden sichtbar, die in ihrer Molmasse der schweren und der leichten Kette eines Immunglobulins G entsprechen. Weitere, schwächere Banden oberhalb der schweren und im Bereich der leichten Ketten könnten auf Proteinverunreinigungen, z.B. durch Reste von Serumproteinen des Kulturmediums, und auf Degradationsprodukte hinweisen.

Als Qualitätskontrolle wurde die Bindungskapazität der isolierten Antikörper an das bereits im Mucin-ELISA während der Generierung der Klone verwendete humane, nasale Mucin NaA3 im Dot Blot ermittelt und so überprüft, ob die Antikörper während der Reinigung beschädigt wurden oder nicht (Abbildung 5.19).

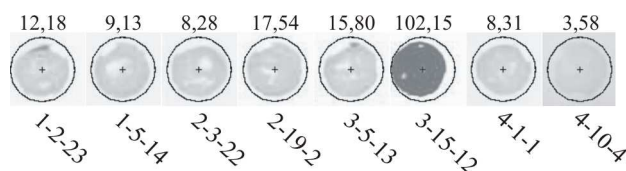


Abbildung 5.19: Qualitätskontrolle der isolierten monoklonalen Antikörper im Dot Blot. Ermittelt wurde die Bindungskapazität der Antikörper an humanes, nasales Mucin (NaA3). Je Dot wurden 3 µg Mucin auf Nitrocellulosemembran aufgetragen. Daran gebundene anti-MUC5AC-Antikörper wurden mit Alexa Fluor 680-markiertem Ziege anti-Maus IgG bei 700 nm im Odyssey Infrared Imager detektiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe der Odyssey Application Software bestimmt. Die erhaltenen Signalintensitäten sind über den jeweiligen Dots angegeben.

Die isolierten monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper gegen humanes MUC5AC erkannten alle das humane Mucin, allerdings unterschiedlich gut. Besonders vielversprechend erschien hier der Antikörper 3-15-12. Der Antikörper des Klons 4-10-4 band hingegen nur sehr schwach an das Mucin und wurde daher für die folgende Validierung der Mucinerkennung durch die isolierten Antikörper ausgeschlossen.

5.2.3.4 Validierung der Erkennung von humanem MUC5AC durch die isolierten anti-MUC5AC-Antikörper

Um zu überprüfen, ob die isolierten monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper humanes MUC5AC Protein von unterschiedlichen Probanden gleichermaßen erkennen, wurde eine Dot Blot-Analyse mit gereinigten, humanen, nasalen Mucinen von sechs Spendern durchgeführt (Abbildung 5.20). Dabei konnten hohe Signalvariabilitäten sowohl beim Vergleich der Erkennung der einzelnen Mucinproben durch denselben anti-MUC5AC-Antikörper als auch beim Vergleich der verschiedenen Antikörper untereinander beobachtet werden. So banden vier der sieben getesteten Antikörper nur an Mucin einzelner Probanden, während dieselben Antikörper das Mucin anderer Spender nicht erkannten. Die anderen drei Antikörper erkannten zwar alle sechs Mucinproben, allerdings mit unterschiedlicher Güte.

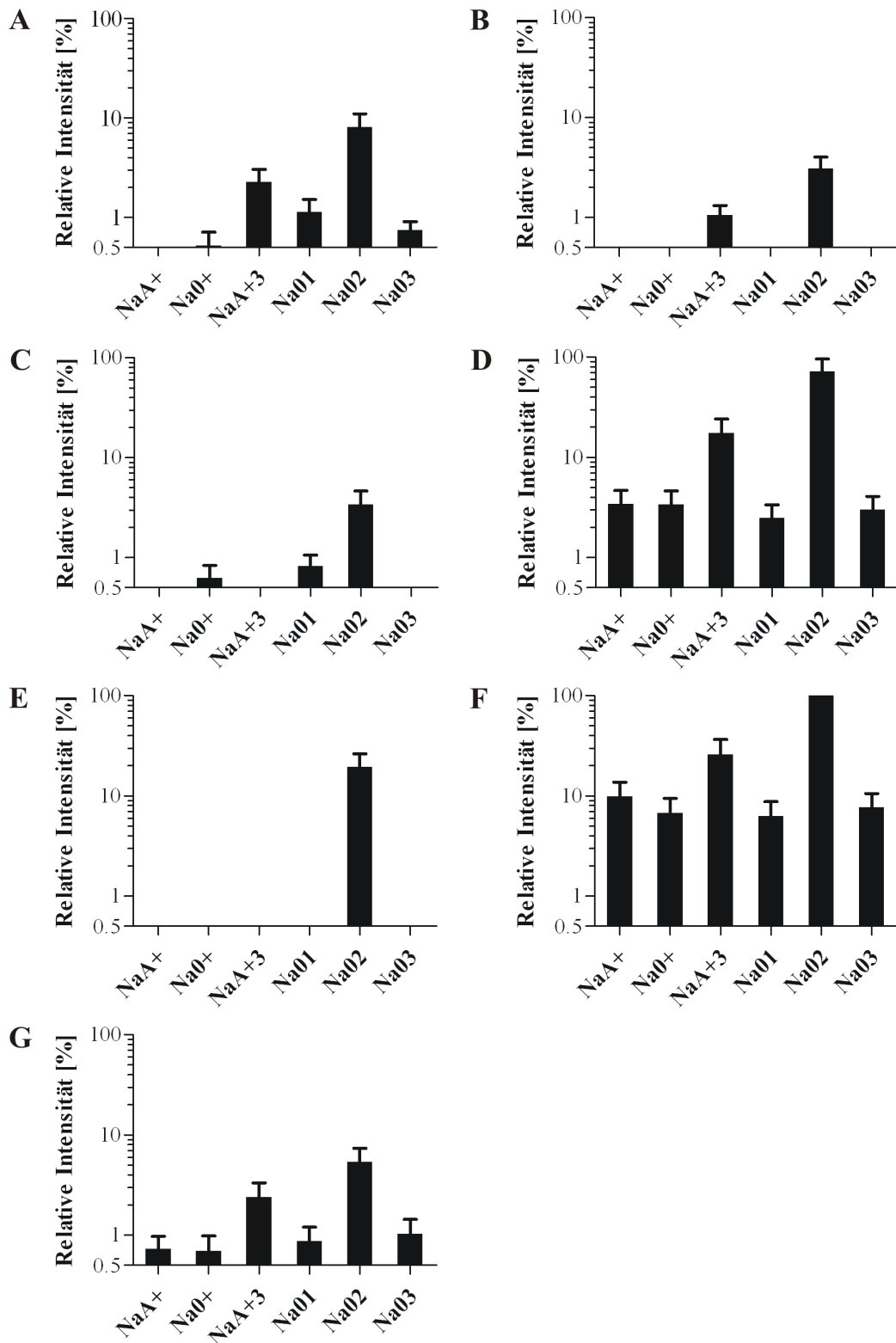


Abbildung 5.20: Bindung der isolierten monoklonalen anti-MUC5AC-Antikörper an humane, nasale Mucine im Dot Blot. Je Dot wurden 10 µg der humanen, nasalen Mucine NaA+, Na0+, NaA+3, Na01, Na02 und Na03 auf Nitrocellulosemembran aufgetragen. Daran gebundene anti-MUC5AC-Antikörper wurden mit Alexa Fluor 680-markiertem Ziege anti-Maus IgG bei 700 nm im Odyssey Infrared Imager detektiert und die Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe der Odyssey Application Software quantifiziert. Gezeigt sind die relativen Signalintensitäten der Antikörper 1-2-23 (A), 1-5-14 (B), 2-3-22 (C), 2-19-2 (D), 3-5-13 (E), 3-15-12 (F) und 4-1-1 (G). Die Normalisierung aller Signalintensitäten erfolgte auf einen Wert von 100 % für die Bindungskapazität des Antikörpers 3-15-12 an das Mucin Na02. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler von 2 Messwerten.

Die ermittelte Signalvariabilität konnte aufgrund der für die Herstellung der monoklonalen Antikörper angesetzten Kriterien nicht vorhergesehen werden und macht weitere Untersuchungen zur Klärung ihrer Ursachen notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren. Erst nach Abschluss weitergehender Studien zur Zusammensetzung der Mucine nasaler Sekrete von unterschiedlichen Spendern kann abgeschätzt werden, inwieweit ein „Capture“-Assay und die Verwendung der generierten anti-MUC5AC-Antikörper für ein Screening von nasalen Sekreten verschiedener Probanden im Hochdurchsatz möglich und zielführend ist.

6 Diskussion

Das kolorektale Karzinom ist in der westlichen Welt bereits heute einer der am häufigsten auftretenden malignen Tumoren. Aufgrund des Trends einer steigenden Lebenserwartung und bekannter Risikofaktoren wie Übergewicht, Bewegungsmangel und Konsum von fleisch- und fettreicher Kost (Batzler et al., 2008) wird diese Krankheit in den nächsten Jahren voraussichtlich noch an Bedeutung zunehmen. Daher werden regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung von Darmkrebs immer wichtiger. Ein zentrales Problem stellt dabei die Abneigung der Bevölkerung gegen die Durchführung der etablierten Vorsorgeuntersuchungen wie FOBT, Koloskopie und Sigmoidoskopie dar (American Cancer Society, 2008). Deshalb ist es notwendig, alternative Diagnoseverfahren zur Früherkennung kolorektaler Karzinome und deren Krebsvorstufen zu entwickeln, die von der Bevölkerung nicht als unangenehm empfunden werden und so eine breitere Akzeptanz finden könnten.

Zur Entwicklung eines solchen Diagnoseverfahrens wird ein geeigneter Tumormarker benötigt. Dies kann unter anderem ein morphologischer Unterschied zwischen gesundem und entartetem Gewebe sein, wie z.B. die Glykocalyx auf der apikalen Epithelzelloberfläche der Darmschleimhaut. Diese bedeckt im gesunden Gewebe die Epithelzellen und stellt eine Barriere zwischen Darmlumen und Zellmembran dar (Ito, 1965; Maury et al., 1995a; Maury et al., 1995b), wohingegen diese Barriere auf Kolonkarzinomzellen *in vitro* fehlt, so dass Ligand-beschichtete Partikel spezifisch an Rezeptoren der Zellmembran binden können (Frey et al., 1996). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Fehlen einer Glykocalyx auf entarteten Zellen als Biomarker zur Diagnose kolorektaler Karzinome dienen und die Abwesenheit der Glykocalyxbarriere zur selektiven Markierung dieser entarteten Zellen durch partikuläre Kontrastmittel genutzt werden könnte.

6.1 Bewertung der Glykocalyx als Biomarker zur Diagnose kolorektaler Neoplasien

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine fehlende oder rudimentäre Glykocalyx nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zur Detektion entarteter Zellen eingesetzt werden könnte. Hierfür wurde die Morphologie von

murinem Darmgewebe anhand eines Mausmodellsystems sowie die Struktur von humanem Darmgewebe mit Hilfe von Patientenmaterial analysiert.

