



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

LEKTINBINDUNGSSTUDIE AN UROTHELZELLEN

verfasst von / submitted by

Ariane Foadi

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

a.o.Univ.Prof.Mag.Dr. Michael Wirth

Abstract / Zusammenfassung

Lektinbindungsstudie an Urothelzellen

Spezifische Interaktionen von Lektinen mit der Glykokalyx der urothelialen Zelloberfläche können eine zielgerichtete Methode in der intravesikalen Blasenkrebstherapie darstellen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Versuche mit dem Ziel durchgeführt, Lektine an die Oberfläche von Blasenurothelzellen zu binden. Es wurde erwartet, dass hier ein Unterschied in dem Lektinbindungspotential zwischen gesunden und erkrankten Blasenurothelzellen auftritt. Um dies methodisch zu belegen, wurden fluoreszenzmarkierte Lektine (WGA, PNA, LCA, UEA, DBA, STL) an den Oberflächen unterschiedlicher Zelltypen (SV HUC, 5637, HT1376, 647V, T24, RT112, NpHUC, TpHUC) adhärirt und beobachtet, in welchem Ausmaß sie bei einer physiologischen Temperatur (37°C) von den Zellen aufgenommen wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass WGA an fast allen Zelllinien die beste Assoziation zur Zelloberfläche besitzt. Die Primärzellen wiesen generell eine höhere Bindungskapazität als immortalisierte Zelllinien auf. Um die Internalisation der Lektine nachzuweisen, wurden Zellfärbungen durchgeführt, die diese Annahme bestätigten. Durch Vorbehandlung der Zelloberflächen mit Neuraminidase wurde bewiesen, dass ein höheres Bindungspotential an jedem Zelltyp erzielt werden kann.

Study of lectins binding on urothelial cells

Specific interactions of lectins with the glycocalyx of urothelial cell surface may represent a targeted method of intravesical bladder cancer therapy. In this thesis, experiments were performed to bind with lectins on the surface of urothelial cells. It was expected that there is a difference in the lectin binding capacity between healthy and diseased urothelial cells. To prove this methodically, fluorescently labeled lectins (WGA, PNA, LCA, UEA, DBA, STL) were adhered on the surfaces of different cell types (SV HUC, 5637, HT1376, 647V, T24, RT112, NpHUC, TpHUC). It was observed thereafter how much were taken up by cells at a physiological temperature (37°C). The results showed that WGA has the best binding capacity to the cell surface on almost all cell lines. The primary cells generally had a higher binding capacity than immortalized cell lines. To prove the internalization of lectins, cell staining was performed, which confirmed this assumption. By pretreatment of the cell surfaces with neuraminidase, it was proved that a higher binding potential of every tested celltype can be forced.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung.....	9
1.1. Motivation	9
1.2. Zielsetzung.....	9
2. Pathophysiologische Grundlagen	11
2.1. Harnblase (Vesica urinaria)	11
2.2. Glykokalyx.....	12
2.3. Maligne Tumore der Harnblase.....	14
2.4. Harnblasentumor- Arten, Symptome und Therapie	16
3. Material und Methoden	18
3.1. Lösungen	18
3.2. Geräte.....	20
3.3. Urothel-Primärzellkultur	21
3.3.1. Gewinnung der Primärzellen.....	21
3.3.2. Ansetzen der Zellen	22
3.3.3. Passagierung der Primärzellen	22
3.4. Humane Urothelkarzinom-Zelllinien	23
3.4.1. Passagierung und Kultivierung der humanen Urothelkarzinom-Zelllinien	23
3.5. Kultivierung der Zelllinien im Überblick	23
3.6. Lektinbindungsstudie	24
3.6.1. Fluoreszenzmarkierte Lektine	24
3.6.2. Monensin.....	25
3.6.3. Neuraminidase	25
3.7. Durchführung der Lektinbindungsstudie	25
3.7.1. Versuchsvorbereitung	25

3.7.2.	Versuchsdurchführung	26
3.8.	Lektinbindungsversuch nach Neuraminidasevorbehandlung	27
3.8.1.	Vorbereitung	27
3.9.	Färbungen.....	29
3.9.1.	Färbematerialien	29
3.9.2.	Färbung – Versuchsreihe 1	30
3.9.3.	Färbung – Versuchsreihe 2	32
4.	Ergebnisse.....	34
4.1.	Kultivierung von Primärzellen	34
4.2.	Lektinbindungsstudien - Durchführung.....	34
4.3.	Lektinbindungsstudie — Ergebnisse der einzelnen Zelllinien	36
4.3.1.	SV HUC.....	36
4.3.2.	5637	38
4.3.3.	T24	40
4.3.4.	647V.....	42
4.3.5.	RT112.....	44
4.3.6.	HT1376	46
4.3.7.	Primärzellen – Tumor (129T).....	48
4.3