Die Begutachtung der Morphologie muriner Darmschleimhaut erfolgte mit Hilfe des „multiple intestinal neoplasia“ (MIN) -Mausmodells (Moser et al., 1990). Die Verwendung dieses Modellsystems erlaubte die Untersuchung von Krebsvorstufen des kolorektalen Karzinoms, da MIN-Mäuse aufgrund eines genetischen Defekts im *apc*-Gen spontan zahlreiche adenomatöse Polypen entlang des gesamten Darms entwickeln (Moser et al., 1990; Su et al., 1992). Diese Mutation des *apc*-Gens wirkt sich jedoch nicht auf die Morphologie des Epithels von nicht entarteten Bereichen der Darmschleimhaut aus, wie durch vergleichende Analysen der gesunden Epithelschicht von MIN-Mäusen mit der einer Wildtyp-Maus festgestellt wurde. Die gesunden Epithelzellen beider Mausstämme unterschieden sich morphologisch nicht voneinander. Sie besaßen stets eng beieinander stehende Mikrovilli, die von einer dichten Glykocalyx bedeckt waren. Lediglich auf den Epithelzellen des Duodenums der MIN-Mäuse fehlte die Glykocalyx streckenweise. Da die Därme immer am proximalen Ende des Duodenums resektiert wurden und dieses sporadische Fehlen der Glykocalyx nur im Duodenum beobachtet wurde, liegt es nahe, dass die Lücken in der Glykocalyx mechanische Schäden darstellen. Durch das Abklemmen des Duodenums mit einem Hämostaten direkt am Magenausgang und durch die damit einhergehenden Manipulationen des Gewebes in dieser Region kann das Gewebe überdehnt und damit Scherkräften ausgesetzt worden sein, die möglicherweise zu einer Zerstörung der Glykocalyx geführt haben. Da in früheren Studien an Balb/c-Mäusen das Fehlen einer Glykocalyx nicht beobachtet wurde (unveröffentlichte Daten A. Frey), ist davon auszugehen, dass es sich bei der fehlenden Glykocalyx im Duodenum der MIN-Mäuse um ein experimentelles Artefakt handelt.

Im Gegensatz zur gesunden Darmschleimhaut der MIN-Mäuse fehlte auf der Schleimhaut der Adenome die Glykocalyx stets vollständig. Des Weiteren besaßen die entarteten Epithelzellen im Dünndarm keine Mikrovilli mehr und auch auf Adenomen im Kolon waren kaum noch Mikrovilli vorhanden. Aufgrund dessen, dass das Fehlen einer Glykocalyx im adenomatösen Gewebe immer mit dem Fehlen von Mikrovilli einhergeht, kann hier davon ausgegangen werden, dass es sich bei der fehlenden Glykocalyx auf den Epithelzellen der Adenome nicht um ein experimentelles Artefakt handelt. Im gesunden Duodenumgewebe der MIN-Mäuse war auch im Bereich der Glykocalyxlücken stets ein intakter Bürstensaum vorhanden. Damit zeigen diese Daten, dass auch *in vivo* anhand der

Glykocalyx sehr gut zwischen gesundem und entartetem Gewebe unterschieden werden kann. Dies bestätigt nicht nur die bisher gemachten *in vitro* Beobachtungen von Frey et al. (1996), sondern es zeigt darüber hinaus auch, dass die Glykocalyx in diesem Mausmodell als Biomarker zur Diagnose von Vorstufen des kolorektalen Karzinoms dienen kann.

Die Diagnose von Krebsvorstufen ist eine wichtige Voraussetzung für ein alternatives diagnostisches Verfahren zur Früherkennung von Darmtumoren. Aufgrund der sehr guten Unterscheidbarkeit zwischen gesunder Darmschleimhaut und der von Adenomen, basierend auf dem Vorhandensein bzw. dem Fehlen der Glykocalyx, bietet sich die MIN-Maus als Modellsystem für zukünftige Studien zur Validierung des gedachten Diagnoseverfahrens an und kann dafür eingesetzt werden, um potentielle partikuläre Kontrastmittel für kolorektale Karzinome im lebenden Organismus zu testen. So können diese Kontrastmittel vor einer Untersuchung an humanem Gewebe, welches nur in kleinen Probemengen zur Verfügung steht, auf ihre Eignung zur selektiven optischen Markierung entarteter Darmschleimhaut analysiert und ungeeignete Kontrastmittel für ausführliche Studien an humanem Gewebe ausgeschlossen werden.

Da das gedachte Diagnoseverfahren letztendlich zur Markierung und Detektion von Darmtumoren im Menschen genutzt werden soll, wurde auch die Morphologie entarteter und gesunder humane Darmschleimhaut analysiert. Hierzu wurden Gewebeproben von zehn Adenokarzinomen, acht Polypen sowie einem *Carcinoma in situ* des Kolons analysiert und mit gesundem Kolongewebe von zwölf Patienten verglichen. Zudem wurde gesundes Gewebe aus dem Ileum von sechs Patienten untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Morphologie der gesunden und entarteten Gewebe von Mensch und MIN-Maus jeweils sehr ähnelt. Auch bei der humanen Schleimhaut traten im gesunden Epithel Glykocalyxlücken auf, und das neoplastische Gewebe war weitgehend frei von Glykocalyx und Mikrovilli.

Die Enterozyten der gesunden humanen Schleimhaut besaßen stets dicht beieinander stehende Mikrovilli, die meist von einer ausgeprägten Glykocalyx bedeckt waren. Insgesamt konnte auf 76,8 % der gesunden Epithelzellen des Kolons und auf 94,1 % der gesunden Epithelzellen des Ileums eine intakte Glykocalyx nachgewiesen werden. Doch es gab große individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Gewebeproben. So waren bei neun Patienten zwischen 11 % und 96 % der Epithelzellen des Kolons von einer intakten Glykocalyx bedeckt, während bei den anderen drei Patienten 100 % der Epithelzellschicht

eine ausgeprägte Glykocalyx trug. Im Ileum konnte bei vier von sechs analysierten Geweben eine fast vollständige Glykocalyx nachgewiesen werden, während diese auf der untersuchten Epithelzelloberfläche von zwei Patienten zu 22-24 % fehlte. Es ist allerdings denkbar, dass es sich bei der fehlenden Glykocalyx im gesunden humanen Gewebe wie schon im gesunden Gewebe der MIN-Mäuse um experimentelle Artefakte handelt, für die mehrere Ursachen in Frage kommen:

- 1) Während der Operation wurde vor der Durchtrennung des Darms an den Schnittstellen der noch vorhandene Darminhalt (Reststuhl) manuell zu beiden Seiten verschoben. Nicht nur der dabei ausgeübte Druck auf den Darm, sondern auch die bei der Verschiebung des Darminhalts entstandenen Scherkräfte könnten zur teilweisen Zerstörung der Glykocalyx geführt haben.
- 2) Während des Transports und der pathologischen Begutachtung des Gewebes (Dauer etwa 55-140 min von der Entnahme der Darmresektate bis zur Fixierung der Gewebestücke) könnte es zu einem partiellen Abbau der Glykocalyx gekommen sein.
- 3) Zur pathologischen Begutachtung der Darmschleimhaut wurden die Resektate längs eröffnet und zunächst unter fließendem Wasser von vorhandenem Darminhalt befreit. Auch hierbei könnten Scherkräfte aufgetreten sein, welche die Glykocalyx zerstören können.
- 4) Während der Fixierung des Gewebes zieht sich die *Lamina muscularis mucosae*, die aus glatten Muskelzellen besteht und die Grenze zwischen Schleimhaut (*Tunica mucosa*) und der darunter liegenden *Tunica submucosa* bildet, zusammen, und die apikale Epithelzelloberfläche, auf der sich die Glykocalyx befindet, wölbt sich vor. Zudem wird das Gewebe durch das Fixativ sehr hart, wodurch die Glykocalyx sehr empfindlich wird. Werden die Gewebestücke während der Fixierung und der anschließenden Entwässerung und Einbettung viel bewegt, kommt es zum Abbrechen der Glykocalyx (unveröffentlichte Daten A. Frey). Dies wurde bei der Präparation des humanen Gewebes zwar versucht zu vermeiden, konnte aber nicht immer verhindert werden.

Aufgrund der genannten möglichen Ursachen ist schwer zu beurteilen, ob gesundes humanes Gewebe immer eine Glykocalyx trägt. Das Fehlen der Glykocalyx im fixierten Gewebe erlaubt wie oben ausgeführt nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf den Zustand der Glykocalyx im unfixierten, gesunden Darmgewebe. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Denkbar sind z.B. Bindungsstudien mit partikulären

Kontrastmitteln, die aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit zukünftig entwickelt werden können.

Auf der Epithelzellschicht der drei entarteten humanen Gewebetypen fehlten ein intakter Bürstensaum und eine intakte Glykocalyx. Nur auf 4,7 % der insgesamt analysierten Epithelzelloberfläche der Adenokarzinome und auf 5,5 % der Oberfläche der Polypen konnte eine intakte Glykocalyx nachgewiesen werden, auf dem Gewebe des *Carcinoma in situ* fehlte sie vollständig. Allerdings wurden beim patientenbasierten Vergleich der einzelnen Adenokarzinome und Polypen individuelle Unterschiede festgestellt. So gab es ein Adenokarzinom, dessen Epithelzelloberfläche zu 46 % von einer intakten Glykocalyx bedeckt war, während auf den Epithelzellen der anderen Adenokarzinome keine intakte Glykocalyx vorhanden war. Auch bei den Polypen wurden solche individuellen Unterschiede ermittelt. Während bei zweien eine intakte Glykocalyx auf 15 % bzw. 18 % der Oberfläche nachgewiesen wurde, fehlte diese auf den anderen fast vollständig bzw. komplett. Diese individuellen Unterschiede beruhen jedoch offenbar nicht auf dem Stadium der Tumorprogression. So hatte z.B. das Adenokarzinom von Patient 13, dessen Epithelzellen keine Glykocalyx besaßen, nur die inneren Schichten der Darmwandmuskulatur infiltriert und nicht metastasiert. Hingegen war das Adenokarzinom, dessen Oberfläche zu 46 % von einer Glykocalyx bedeckt war (Patient 9), von den analysierten Karzinomen das am weitesten fortgeschrittene. Dieser Tumor durchbrach die gesamte Darmwandung und reichte bis in die Subserosa hinein. Außerdem hatte er bereits 12 von 16 untersuchten Lymphknoten metastatisch durchsetzt sowie eine Metastase im Ovar gebildet. Auch die genetische Variabilität zwischen den einzelnen Patienten erklärt wahrscheinlich nicht die Unterschiede zwischen identischen Gewebetypen. Denn von Patient 12 wurden vier etwa 0,4 cm große, tubuläre Polypen analysiert, von denen zwei keine Glykocalyx besaßen, während die Oberfläche der anderen Polypen zu 9 % bzw. zu 15 % von einer intakten Glykocalyx bedeckt war. Es ist durchaus vorstellbar, dass genetische Unterschiede jedes einzelnen entarteten Gewebes, die durch individuelle Mutationen während der Karzinogenese entstehen, für die unterschiedliche Ausprägung der Glykocalyx verantwortlich sind. Doch auch mit einer teilweise vorhandenen Glykocalyx auf entartetem Darmgewebe sollte es möglich sein, dieses Gewebe durch ein geeignetes Diagnoseverfahren mit entsprechend guter Auflösung spezifisch zu detektieren.

Während sich also bei den MIN-Mäusen ein jeweils einheitliches Gesamtbild für die Glykocalyx im gesunden und entarteten Gewebe zeigte, wurden bei der analysierten

humanen Schleimhaut sowohl im gesunden als auch im neoplastischen Gewebe große Schwankungen in Hinblick auf eine vorhandene bzw. fehlende Glykocalyx festgestellt. Daher wurde zur Beurteilung des Biomarkers Glykocalyx im humanen Gewebe eine statistische Analyse der gewonnenen Daten durchgeführt.

Ein wesentliches Kriterium zur Bestimmung der Güte der Glykocalyx als Biomarker zur Unterscheidung von gesunder und entarteter humaner Darmschleimhaut ist die Genauigkeit, mit der zwischen vorhandener und fehlender Glykocalyx differenziert werden kann. Um diese bestimmen zu können, wurden ROC-Analysen durchgeführt und die Flächen unter den Kurven (AUC) bestimmt. Liegt die ermittelte AUC zwischen 0,9 und 1, bedeutet dies, dass die Genauigkeit eines diagnostischen Tests als sehr gut eingestuft werden kann. Da die ermittelten Werte innerhalb des Bereichs einer hohen Genauigkeit lagen (Adenokarzinome versus gesundes Gewebe 0,908; Polypen versus gesundes Gewebe 0,909), ist davon auszugehen, dass die Glykocalyx ein sehr gut geeigneter Biomarker zur Unterscheidung von gesundem und entartetem Gewebe ist. Nach den hier vorliegenden Daten gilt dies sowohl für kolorektale Karzinome als auch für deren Vorstufen.

Anhand der ROC-Kurven kann auch eine Aussage über die Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests gemacht werden. Zur Ermittlung dieser Kriterien für den Biomarker Glykocalyx wurde der optimale Grenzwert der ROC-Kurven herangezogen. Sowohl für die Unterscheidung zwischen Adenokarzinomen und gesundem Gewebe als auch für die zwischen Polypen und gesundem Gewebe konnte eine hohe Sensitivität (Adenokarzinome 94,8 %; Polypen 95,7 %) und Spezifität (beide Gewebetypen 84,6 %) bestimmt werden. Dies zeigt, dass die fehlende Glykocalyx auf entartetem, humanem Gewebe ein neuer, vielversprechender Biomarker zur Früherkennung von kolorektalen Karzinomen darstellt. Die Glykocalyx scheint nicht nur im Vergleich mit den Sensitivitäts- und Spezifitätswerten der etablierten Vorsorgeuntersuchungen (Tabelle 6.1), sondern auch in Anbetracht der guten Erkennung von frühen Tumorstadien ein geeigneter diagnostischer Ansatzpunkt zu sein.

Tabelle 6.1: Sensitivität und Spezifität empfohlener Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms.

Verfahren	Fortgeschrittene Neoplasien (1)		Adenome < 10 mm	
	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität
FOBT	20,0-27,0 % (2, 3, 4)	89,0-93,6 % (2,3)	-	-
Sigmoidoskopie	70,3-83,3 % (3, 4)	59,6 % (3)	67,4 % (3)	98,9 % (3)
Koloskopie	100 % (3)	98,0 % (3)	97,8 % (3)	95,8 % (3)

(1) Fortgeschrittene Neoplasien sind definiert als Adenome mit einer Größe von 10 mm oder mehr im Durchmesser, villöse Adenome, Adenome mit hochgradiger Dysplasie oder invasive Karzinome. (2) Vogel et al., 2005. (3) Graser et al., 2009. (4) Lieberman und Weiss, 2001.

Bisher etablierte Verfahren zur Diagnose kolorektaler Karzinome lassen sich einteilen in Diagnoseverfahren, die hauptsächlich Karzinome erkennen können, und in solche, mit denen sowohl Karzinome als auch deren Vorstufen detektiert werden können (Smith et al., 2009). Das kostengünstigste Verfahren ist der FOBT, mit dem okkultes Blut im Stuhl nachgewiesen wird. Ein großer Nachteil des FOBT ist allerdings, dass er nicht spezifisch für kolorektale Karzinome ist, da der Test nicht zwischen Blutungen aus einem Darmkrebs oder einer harmlosen Quelle wie Hämorrhoiden unterscheiden kann. Deshalb kommt es im FOBT häufig zu falsch positiven Testergebnissen. Zudem kann der FOBT nur Karzinome detektieren, da die Vorstufen kolorektaler Karzinome in der Regel nicht bluten. Erst fortgeschrittene Neoplasien bluten und können somit nachgewiesen werden (Schmiegel et al., 2008). Doch selbst für diese Tumorstadien ist die Sensitivität mit nur 27 % nicht nur sehr gering, sondern auch deutlich schlechter als die Sensitivität, die im Rahmen dieser Arbeit für den Biomarker Glykocalyx ermittelt wurde.

Mit Hilfe endoskopischer Verfahren können kolorektale Karzinome sowie deren Vorstufen nachgewiesen werden (Smith et al., 2009). Während bei der Sigmoidoskopie, welche proximale Tumoren nicht erfasst, die Sensitivität sowohl für fortgeschrittene Neoplasien als auch für Polypen mit einem Durchmesser von unter 1 cm geringer ist als die Sensitivität des Biomarkers Glykocalyx, werden bei der Koloskopie die höchste Sensitivität und Spezifität für das Auffinden von kolorektalen Karzinomen und Adenomen erreicht. Auch der Biomarker Glykocalyx erreicht nicht die Werte dieses als Standard empfohlenen Verfahrens. Allerdings werden endoskopische Untersuchungen aufgrund ihrer Invasivität häufig als unangenehm empfunden, so dass die Akzeptanz der Bevölkerung für diese Vorsorgeuntersuchung gering ist. Das hier vorgestellte

Diagnoseverfahren hingegen sollte eine nicht invasive Detektion von entartetem Gewebe ermöglichen, indem Kontrastmittel eingesetzt werden, die durch nicht-invasive Methoden sichtbar gemacht werden können. Als Kontrastmittel zum Nachweis von entarteter Darmschleimhaut könnten z.B. magnetische Partikel eingesetzt werden, welche mit Hilfe des sogenannten „magnetic particle imaging“ (MPI) detektiert werden können (Gleich und Weizenecker, 2005). Mit dieser Methode konnte bereits eine Auflösung besser als 1 mm erreicht werden (Gleich et al., 2008).

In Verbindung mit dem neuen Tumormarker Glykocalyx könnte dieses nicht-invasive neue Diagnoseverfahren sowohl hinsichtlich der Akzeptanz als auch in Hinblick auf eine möglichst frühe Erkennung der Erkrankung allen bislang bekannten Darmkrebsdiagnoseverfahren überlegen sein.

6.2 Grenzen des Biomarkers Glykocalyx zur Diagnose kolorektaler Neoplasien

Zum Nachweis intestinaler Neoplasien vorgesehene Kontrastmittel sollten zur Minimierung von Nebenwirkungen und aufgrund der besseren Akzeptanz oral appliziert werden. Dies bedeutet, dass die Kontrastmittel den gesamten Gastrointestinaltrakt durchwandern müssen. Wichtig für eine spezifische Bindung an entartete Darmschleimhaut ist daher, dass auf dem nicht entarteten Darmepithel des gesamten Gastrointestinaltrakts stets eine Glykocalyx vorhanden ist.

Im Dünndarm finden sich so genannte Peyer'sche Plaques, die aus zusammengelagerten Lymphfollikeln direkt unterhalb des Epithels und aus tiefer liegenden T-Zell-Bereichen bestehen (Mowat, 2003). Die Follikel sind gegen das Darmlumen durch das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) abgegrenzt. Im FAE kommen nur wenige Becherzellen vor (Owen, 1999), so dass die Epithelzellen in diesem Bereich nicht durch eine dichte Mukusschicht geschützt sind. Neben den Enterozyten finden sich im FAE vor allem die charakteristischen M-Zellen. Diese Zellen weisen morphologische Besonderheiten auf, durch die sie deutlich von Enterozyten zu unterscheiden sind. Sie besitzen auf ihrer apikalen Zelloberfläche nur rudimentär ausgebildete Mikrovilli und auch die Glykocalyx ist nur sehr gering ausgeprägt (Neutra et al., 1987). Zudem besitzen sie eine große basolaterale Tasche, in der sich Lymphozyten sowie Makrophagen befinden (Neutra et al.,

1996). M-Zellen sind spezialisiert auf die Endozytose von Antigenen und deren vesikulären Transport zu den Lymphozyten und Makrophagen in der Tasche (Neutra et al., 1996; Neutra und Kraehenbruhl, 1992). Bei einem Einsatz partikulärer Kontrastmittel zum Nachweis kolorektaler Neoplasien muss daher ausgeschlossen sein, dass diese aufgrund der nur rudimentären Glykocalyx an Rezeptoren der M-Zellen wie das Gangliosid G_{M1} binden und aufgenommen werden. Solch eine Bindung und Aufnahme von Partikeln konnte für CTB-beschichtete, nanopartikuläre M-Zell-Targeting-Liganden mit einem Durchmesser von 28,8 nm gezeigt werden, während die Glykocalyx der Enterozyten eine Bindung dieser Partikel an die Zelloberfläche verhinderte (Frey et al. 1996). In derselben Studie konnte aber auch gezeigt werden, dass CTB-beschichtete Mikropartikel mit einem Durchmesser von 1,13 μm weder an Enterozyten noch an M-Zellen binden. Für diese Partikelgröße reichte die rudimentäre M-Zell-Glykocalyx zur Abschirmung des Gangliosid G_{M1} Rezeptors aus. Daher sollte es möglich sein, partikuläre Kontrastmittel zur spezifischen Markierung entarteter Darmschleimhaut einzusetzen, sofern die Partikelgröße so gewählt wird, dass die Kontrastmittel nicht an M-Zellen binden können und dadurch die Endozytose der Partikel durch diese Zellen verhindert wird.

Für verschiedene Krankheiten des Darms konnte eine fehlende Glykocalyx nachgewiesen werden. So wurde bei Kindern mit Zöliakie, einer durch eine Nahrungsmittelunverträglichkeit (Gluten) ausgelösten chronischen Dünndarmentzündung, beobachtet, dass die Glykocalyx beschädigt war und streckenweise fehlte (Stenling et al., 1984). Nach einer glutenfreien Diät scheint sich die Glykocalyxbarriere allerdings zu regenerieren, da in einer anderen Studie gezeigt werden konnte, dass die Epithelzellen von Kindern mit behandelter Zöliakie eine ausgeprägte Glykocalyx tragen (Dyduch et al., 1993). Nur auf einzelnen Epithelzellen weniger Patienten konnte eine reduzierte oder fehlende Glykocalyx beobachtet werden. Signifikante Unterschiede in der Glykocalyx-Höhe zwischen Kindern mit behandelter Zöliakie und gesunden Kindern, deren Gewebe als Kontrolle dienten, konnten jedoch nicht gefunden werden. Vermutet wurde, dass aufgrund geringer Mengen Gluten, die in der glutenfreien Diät der untersuchten Zöliakiepatienten nachgewiesen werden konnten, nicht alle Epithelzellen vollständig ausheilten. Da Zöliakie allerdings meist schon bei Kleinkindern diagnostiziert und behandelt wird, sollte bei Zöliakiepatienten ein Einsatz von Kontrastmitteln zur Krebsvorsorge, die ab dem 50. Lebensjahr empfohlen wird, aufgrund der Regeneration der Glykocalyx nach strikter Glutenkarenz möglich sein. Auch bei Kindern mit einer

chronischen Diarrhö, die durch andere Nahrungsmittelunverträglichkeiten verursacht wurde, konnte das Fehlen einer Glykocalyx auf den Enterozyten des Dünndarms nachgewiesen werden (Poley, 1988). Das gleiche gilt für Durchfälle, welche durch enteropathogene *Escherichia coli* Infektionen ausgelöst wurden. Hier wurden ebenfalls Lücken in der Glykocalyx sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm beobachtet. Die Bakterien hafteten an der luminalen Oberfläche der Enterozyten mit fehlender Glykocalyx (Rothbaum et al., 1983). Da man durch Nahrungsmittel oder Infektionen ausgelöste Durchfälle nicht untherapiert persistieren lässt, ist anzunehmen, dass nach Spontanheilung, medikamentöser Behandlung und/oder Vermeidung des betreffenden Nahrungsmittels im Zuge der Ausheilung auch die Glykocalyx regeneriert und somit ein Diagnoseverfahren mit oral verabreichten Kontrastmitteln eingesetzt werden kann. Vorsorgeuntersuchungen mit Kontrastmitteln sollten daher immer nur an gesunden Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht an Darmbeschwerden wie Durchfall leiden, vorgenommen werden.

Auf den Epithelzellen von Patienten mit Colitis ulcerosa, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung des Kolorektums, konnte nur eine rudimentäre Glykocalyx nachgewiesen werden (Ceralli et al. 1976). Für Patienten mit dieser Erkrankung kann ein Diagnoseverfahren zur Früherkennung kolorektaler Neoplasien, welches auf dem Biomarker Glykocalyx beruht, daher nicht eingesetzt werden. Es ist allerdings bekannt, dass sich Dickdarmkrebs aufgrund einer sehr lang dauernden, schweren und ausgedehnten Dickdarmentzündung, wie sie bei Colitis ulcerosa oder auch bei Morbus Crohn, einer Autoimmunerkrankung, auftritt, entwickeln kann (Eaden et al., 2001; Schmiegel et al., 2008). Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen weisen daher ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome auf und sollten auch weiterhin durch das Standardverfahren Koloskopie untersucht werden. Für Kolitispatienten z.B. wird eine jährliche Darmspiegelung mit Stufenbiopsie empfohlen (Schmiegel et al., 2008), da die Mortalität an kolorektalen Karzinomen bei diesen Personen durch regelmäßige koloskopische Überwachung signifikant gesenkt werden kann (Choi et al., 1993; Connell et al., 1994; Karlen et al., 1998).

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Diagnosekonzept zur frühzeitigen Erkennung kolorektaler Neoplasien ist daher vor allem für das Screening der asymptomatischen Bevölkerung geeignet, also für Personen, die keiner Risikogruppe für das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms angehören und die keine Beschwerden oder Anzeichen im Hinblick auf Darmkrebserkrankungen aufweisen.

6.3 Interaktion partikulärer Kontrastmittel mit Mucin

Damit die zur optischen Markierung kolorektaler Neoplasien benötigten partikulären Kontrastmittel gezielt an entartetes Gewebe binden können, müssen diese Partikel mit einem Liganden beschichtet werden, der eine spezifische Bindung an das Tumorgewebe ermöglicht. Als Rezeptor kann dafür z.B. das auf der Epithelzelloberfläche des Darms vorkommende Gangliosid G_{M1} genutzt werden. Ein Ligand muss in diesem Fall den in das Darmlumen ragenden Kohlenhydratanteil des Glykolipids erkennen. Dabei darf er aber nicht unspezifisch an Kohlenhydratstrukturen der Glykocalyx oder der Mucine binden. Da Mucine epitheliale Glykoproteine und damit auch Kohlenhydratstrukturen der Glykocalyx imitieren, kann eine mögliche Bindung potentieller partikulärer Kontrastmittel bzw. deren Liganden durch Glykoproteine des Darms in einem Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstest analysiert werden.

Olivier (2003) etablierte bereits ein Festphasen-basiertes Testsystem zur Bestimmung der Affinität von partikulären M-Zell-Targeting-Liganden zu Mucin. In diesem System wurden unter anderem humane, nasale Mucine, die zuvor über Cäsiumchlorid-Gradienten aus Mukusproben gereinigt wurden, direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und deren Interaktion mit biotinylierten potentiellen Targeting-Liganden bestimmt. Da Mukus aus einer Mischung verschiedener Mucin-Genprodukte, die je nach Gewebe unterschiedlich exprimiert werden, besteht (Cornberg et al., 2001), können durch dieses Testsystem alle Mucine einer Probe erfasst und analysiert werden. Als Liganden wurden CTB, die B-Untereinheit des hitzelablen Enterotoxins aus *Escherichia coli* (LTB) und verschiedene Lektine, die alle gängigen N- und O-Glykosylierungsmuster von eukaryotischen Proteinen erfassen, eingesetzt. Mit Hilfe dieses Testsystems wurde bei den einzelnen Mucin-Präparationen eine hohe Variabilität hinsichtlich der Lektinbindung beobachtet, was zeigt, dass die Glykosylierung humaner Mucine sehr heterogen ist. Sowohl die Blutgruppe der Spender als auch deren Gesundheitszustand zum Zeitpunkt der Spende schienen dabei eine Rolle zu spielen. Allerdings konnten aufgrund der kleinen Probenanzahl (sechs Mucinproben) keine definitiven Aussagen getroffen werden. Sollte die Blutgruppenzugehörigkeit oder der Gesundheitszustand tatsächlich einen Einfluss auf die Glykosylierung von Mucinen haben, kann dies den Erfolg von Targeting-Systemen beeinflussen. Ein Kontrastmittel zum Nachweis kolorektaler Neoplasien darf nicht von individuellen Faktoren beeinflusst werden. Deshalb ist ein Testsystem zur Analyse der

unerwünschten Bindung von Kontrastmitteln an Mucine erforderlich, mit dem gleichzeitig viele verschiedene Mucine im Hochdurchsatz überprüft werden können. Das von Olivier etablierte System kann dies nicht leisten, da die Reinigung der Mucine mittels Dichtegradientenzentrifugation zeitaufwendig und kostenintensiv ist und somit in der routinemäßigen Diagnostik keine Anwendung finden kann. Daher wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit der Aufbau eines Kontrastmittel-Mucin-Interaktionstests ausgearbeitet und die dafür benötigten Reagenzien auf ihre Eignung für dieses System untersucht.

Zur Analyse der Interaktion von Kontrastmitteln mit Mucinen im Hochdurchsatz bietet sich ein Festphasen-basiertes Testsystem im „Capture“-Format an, in dem Mucin von an die Mikrotiterplatte gebundenen Mucin-spezifischen monoklonalen Antikörpern direkt aus einer ungereinigten Mukusprobe eingefangen und dann die Bindung einer markierten Kontrastmittelkomponente an das Mucin nachgewiesen wird. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper kann allerdings nur ein bestimmtes Mucin eingefangen werden. Für das Testsystem wurde dafür das im Gastrointestinaltrakt vorkommende MUC5AC ausgewählt, da dieses Mucin auch ein Hauptbestandteil des nasalen Mukus ist (Groneberg et al., 2003) und somit nicht invasiv in ausreichender Menge von vielen Probanden gewonnen werden kann.

Zunächst musste allerdings ein geeignetes Absättigungsreagenz für den anvisierten Interaktionstest gefunden werden, welches keine auch auf Mucinen vorkommenden Glykostrukturen enthält. Bisher verfügbare Reagenzien sind für das geplante Testsystem ungeeignet, weil sie fast immer Kohlenhydratkontaminationen enthalten und so hohe Hintergrundsignale erzeugen können. Olivier (2003) setzte in ihrem System deshalb milde Detergenzien wie Tween 20 in niedriger Konzentration zum Absättigen der Platten ein. Doch auch diese Strategie erwies sich für das neue Testsystem als ungeeignet, da die Detergenzien nicht stark genug an die Platten banden und von stärker bindenden Proteinen der Mukusproben verdrängt wurden (Daten nicht gezeigt). Schließlich fand sich ein geeignetes neuartiges Absättigungsreagenz, welches ein deutlich verbessertes Austauschverhalten als gängige Absättigungsreagenzien zeigt und zudem eine höhere Sensitivität in einem Standard-Immunglobulin-Quantifizierungs-ELISA ermöglicht. Dieses Absättigungsreagenz verfügt aufgrund seiner effektiven Blockierung freier Bindestellen und dabei ermöglichten hohen Sensitivität über ein großes diagnostisch-medizinisches Potential.

Ein Testsystem im „Capture“-Format hat den Vorteil, dass beim Einsatz des einzufangenden Reaktanden im Überschuss immer die gleiche Menge dieses Reaktanden immobilisiert wird und so Vergleichsstudien ermöglicht werden. Da allerdings nicht bekannt ist, wie sich die für das anvisierte Testsystem einzusetzenden Mukusproben verschiedener Spender in ihrer Zusammensetzung unterscheiden und daher auch nicht eingeschätzt werden kann, ob das MUC5AC Mucin immer im Überschuss angeboten wird, muss zunächst die Menge des eingefangenen Mucins quantifiziert werden. Stellt sich bei einer größeren Anzahl an Mukusproben heraus, dass MUC5AC immer im Überschuss vorhanden ist, kann dieser Schritt für Untersuchungen im Hochdurchsatz entfallen. Die Quantifizierung des eingefangenen Mucins kann durch den Nachweis des Proteins mit einem markierten Zweitantikörper gegen MUC5AC und einen mitgeführten Mucin-Standard bekannter Konzentration erfolgen. Hierfür sind also zwei verschiedene monoklonale anti-MUC5AC-Antikörper erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier kommerziell erhältliche anti-MUC5AC-Antikörper getestet, die sich allerdings als ungeeignet für das geplante Testsystem erwiesen. Die Antikörper interagierten miteinander und erzeugten dadurch einen hohen unspezifischen Hintergrund. Laut Herstellerangabe sollen die Antikörper spezifisch ein Epitop des Proteinkerns im humanen MUC5AC Protein erkennen. Da zur Generierung der Antikörper jedoch mit nativem und somit stark glykosyliertem MUC5AC Protein immunisiert wurde, wurde vermutet, dass die Antikörper zusätzlich zum Peptidkern auch Kohlenhydratstrukturen erkennen. Auch viele der anderen kommerziell erhältlichen anti-MUC5AC-Antikörper wurden durch Immunisierung mit nativem Mucin generiert, so dass auch für diese Antikörper eine Erkennung von Kohlenhydraten nicht ausgeschlossen werden kann. Antikörper, die gegen synthetische Peptide aus der „Tandem-Repeat“ Sequenz des Proteinkerns gerichtet sind, sind ebenfalls ungeeignet, da sie aufgrund der starken Glykosylierung in diesen Bereichen das native Mucin nicht erkennen können (Reis et al., 1997). Da die kommerziell erhältlichen Antikörper aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht als vielversprechender Ansatz bewertet werden konnten, wurden selbst Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften generiert.

Um eine gegenseitige Erkennung der Antikörper über ihre eigene Glykosylierung auszuschließen und um von Schwankungen in der Mucinglykosylierung unabhängig zu sein, wurden die für das Testsystem selbst hergestellten monoklonalen Antikörper gegen den Proteinkern des MUC5AC gerichtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Epitope in hydrophilen, voraussichtlich nicht glykosylierten Regionen des MUC5AC Proteins liegen.

Ansonsten besteht die Gefahr, dass die Epitope im nativen MUC5AC durch Kohlenhydrate verdeckt werden. Sind die Epitope gut zugänglich, sollte die Signalstärke im ELISA nur von der Häufigkeit der Epitope im Mucin, nicht aber von der Mucinglykosylierung abhängen.

Die generierten Antikörper, die Mucine unterschiedlicher Probanden aufgrund ihrer Spezifität für nicht glykosylierte Bereiche des Proteinrückgrats gleichermaßen erkennen sollten, zeigten jedoch eine große Signalvariabilität in Abhängigkeit von der Mucinprobe, also vom Spender. Für diese Signalschwankungen könnten verschiedene Ursachen möglich sein:

- 1) Die Amino- und Carboxy-terminalen Bereiche der Proteinkerne von Mucinen sind mit ihrem hohen Anteil an Cystein für die Polymerisierung der Monomere verantwortlich. Durch die Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken entstehen lange lineare Mucinketten (Cornberg et al., 2001). Auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Kohlenhydratseitenketten sind für die Ausbildung der Oligomerstruktur verantwortlich (Carlstedt und Sheehan, 1988; Gum et al., 1992; Bell et al., 1980; Sellers et al., 1988; Dekker et al., 1991). Diese langen Ketten bilden knäuelartige Strukturen (Sheehan et al., 2000, Linden et al., 2008), so dass die jeweiligen Epitope der Antikörper durch Faltungen oder Kohlenhydratstrukturen verdeckt sein könnten (sterische Hinderungen) und so nicht alle Epitope von den Antikörpern gleich gut erreichbar wären.
- 2) Die Mukusproben bestehen aus einer Mischung verschiedener Mucin-Genprodukte (Cornberg et al., 2001) und könnten daher spenderbedingt unterschiedlich viel MUC5AC Protein enthalten. Da nach der Reinigung der Mucine die Gesamtproteinkonzentration bestimmt wurde (Olivier, 2003) und anhand dieser Konzentration eine bestimmte Menge der Proben eingesetzt wurde, könnten die Signalvariabilitäten durch unterschiedliche Mengen MUC5AC verursacht worden sein. Dann sollten aber die unterschiedlichen Antikörper dieselbe Mucinprobe gleich gut erkennen. Doch auch beim Vergleich der Signalintensitäten, welche die Antikörper mit den einzelnen Mucinen gaben, traten große Unterschiede auf. Schwankungen in den eingesetzten MUC5AC-Mengen kommen daher nicht als alleinige Ursache für die Signalvariabilität in Frage.
- 3) Das zur Bestimmung von Glykosylierungsstellen verwendete Computerprogramm sagt 76 % der Glykosylierungsstellen und 93 % der nicht glykosylierten Bereiche

eines Proteins korrekt vorher (Julenius et al, 2005). Daher ist es möglich, dass die zur Erkennung des nativen Mucins durch die Antikörper ausgewählten Epitope oder die in direkter Nachbarschaft liegenden Sequenzbereiche trotz negativer Vorhersage doch glykosyliert sind. Durch die Glykosylierung eines Epitops oder der direkten Nachbarschaft kann dieses für den Antikörper deutlich schlechter zugänglich werden als unglykosylierte Epitopbereiche.

- 4) Auch genetisch bedingte Unterschiede in den Mucinen einzelner Menschen könnten zur beobachteten Signalvariabilität beisteuern. So kann die Größe eines Mucins durch eine variable Anzahl an „Tandem-Repeats“ bei einzelnen Menschen unterschiedlich sein (Linden et al., 2008; van Klinken et al., 1995). Dadurch ist auch das Ausmaß der Glykosylierung eines Mucins individuell verschieden, und dies könnte zu einer unterschiedlich guten Erkennung einzelner Epitope durch die Antikörper führen. Zudem konnten alternatives Spleißen in der MUC1 mRNA und dadurch resultierend zwei unterschiedliche Produkte des *MUC1*-Gens nachgewiesen werden (Ligtenberg et al., 1990; Ligtenberg et al., 1991). Verschiedene Spleiß-Varianten, die sich in ihrer Länge und auch in der Anzahl jeweils vorhandener Epitope unterscheiden können, sind auch für MUC5AC denkbar. Des Weiteren sind individuelle Veränderungen einzelner Epitope des Mucins durch Mutationen im *MUC5AC*-Gen vorstellbar. Dies könnte einen Einfluss auf die Affinität eines Antikörpers zum Epitop haben und würde dadurch auch zu Signalvariabilitäten führen.

Die beobachtete Signalvariabilität zeigt, dass die Zusammensetzung von nasalen Sekreten und allgemein von Mukus sehr komplex und individuell unterschiedlich ist. Daher sind weiterführende Studien notwendig, um die Ursachen für diese Signalschwankungen zu klären und die Zusammensetzung nasaler Sekrete näher zu charakterisieren. Danach sollte es möglich sein zu beurteilen, ob das anvisierte Testsystem zur Analyse der Interaktion von Kontrastmitteln mit Mucin möglich ist oder entsprechend der neuen Erkenntnisse angepasst werden muss und ob die generierten Antikörper in dem anvisierten bzw. angepassten System zum Einsatz kommen können.

7 Literaturverzeichnis

- Allen, A.** (1078). Structure of gastrointestinal mucus glycoproteins and the viscous and gel-forming properties of mucus. *Br Med Bull*; 34 (1): 28-33.
- American Cancer Society** (2008). *Cancer Facts & Figures 2008*. Atlanta: American Cancer Society.
- Batzler, W. U., Giersiepen, K., Hentschel, Husmann, S. G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Kieschke, J., Kraywinkel, K., Meyer, M., Stabenow, R., Stegmaier, C., Bertz, J., Haberland, J., Wolf, U.** (2008). *Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage*. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin.
- Bell, A. E., Allen, A., Morris, E., Rees, D. A.** (1980). The structure of native gastric mucus gel. *Biochem Soc Trans*; 8 (6): 716.
- Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J., Vogelstein, B.** (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*; 327 (6120): 293-7.
- Boyle, P. und Levin, B.** (Hrsg) (2008). *World Cancer Report*. IARC Press. Lyon.
- Carlstedt, I. und Sheehan, J. K.** (1988). Structure and macromolecular properties of mucus glycoproteins. *Monogr Allergy*; 24: 16-24.
- Ceralli, F., Familiari, G., Marinozzi, G., Muccioli-Casadei, D.** (1976). The glycocalyx of the epithelial cells of the colon, observed in normal and ulcerous colitic conditions. *Experientia*; 32 (12): 1542-4.
- Chadée, K., Petri, W. A., Jr., Innes, D. J., Ravdin, J. I.** (1987). Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest*; 80 (5): 1245-54.
- Citarda, F., Tomaselli, G., Capocaccia, R., Barcherini, S., Crespi, M.** (2001). Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut*; 48 (6): 812-5.
- Choi, P. M., Nugent, F. W., Schoetz, D. J., Jr., Silverman, M. L., Haggitt, R. C.** (1993). Colonoscopic surveillance reduces mortality from colorectal cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology*; 105 (2): 418-24.
- Coller, H. A. und Coller, B. S.** (1983). Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality. *Hybridoma*; 2 (1): 91-6.

- Connell, W. R., Lennard-Jones, J. E., Williams, C. B., Talbot, I. C., Price, A. B., Wilkinson, K. H.** (1994). Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology*; 107 (4): 934-44.
- Cornberg, M., Enss, M. L., Wagner, S.** (2001). Differential mucin expression in the gastrointestinal tract. *Z Gastroenterol*; 39 (5): 369-76.
- D'Agostino, R. B.** (1986). Tests for Normal Distribution. In: *Goodness-Of-Fit Techniques*, D'Agostino, R. B. und Stepenes, M. A. (Hrsg.), Macel Decker.
- Dekker, J., Aelmans, P. H., Strous, G. J.** (1991). The oligomeric structure of rat and human gastric mucins. *Biochem J*; 277 (2): 423-7.
- Dietel, M., Suttorp, N., Zeitz, M., Harrison, T. R.** (2005). *Harrisons Innere Medizin*, 16. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag
- Dyduch, A., Karczewska, K., Grzybek, H., Kaminski, M.** (1993). Transmission electron microscopy of microvilli of intestinal epithelial cells in celiac disease in remission and transient gluten enteropathy in children after a gluten-free diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 16 (3): 269-72.
- Eaden, J. A., Abrams, K. R., Mayberry, J. F.** (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*; 48 (4): 526-35.
- Fearon, E. R. und Vogelstein, B.** (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*; 61 (5): 759-67.
- Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W. E., Perucho, M.** (1987). Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*; 327 (6120): 298-303.
- Forstner, J., Taichman, N., Kalnins, V., Forstner, G.** (1973). Intestinal goblet cell mucus: isolation and identification by immunofluorescence of a goblet cell glycoprotein. *J Cell Sci*; 12 (2): 585-602.
- Forstner, J. F. und Forstner, G. G.** (1994). Gastrointestinal mucus. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson, L. R. (Hrsg). New York., Raven Press: 1255-1283.
- Frey, A., Giannasca, K. T., Weltzin, R., Giannasca, P. J., Reggio, H., Lencer, W. I., Neutra, M. R.** (1996). Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med*; 184 (3): 1045-59.
- Frey, A., Di Canzio, J., Zurakowski, D.** (1998). A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods*; 221(1-2): 35-41.

- Frey, A., Meckelein, B., Externest, D., Schmidt, M. A. (2000).** A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods*; 233 (1-2): 47-56.
- Gleich, B., Weizenecker, J. (2005).** Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature*; 435 (7046): 1214-7.
- Gleich, B., Weizenecker, J., Borgert, J. (2008).** Experimental results on fast 2D-encoded magnetic particle imaging. *Phys Med Biol*; 53 (6): N81-4.
- Graser, A., Stieber, P., Nagel, D., Schafer, C., Horst, D., Becker, C. R., Nikolaou, K., Lottes, A., Geisbusch, S., Kramer, H., Wagner, A. C., Diepolder, H., Schirra, J., Roth, H. J., Seidel, D., Goke, B., Reiser, M. F., Kolligs, F. T. (2009).** Comparison of CT colonography, colonoscopy, sigmoidoscopy and faecal occult blood tests for the detection of advanced adenoma in an average risk population. *Gut*; 58 (2): 241-248.
- Groneberg, D. A., Peiser, C., Dinh, Q. T., Matthias, J., Eynott, P. R., Heppt, W., Carlstedt, I., Witt, C., Fischer, A., Chung, K. F. (2003).** Distribution of respiratory mucin proteins in human nasal mucosa. *Laryngoscope*; 113 (3): 520-4.
- Gum, J. R., Jr., Hicks, J. W., Toribara, N. W., Rothe, E. M., Lagace, R. E., Kim, Y. S. (1992).** The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J Biol Chem*; 267 (39): 21375-83.
- Hees, H. und Sinowatz, F. (2000).** Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 3. überarbeitete Auflage, Deutscher Ärzteverlag Köln.
- Ito, S. (1965).** The enteric surface coat on cat intestinal microvilli. *J Cell Biol*; 27 (3): 475-91.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., Brunak, S. (2005).** Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*; 15 (2): 153-64.
- Karlen, P., Kornfeld, D., Brostrom, O., Lofberg, R., Persson, P. G., Ekblom, A. (1998).** Is colonoscopic surveillance reducing colorectal cancer mortality in ulcerative colitis? A population based case control study. *Gut*; 42 (5): 711-4.
- Kato, T. und Owen, R. L. (1994).** Absence of EGF receptors and of EGF uptake in Peyer's patch dome epithelium. *Adv Exp Med Biol*; 355: 295_301.
- Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K. (1979).** A New Mouse Myeloma Cell Line that Has Lost Immunoglobulin Expression but Permits the Construction of Antibody-Secreting Hybrid Cell Lines. *J Immunol*; 123: 1548-1550.

- Köhler**, G. und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*; 256 (5517): 495-7.
- Kyte**, J., Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*; 157 (1): 105-32.
- Laemmli**, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227(5259): 680-685.
- Lake**, A. M., Bloch, K. J., Sinclair, K. J., Walker, W. A. (1980). Anaphylactic release of intestinal goblet cell mucus. *Immunology*; 39 (2): 173-8.
- Lencer**, W. I., Delp, C., Neutra, M. R., Madara, J. L. (1992). Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: role of vesicular traffic. *J Cell Biol*; 117 (6): 1197-1209.
- Lieberman**, D. A. und Weiss, D. G. (2001). One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. *N Engl J Med*; 345 (8): 555-60.
- Ligtenberg**, M. J., Vos, H. L., Gennissen, A. M., Hilkens, J. (1990). Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem*; 265 (10): 5573-8.
- Ligtenberg**, M. J., Gennissen, A. M., Vos, H. L., Hilkens, J. (1991). A single nucleotide polymorphism in an exon dictates allele dependent differential splicing of episialin mRNA. *Nucleic Acids Res*; 19 (2): 297-301.
- Linden**, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V., McGuckin, M. A. (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology*; 1 (3): 183-97.
- Lockwood**, J. S. und Randall, H. T. (1949). The place of electrolyte studies in surgical patients. *Bull N Y Acad Med*; 25: 228-239.
- Lowry**, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193(1): 265-275.
- Magnusson**, K. E. und Stjernstrom, I. (1982). Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (SIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes. *Immunology*; 45 (2): 239-48.
- Maury**, J., Nicoletti, C., Guzzo-Chambraud, L., Maroux, S. (1995). The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization. *Eur J Biochem*; 228 (2): 323-31.

- Maury, J., Bernadac, A., Rigal, A., Maroux, S. (1995).** Expression and glycosylation of the filamentous brush border glycocalyx (FBBG) during rabbit enterocyte differentiation along the crypt-villus axis. *J Cell Sci*; 108 (Pt 7): 2705-13.
- McDaniel, R. V., Sharp, K., Brooks, D., McLaughlin, A. C., Winiski, A. P., Cafiso, D., McLaughlin, S. (1986).** Electrokinetic and electrostatic properties of bilayers containing gangliosides GM1, GD1a, or GT1. Comparison with a nonlinear theory. *Biophys J*; 49 (3): 741-52.
- Miyaki, M., Iijima, T., Kimura, J., Yasuno, M., Mori, T., Hayashi, Y., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., Kuroki, T. (1999).** Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res*; 59 (18): 4506-9.
- Moser, A. R., Pitot, H. C., Dove, W. F. (1990).** A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*; 247 (4940): 322-4.
- Mowat, A. M. (2003).** Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*; 3 (4): 331-341.
- Muller, A. D. und Sonnenberg, A. (1995).** Protection by endoscopy against death from colorectal cancer. A case-control study among veterans. *Arch Intern Med*; 155 (16): 1741-8.
- Neutra, M. R., Grand, R. J., Trier, J. S. (1977).** Glycoprotein synthesis, transport, and secretion by epithelial cells of human rectal mucosa: normal and cystic fibrosis. *Lab Invest*; 36 (5): 535-46.
- Neutra, M. R., O'Malley, L. J., Specian, R. D. (1982).** Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues. *Am J Physiol*; 242 (4): G380-7.
- Neutra, M. R., Phillips, T. L., Mayer, E. L., Fishkind, D. J. (1987).** Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res*; 247 (3): 537-46.
- Neutra, M. R. und Kraehenbuhl, J. P. (1992).** Transepithelial transport and mucosal defence I: the role of M cells. *Trends Cell Biol*; 2 (5): 134-8.
- Neutra, M. R., Frey, A., Kraehenbuhl, J. P. (1996).** Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*; 86(3): 345-348.
- Newcomb, P. A., Norfleet, R. G., Storer, B. E., Surawicz, T. S., Marcus, P. M. (1992).** Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst*; 84 (20): 1572-5.

- Oakley**, B. R., Kirsch, D. R., Morris, N. R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*; 105 (2): 361-3.
- O'Connell**, J. B., Maggard, M. A., Ko, C. Y. (2004). Colon Cancer Survival Rates With the New American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging. *J Natl Cancer Inst*; 96 (19): 1420-5.
- Olivier**, V. (2003). Optimierung eines partikulären M-Zell-Targeting-Systems und Analyse der Interaktion von Targeting-Liganden mit intestinalen und nasalen Mucinen. Dissertation, Universität Münster.
- Owen**, R. L. (1999). Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches - a personal and historical perspective. *Semin Immunol* ; 11 (3): 157-163.
- Pappo**, J. und Ermak, T. H. (1989). Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin Exp Immunol*; 76 (1): 144-8.
- Phalipon**, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J. P., Edelman, L., Sansonetti, P. J., Corthesy, B. (2002). Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion *in vivo*. *Immunity*; 17 (1): 107-15.
- Podolsky**, D. K. und Isselbacher, K. J. (1983). Composition of human colonic mucin. Selective alteration in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*; 72 (1): 142-53.
- Podolsky**, D. K. (1985). Oligosaccharide structures of human colonic mucin. *J Biol Chem*; 260 (14): 8262-71.
- Poley**, J. R. (1988). Loss of the glycocalyx of enterocytes in small intestine: a feature detected by scanning electron microscopy in children with gastrointestinal intolerance to dietary protein. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 7 (3): 386-94.
- Porta**, C., James, P. S., Phillips, A. D., Savidge, T. C., Smith, M. W., Cremaschi, D. (1992). Confocal analysis of fluorescent bead uptake by mouse Peyer's patch follicle-associated M cells. *Exp Physiol*; 77 (6): 929-32.
- Powell**, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*; 359 (6392): 235-7.
- Reis**, C. A., David, L., Nielsen, P. A., Clausen, H., Mirgorodskaya, K., Roepstorff, P., Sobrinho-Simoes, M. (1997). Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody. *Int J Cancer*; 74 (1): 112-21.

- Ritter**, M. A. und Ladyman, H. M. (1995). Monoclonal Antyodies: Production, engineering and clinical application. Cambridge university Press.
- Rothbaum**, R. J., Partin, J. C., Saalfield, K., McAdams, A. J. (1983). An ultrastructural study of enteropathogenic Escherichia coli infection in human infants. *Ultrastruct Pathol*; 4 (4): 291-304.
- Sajjan**, S. U. und Forstner, J. F. (1990). Characteristics of binding of Escherichia coli serotype O157:H7 strain CL-49 to purified intestinal mucin. *Infect Immun*; 58 (4): 860-7.
- Sajjan**, S. U. und Forstner, J. F. (1990). Role of the putative "link" glycopeptide of intestinal mucin in binding of piliated Escherichia coli serotype O157:H7 strain CL-49. *Infect Immun*; 58 (4): 868-73.
- Schmid**, M., Haaf, T., Grunert, D. (1984). 5-Azacytidine-induced undercondensations in human chromosomes. *Hum Genet*; 67 (3): 257-63.
- Schmiegel**, W., Reinacher-Schick, A., Arnold, D., Graeven, U., Heinemann, V., Porschen, R., Riemann, J., Rodel, C., Sauer, R., Wieser, M., Schmitt, W., Schmoll, H. J., Seufferlein, T., Kopp, I., Pox, C. (2008). Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Z Gastroenterol*; 46 (8): 799-840.
- Selby**, J. V., Friedman, G. D., Quesenberry, C. P., Jr., Weiss, N. S. (1992). A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med*; 326 (10): 653-7.
- Sellers**, L. A., Allen, A., Morris, E. R., Ross-Murphy, S. B. (1988). Mucus glycoprotein gels. Role of glycoprotein polymeric structure and carbohydrate side-chains in gel-formation. *Carbohydr Res*; 178: 93-110.
- Sheehan**, J. K., Brazeau, C., Kutay, S., Pigeon, H., Kirkham, S., Howard, M., Thornton, D. J. (2000). Physical characterization of the MUC5AC mucin: a highly oligomeric glycoprotein whether isolated from cell culture or in vivo from respiratory mucous secretions. *Biochem J*; 347 (1): 37-44.
- Smith**, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 150(1): 76-85.
- Smith**, R. A., Cokkinides, V., Brawley, O. W. (2009). Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*; 59 (1): 27-41.

- Specian, R. D. und Neutra, M. R. (1980).** Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J Cell Biol*; 85 (3): 626-40.
- Specian, R. D. und Neutra, M. R. (1981).** The surface topography of the colonic crypt in rabbit and monkey. *Am J Anat*; 160 (4): 461-72.
- Specian, R. D. und Neutra, M. R. (1982).** Regulation of intestinal goblet cell secretion. I. Role of parasympathetic stimulation. *Am J Physiol*; 242 (4): G370-9.
- Specian, R. D. und Oliver, M. G. (1991).** Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol*; 260 (2 Pt 1): C183-93.
- Stenling, R., Fredrikzon, B., Engberg, S., Falkmer, S. (1984).** Surface ultrastructure of the small intestine mucosa in children with celiac disease. I. Untreated disease and effects of long-term gluten elimination and challenge. *Ultrastruct Pathol*; 6 (4): 295-305.
- Stewart, B. W. und Kleihus, P. (Hrsg) (2003).** World Cancer Report. IARC Press. Lyon.
- Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A., Dove, W. F. (1992).** Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*; 256 (5057): 668-70.
- Towler, B., Irwig, L., Glasziou, P., Kewenter, J., Weller, D., Silagy, C. (1998).** A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *Bmj*; 317 (7158): 559-65.
- Van Klinken, B. J., Dekker, J., Buller, H. A., Einerhand, A. W. (1995).** Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am J Physiol*; 269 (5 Pt 1): G613-27.
- Variyam, E. P. und Hoskins, L. C. (1981).** Mucin degradation in human colon ecosystems. Degradation of hog gastric mucin by fecal extracts and fecal cultures. *Gastroenterology*; 81 (4): 751-8.
- Vogel, T., Driemel, C., Hauser, A., Hansmann, A., Lange, S., Jonas, M. Möslein, G. (2005).** Vergleich verschiedener Stuhltests zur Detektion von Neoplasien des Kolon. *Dtsch Med Wochenschr*; 130 (14):872-7.
- Wasan, H. S., Novelli, M. Bee, J. Bodmer, W. F. (1997).** Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94 (7): 3308-13.
- Wesley, A., Mantle, M., Man, D., Qureshi, R., Forstner, G., Forstner, J. (1985).** Neutral and acidic species of human intestinal mucin. Evidence for different core peptides. *J Biol Chem*; 260 (13): 7955-9.

Winawer, S. J., Zauber, A. G., Ho, M. N., O'Brien, M. J., Gottlieb, L. S., Sternberg, S. S., Waye, J. D., Schapiro, M., Bond, J. H., Panish, J. F. et al. (1993). Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*; 329 (27): 1977-81.

Winawer, S. J., Fletcher, R. H., Miller, L., Godlee, F., Stolar, M. H., Mulrow, C. D., Woolf, S. H., Glick, S. N., Ganiats, T. G., Bond, J. H., Rosen, L., Zapka, J. G., Olsen, S. J., Giardiello, F. M., Sisk, J. E., Van Antwerp, R., Brown-Davis, C., Marciniak, D. A., Mayer, R. J. (1997). Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology*; 112 (2): 594-642.

7 Anhang

7.1 Aminosäuresequenzabschnitte des humanen MUC5AC Proteins

Dargestellt sind die Sequenzabschnitte des humanen MUC5AC (Swiss-Prot Accession No. CAA04738 und CAC83674), aus denen die vier zur Immunisierung eingesetzten Peptide (unterstrichen) ausgewählt wurden.

CAC83674

```

1 msvgrrrklal lwalalalac trhtghaqdg ssesykhhp alspiargps gvplrgatvf
61 pslrtipvvr asnpahngrv cstwgsfhyk tfdgdvfrfp glcnyvfseh cgaayedfni
121 qlrrsqesaa ptlsrvlmkv dgvviiqltkg svlvnghpvl lpfsqsgvli qqsssytkve
181 arlgvlmw n hddslleld tkyanktcgl cgdfngmpvv sellshntkl tpmefgnlqk
241 mddpteqcqd pvpeprncs tfggiceell hgqlfsgcva lvdvgsylea crqdlcfced
301 tdllscvcht laeysrqcth agglpqdwrg pdfcpqkcpn nmqyhecrsp cadtcsnqeh
361 sracedhcva gcfcpegtvl ddigqtgcvp vskcacv yng aayapgatys tdctnctcsg
421 grwscqevpc pdtcsvlgga hfstfdgkqy tvhgdcsvyl tkpcdssaft vlaelrrcgl
481 tdsetclksv tisl dgaqtv vvikasgevf lnqiytqlpi saanvtifrp stffiiiaqts
541 lglqlnlqpv ptmq lfmqla pklrgqt cgl cgnfnsiqad dfrtlsgvve ataaaffntf
601 ktqaacpnir nsfedpcsls venekyaqhw csq ltdadgp fgrchaavkp gtyysncvfd
661 tcncersedc lcaalssyv h acaakgvqlg gwr dgvctkp mttc pksmt y hyhvstc qpt
721 crslsegdit csvgfipvdg cicpkgtfld dtgkcvqasn cpcyhrsgmi pngesvhdsg
781 aictcthgkl sciggqapap vcaapmvffd crnatpgdtg agc qkscht l dmtcyspqcv
841 pgvcvcdglv adgeggcita edcpcvhnea syragqtirv gcntctcdsr mwrctddpcl
901 atcavygdgh yltfdgqsys fngdceytlv qnhcggkdst qdsfrvvt en vpcgttgttc
961 skaikiflgg felklshgkv evigt desqe vpytiqqmgi ylvvdtdigl vllwdkkti si
1021 finlspefk g rvcglcgnfd diavndfatr srsvvgdvle fgns wklsp s cpdalapkdp
1081 ctanpfrksw aqkqcsilhg ptfaachahv eparyyeacv ndacacds g dcecfctava
1141 ayaqachevg lcvclrtpsi cplfcdyynp egqcewhyqp cgvpclrtcr nprgdclrdv
1201 rglegcypkc ppeapifded kmqcvatcpt pplpprchvh gksyrpgavv psdkncqsc l
1261 ctergvecty kaeacvctyn gqrfhpgdvi yhttdgtggc isarcgangt ierrvypcsp
1321 ttpvppttfs fstpplvss tht pnsngpss ahtgppssaw pttagtsprt rlptasasl p
1381 pvcgekclws p wmdvsrpgr gtdsgdfdtl enrahgyrv cesprsv ecr aedapgvplr
1441 algqrvqcsp dvgltcrnre qasglcynyq irvqcctplp cstssspaqt tppttskte
1501 trasgssaps stpgtvs l st arttpapgta tsvkktfstp s pppvpatst ssmsttapgt
1561 svvsskptpt epstssclqe lctwtewidg sypapgingg dfdtfqnlrd egytfcespr
1621 svqcraesfp ntpladlgqd vicshtegli clnknqlppi cynyeiriqc cetvnvcrdi
1681 trlpktvatt rptphptgaq tqttftthmp sasteqptat srggptatsv tqgthttlv t
1741 rnchprctwt kwfdvdfpsp gphggdkety nniirsgeki crrpeeitrv qcra kshpev
1801 siehlqgvvq csreeglvcr nqdqqgpfkm clnyevrvlc cetprgchmt stpgstsssp
1861 aqttpsttsk tteiqasgss apsstpgtvs lstarttpap gtatsvkktf stpsppvp a
1921 tstssmstta pgtsvvsskp tptepstssc lqelctwew idgsypapgi nggdfdtfq n
1981 lrdegytfce sprsvqcrae sfpntplgrl gqdvicshte gliclnknql ppicynyeir
2041 iqccetvnvc rditrppktv attrptphpt gaqtqttftt hmpsasteqp tatsrggp ta
2101 tsvtqgthtt pvtrnchprc twttwfdvdf pspgphggdk etynniirsg ekicrrpee i
2161 trlqcraksh pevsiehlqg vvqcsreegl vcrnqdqqgp fkmclnievr vlccetpkgc
2221 pvtstpv tap stpsgraisp tqstsswqks rtttlvttst tstpqtstty ahttsttsap
2281 tarttsaptt sttsvpttst isgpkttpsp vpttsttsaa ttstisaptt sttsvpgttp
2341 spvlttstts apttrttsas pagtts gpgn tpsvppttst isapttstts apttsttsap
2401 tsstts gpgt tpsvppttsi tsapttstts apttsttsap ttsttsap

```

CAA04738

```

1  ttsttsaptt sttsgpgttp spvpttsttp vsktstshls vsktthsqpv tsdchplcaw
61 tkwfdvdfps pgphggdket ynniirsgek icrrpeeitr lqcraeshpe vniehlgqvv
121 qcsreeglvc rnqdqqgpfk mclnyevrvl ccetprgcpv tsvtpygtsp tnalypslst
181 smvsasvast svasssvass svaystqtcf cnvadrlypa gstiyrhrdl aghcyalcs
241 qdcqvrvrgvd sdcpsttllp apatspsist sepvtelgcp navpprkke twatpncsea
301 tcegnnvisl sprtcprvek ptcangypav kvadqdgch hyqcqcvcsg wgdphyitfd
361 gtyytfldnc tyvlvqqivp vyghfrvlvd nyfcgaedgl scprsiiley hqdrvltrk
421 pvhgvmtnei ifnnkvvspg frkngivvsr igvkmypatip elgvqvmfsg lifsvevpfs
481 kfanntegqc gtctndrkde crtprgtvva scsemglwn vsipdqpack rphptpttvg
541 pttvgsttvg pttvgsttvg pttppapclp spicqlilsk vfepchtvip pllfyegcvf
601 drchmtdldv vcssleryaa lcashdicid wrgrtghmcp ftcpadkvyq pcgpsnpsyc
661 ygndsaslga lreagpitem cfcpegmtlf ttsaqvcvpt gcprclgphg epkvghtvg
721 mdcqectcea atwtltcrpk lclppacpl pgfvpvpaap qagqccpqys cacntsrca
781 pvgcpegara iptyqegacc pvqncswtvc singtlyqpg avssslcet crcelpggpp
841 sdafvvcet qicnthcpvg feyqeqsgqc cgtcvqvacy tntskspahl fypgetwsda
901 gnhcvtthqce khqdgllvvt tkkacpplsc sldearmskd gccrfcpppp ppyqngstca
961 vyhrsliiqq qgcsssepvr laycrgncgd ssmyslegn tvehrcqccq elrtslrnt
1021 lhctdgssra fsyteveecg cmgrrcpapg dtqhseeaep epsqeaesgs wergvpvpsm
1081 h

```

7.2 Einzelwerte der vermessenen Glykocalyx-Höhe

Aufgelistet sind die gemessenen Einzelwerte der Glykocalyx-Höhe auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von gesunder humaner Darmschleimhaut des Kolons und des Ileums.

Kolon

Patient Nr.	Negativ Nr.	Glykocalyx-Höhe [nm]				
		Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5
1	KW033 / Vo 321	1238	1429	1539	1612	1698
	KW033 / Vo 322	1342	1449	1359	1186	1264
	KW034 / Vo 697	879	983	1012	845	1230
	KW034 / Vo 699	833	842	843	844	967
	KW036 / Vo 158	883	920	747	759	884
	KW036 / Vo 159	1047	855	1179	1120	1585
2	KW054 / Vo 325	1076	798	759	811	890
	KW056 / Vo 236	333	421	1250	1080	1344
	KW056 / Vo 237	539	554	561	860	718
	KW057 / Vo 234	1289	1215	1388	1241	887
	KW057 / Vo 235	1110	1161	1192	1255	1380
3	KW1213 / Vo 248	971	931	1128	1261	1011
	KW1233 / Vo 789	1311	1023	1000	1163	953
	KW1233 / Vo 791	1465	1084	1000	801	1210
5	KW1507 / Vo 37	1658	1919	1443	1528	1519
	KW1507 / Vo 38	1626	1879	1535	1459	1579
	KW1510 / Vo 39	1737	1743	1753	1697	1866
	KW1510 / Vo 40	1854	1976	1552	1906	1847
	KW1511 / Vo 41	2334	2503	2082	1901	1652
	KW1511 / Vo 42	1407	1521	1420	1444	1466

Kolon (Fortsetzung)

Patient Nr.	Negativ Nr.	Glykocalyx-Höhe [nm]				
		Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5
7	KW1552 / Vo 232	1753	1818	1832	1749	1764
	KW1552 / Vo 233	1681	2096	2235	1623	1341
	KW1555 / Vo 228	1673	1965	2215	2256	1958
	KW1555 / Vo 229	2038	1756	1797	1588	1483
	KW1558 / Vo 230	1879	1794	1096	1023	1475
	KW1558 / Vo 231	1540	1570	1626	1927	1677
8	KW1565 / Vo 43	1344	1476	1502	1529	1501
	KW1565 / Vo 44	1397	1438	1601	1535	1611
	KW1569 / Vo 45	1053	1054	1071	854	1131
	KW1569 / Vo 46	1179	1069	1147	1194	1255
	KW1574 / Vo 338	1761	1640	1988	1991	1742
	KW1574 / Vo 339	1557	1406	1401	1389	1619
9	KW1597 / Vo 267	1497	1175	1027	1120	1104
11	KW1666 / Vo 453	1016	935	385	557	714
	KW1666 / Vo 454	756	837	895	871	804
	KW1667 / Vo 455	953	1014	1038	1034	1216
	KW1667 / Vo 457	1119	1202	1000	958	1062
	KW1671 / Vo 458	1020	1036	964	1021	1089
	KW1671 / Vo 459	583	272	401	777	917
13	KW1703 / Vo 451	1306	1430	1294	1371	1340
	KW1703 / Vo 452	1029	1018	1115	1333	1293
	KW1705 / Vo 49	1028	1322	1548	1961	2044
	KW1705 / Vo 50	1268	1277	1347	1088	1149
	KW1716 / Vo 52	1192	945	1103	973	1015
	KW1716 / Vo 53	1356	1312	1466	1465	1372
14	KW1727 / Vo 256	1526	1621	1541	1608	1637
	KW1727 / Vo 257	1683	1563	1771	1659	1393
	KW1730 / Vo 258	1532	1467	1416	1492	1551
	KW1730 / Vo 259	1491	1482	1625	1619	1597
	KW1732 / Vo 260	1986	1777	1480	1505	1243
	15	KW1763 / Vo 294	763	558	448	533
16	KW1787 / Vo 313	1396	1401	1451	1422	1345
	KW1787 / Vo 314	1337	1474	1425	1688	1496
	KW1790 / Vo 316	929	983	1177	1297	1256
	KW1792 / Vo 317	1178	1066	999	1016	1176
	KW1792 / Vo 318	1046	1207	1213	1264	1228

Ileum

Patient Nr.	Negativ Nr.	Glykocalyx-Höhe [nm]				
		Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5
1	KW037 / Vo 164	349	321	313	420	240
	KW037 / Vo 165	0	0	0	0	0
	KW038 / Vo 166	294	223	265	257	230
	KW038 / Vo 168	206	229	326	286	262
	KW039 / Vo 844	172	164	199	162	315
	KW039 / Vo 845	216	182	160	203	204
2	KW058 / Vo 172	179	187	223	256	201
	KW058 / Vo 173	258	303	357	291	273
	KW059 / Vo 319	190	109	231	192	127
	KW059 / Vo 846	311	172	210	219	201
	KW062 / Vo 174	176	223	208	189	198
	KW062 / Vo 175	200	255	196	148	193
3	KW1228 / Vo 330	255	338	181	226	156
	KW1228 / Vo 331	296	354	350	301	219
	KW1230 / Vo 787	195	193	195	236	182
	KW1230 / Vo 788	194	216	181	180	127
9	KW1604 / Vo 275	376	363	337	360	321
	KW1604 / Vo 276	246	260	255	296	261
	KW1607 / Vo 279	296	249	257	220	257
	KW1607 / Vo 280	298	242	240	237	281
	KW1608 / Vo 281	237	289	270	277	302
	KW1608 / Vo 282	252	332	398	219	209
10	KW1629 / Vo 272	108	108	168	146	129
	KW1629 / Vo 274	147	197	167	125	204
11	KW1673 / Vo 460	312	325	228	296	341
	KW1673 / Vo 461	342	191	235	252	236
	KW1675 / Vo 462	309	292	230	295	337
	KW1675 / Vo 463	212	206	214	238	311
	KW1676 / Vo 464	197	140	230	199	237
	KW1676 / Vo 465	166	208	208	214	164

7.3 Einzelwerte zum Glykocalyxbedeckungsgrad

Aufgelistet ist die jeweils gemessene Länge der luminalen Plasmamembran mit intakter bzw. fehlender Glykocalyx auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von gesunder humaner Darmschleimhaut des Kolons und des Ileums, sowie von Adenokarzinomen, Polypen und dem *Carcinoma in situ*.

gesundes Kolongewebe

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
1	KW033 / Vo 321	13,165	0,000
	KW033 / Vo 322	8,891	0,000
	KW034 / Vo 697	6,353	0,000
	KW034 / Vo 699	3,995	0,000
	KW036 / Vo 158	5,887	4,293
	KW036 / Vo 159	14,445	12,570
2	KW054 / Vo 325	8,298	0,000
	KW056 / Vo 236	8,655	5,446
	KW056 / Vo 237	4,029	6,214
	KW057 / Vo 234	6,365	0,000
	KW057 / Vo 235	8,477	0,000
3	KW1213 / Vo 248	4,262	4,956
	KW1213 / Vo 249	0,000	6,397
	KW1233 / Vo 789	9,198	0,000
	KW1233 / Vo 791	7,972	0,000
5	KW1507 / Vo 37	8,397	0,000
	KW1507 / Vo 38	7,947	0,000
	KW1510 / Vo 39	6,331	0,000
	KW1510 / Vo 40	7,144	0,000
	KW1511 / Vo 41	8,759	0,000
	KW1511 / Vo 42	8,887	0,000
7	KW1552 / Vo 232	14,385	0,000
	KW1552 / Vo 233	10,502	0,000
	KW1555 / Vo 228	10,454	0,000
	KW1555 / Vo 229	14,218	0,000
	KW1558 / Vo 230	18,539	0,000
	KW1558 / Vo 231	8,022	0,000
8	KW1565 / Vo 43	6,715	0,000
	KW1565 / Vo 44	5,322	0,000
	KW1569 / Vo 45	2,796	4,913
	KW1569 / Vo 46	8,107	0,000
	KW1574 / Vo 338	16,082	0,000
	KW1574 / Vo 339	8,400	0,000
9	KW1595 / Vo 264	0,000	9,655
	KW1596 / Vo 265	0,000	11,705
	KW1596 / Vo 266	0,000	13,085
	KW1597 / Vo 267	10,282	4,208

gesundes Kolongewebe (Fortsetzung)

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
11	KW1666 / Vo 453	2,873	5,230
	KW1666 / Vo 454	8,659	0,000
	KW1667 / Vo 455	6,630	0,000
	KW1667 / Vo 457	10,115	0,000
	KW1671 / Vo 458	6,379	0,000
	KW1671 / Vo 459	0,756	11,726
13	KW1703 / Vo 451	5,451	0,000
	KW1703 / Vo 452	8,551	0,000
	KW1705 / Vo 49	11,487	0,000
	KW1705 / Vo 50	6,902	0,000
	KW1716 / Vo 52	5,967	1,908
	KW1716 / Vo 53	8,064	0,000
14	KW1727 / Vo 256	6,574	0,000
	KW1727 / Vo 257	13,621	0,000
	KW1730 / Vo 258	6,598	0,000
	KW1730 / Vo 259	7,179	3,218
	KW1732 / Vo 260	9,736	0,000
	KW1732 / Vo 261	0,000	4,994
15	KW1763 / Vo 294	6,312	8,976
	KW1763 / Vo 295	0,000	10,099
	KW1766 / Vo 296	0,000	6,175
	KW1766 / Vo 297	0,000	13,196
	KW1767 / Vo 298	0,000	13,132
	16	KW1787 / Vo 313	6,293
KW1787 / Vo 314		9,652	0,000
KW1790 / Vo 316		7,769	0,000
KW1792 / Vo 317		8,957	0,000
KW1792 / Vo 318		10,059	0,000

gesundes Ileumgewebe

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
1	KW037 / Vo 164	17,747	0,000
	KW037 / Vo 165	0,000	18,391
	KW038 / Vo 166	19,819	0,000
	KW038 / Vo 168	7,906	0,000
	KW039 / Vo 844	6,620	0,000
	KW039 / Vo 845	7,855	0,000
2	KW058 / Vo 172	13,242	0,000
	KW058 / Vo 173	10,247	0,000
	KW059 / Vo 319	14,215	1,005
	KW059 / Vo 846	10,971	0,000
	KW062 / Vo 174	49,867	0,000
	KW062 / Vo 175	8,005	0,000
3	KW1228 / Vo 330	22,077	0,000
	KW1228 / Vo 331	7,738	0,000
	KW1230 / Vo 787	3,380	0,000
	KW1230 / Vo 788	3,332	0,631

gesundes Ileumgewebe (Fortsetzung)

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
9	KW1604 / Vo 275	12,375	0,000
	KW1604 / Vo 276	6,270	0,000
	KW1607 / Vo 279	6,552	0,000
	KW1607 / Vo 280	11,540	0,000
	KW1608 / Vo 281	9,728	0,000
	KW1608 / Vo 282	7,944	0,000
10	KW1629 / Vo 272	2,992	2,074
	KW1629 / Vo 274	9,118	1,331
11	KW1673 / Vo 460	10,951	0,000
	KW1673 / Vo 461	5,182	0,000
	KW1675 / Vo 462	7,465	0,000
	KW1675 / Vo 463	6,116	0,000
	KW1676 / Vo 464	8,230	0,000
	KW1676 / Vo 465	5,224	0,000

Adenokarzinome

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
1	KW029 / Vo 816	0,000	7,814
	KW029 / Vo 817	0,000	9,674
	KW032 / Vo 814	0,000	10,052
	KW032 / Vo 815	0,000	8,172
	KW044 / Vo 169	0,000	17,624
	KW044 / Vo 171	0,000	7,934
2	KW049 / Vo 332	0,000	15,487
	KW049 / Vo 333	0,000	10,213
	KW051 / Vo 849	0,000	11,543
	KW052 / Vo 323	0,000	16,341
	KW052 / Vo 856	0,000	7,668
3	KW1216 / Vo 241	0,000	8,594
	KW1216 / Vo 242	0,000	18,199
	KW1218 / Vo 326	0,000	13,495
	KW1218 / Vo 327	0,000	9,063
	KW1221 / Vo 320	0,000	20,250
	KW1221 / Vo 823	0,000	13,140
7	KW1544 / Vo 219	3,403	23,729
	KW1544 / Vo 221	0,000	14,942
	KW1548 / Vo 223	0,000	14,082
	KW1548 / Vo 225	0,000	7,355
	KW1550 / Vo 227	0,000	7,035
9	KW1589 / Vo 241	0,545	9,180
	KW1589 / Vo 242	0,000	11,058
	KW1592 / Vo 261	0,000	12,562
	KW1592 / Vo 262	0,000	10,954
	KW1594 / Vo 243	0,000	14,729
	KW1594 / Vo 245	0,000	11,378

Adenokarzinome (Fortsetzung)

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
10	KW1611 / Vo 255	0,000	6,268
	KW1611 / Vo 256	0,000	15,503
	KW1613 / Vo 247	0,000	15,193
	KW1613 / Vo 248	0,000	8,643
	KW1614 / Vo 249	0,000	11,653
	KW1614 / Vo 251	0,000	8,752
11	KW1657 / Vo 23	0,000	6,507
	KW1657 / Vo 24	1,254	9,436
	KW1658 / Vo 466	1,304	13,247
	KW1658 / Vo 467	12,066	2,882
	KW1661 / Vo 470	8,436	6,716
	KW1661 / Vo 471	9,747	0,000
14	KW1719 / Vo 250	0,000	20,351
	KW1719 / Vo 251	0,000	7,854
	KW1724 / Vo 252	0,000	8,242
	KW1724 / Vo 253	0,000	17,711
	KW1735 / Vo 254	0,000	14,995
	KW1735 / Vo 255	0,000	10,218
15	KW1758 / Vo 288	0,000	8,438
	KW1758 / Vo 289	0,000	15,830
	KW1759 / Vo 290	0,000	7,866
	KW1759 / Vo 291	0,000	16,627
	KW1760 / Vo 292	0,000	8,015
	KW1760 / Vo 293	0,000	15,001
16	KW1780 / Vo 307	0,000	7,915
	KW1780 / Vo 308	0,000	12,751
	KW1782 / Vo 309	0,000	12,600
	KW1782 / Vo 310	0,000	9,041
	KW1786 / Vo 311	0,000	12,559
	KW1786 / Vo 312	0,000	7,633

Polypen

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
3	KW1202 / Vo 238	0,000	15,729
	KW1202 / Vo 239	0,000	8,283
	KW1204 / Vo 850	0,000	10,730
	KW1204 / Vo 853	0,000	22,985
	KW1205 / Vo 854	0,000	10,335
	KW1205 / Vo 855	0,000	10,650
9	KW1578 / Vo 234	0,000	14,030
	KW1578 / Vo 235	0,000	8,104
	KW1580 / Vo 237	0,000	27,857
	KW1580 / Vo 238	0,000	10,443
	KW1583 / Vo 128	0,000	8,982
	KW1583 / Vo 129	0,000	12,905

Polypen (Fortsetzung)

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
11	KW1642 / Vo 25	2,106	6,120
	KW1642 / Vo 26	1,201	12,699
	KW1644 / Vo 29	0,000	12,776
	KW1644 / Vo 30	0,000	7,591
	KW1645 / Vo 11	4,929	15,779
	KW1645 / Vo 12	5,297	6,110
15 (1)	KW1737 / Vo 262	0,000	11,272
	KW1737 / Vo 263	0,000	24,454
	KW1739 / Vo 271	0,000	15,838
	KW1739 / Vo 272	0,000	6,618
	KW1740 / Vo 273	0,000	8,192
	KW1740 / Vo 274	0,000	14,494
15 (2)	KW1743 / Vo 275	0,000	7,980
	KW1743 / Vo 276	4,774	17,462
	KW1744 / Vo 278	0,000	11,165
	KW1744 / Vo 279	0,000	9,246
	KW1746 / Vo 280	1,350	8,868
	KW1746 / Vo 281	0,000	9,125
15 (3)	KW1749 / Vo 282	0,000	8,059
	KW1749 / Vo 283	0,000	9,589
	KW1750 / Vo 284	0,000	11,918
	KW1750 / Vo 285	0,000	19,949
15 (4)	KW1751 / Vo 336	9,974	3,128
	KW1751 / Vo 337	0,000	7,891
	KW1753 / Vo 334	0,000	15,168
	KW1753 / Vo 335	0,000	10,146
	KW1754 / Vo 286	0,000	10,312
	KW1754 / Vo 287	0,000	10,184
16	KW1772 / Vo 300	0,000	12,130
	KW1772 / Vo 302	3,110	8,992
	KW1773 / Vo 303	0,000	12,784
	KW1773 / Vo 304	0,000	8,196
	KW1774 / Vo 305	0,000	12,666
	KW1774 / Vo 306	1,207	9,149

Carcinoma in situ

Patient Nr.	Negativ Nr.	vorhandene Glykocalyx [μm]	fehlende Glykocalyx [μm]
11	KW1647 / Vo 13	0,000	6,610
	KW1647 / Vo 14	0,000	15,596
	KW1648 / Vo 15	0,000	20,702
	KW1648 / Vo 17	0,000	6,503
	KW1653 / Vo 20	0,000	6,466
	KW1653 / Vo 21	0,000	13,665

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katrin Ramaker, geb. Wehry
Geburtstag/-ort: 24.06.1978, Haselünne

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule in Bookhof
1988 – 1989 Gymnasium Marianum in Meppen
1989 – 1990 Orientierungsstufe in Herzlake
1990 – 1994 Realschule in Herzlake
1994 – 1998 Kreisgymnasium St. Ursula in Haselünne
06/1998 Abitur

Studium

10/1998 – 09/2003 Studium der Diplom-Biologie an der Carl von Ossietzky
Universität Oldenburg mit den Schwerpunkten Biochemie,
Mikrobiologie und Genetik
09/2000 Vordiplom
01/2003 – 09/2003 Diplomarbeit:
Gentoxische Kombinationswirkungen von oxidativem Stress
(induziert durch Wasserstoffperoxid und Glucose-Oxidase)
mit chlorierten Phenolen in humanen Hepatozyten (Hep G2-
Zellen)
29.09.2003 Diplom

Promotion

seit 07/2004 Promotion in der Laborgruppe Mukosaimmunologie am
Forschungszentrum Borstel

Danksagung

Ich bedanke mich bei meiner Referentin Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus für die Prüfungsbetreuung und bei Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder für die Übernahme des Korreferats.

Meinem Betreuer PD Dr. Andreas Frey gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas, die vielen hilfreichen Diskussionen, seine konstruktive Kritik und sein großes Engagement.

Für die produktive Zusammenarbeit mit der Pathologie Borstel danke ich den dortigen Mitarbeitern.

Danke an Steffen und Niels, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen, für ihre engagierte Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die vielen fachlichen Diskussionen und für das Korrekturlesen so mancher Manuskripte.

Dr. Barbara Frey danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für das Korrekturlesen meiner Manuskripte.

Bei Fabian, Hanne, Hans-Heiner, Heidi, Imke, Naho, Niels, Steffen, Thurid und allen Azubis bedanke ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung.

Besonders danken möchte ich Marén, die mir in den letzten Wochen durch viele konstruktive Ratschläge und durch fleißiges Korrekturlesen beim Erstellen meiner Arbeit sehr geholfen hat.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung auf meinem Weg zur Promotion bedanken. Mein größter Dank gilt Gerhard, meinem Schatz, der geduldig die Wochen der Fertigstellung dieser Arbeit miterlebt hat. Danke für deine Liebe und deine Unterstützung!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Norderstedt, den 15.05.2009

Katrin Ramaker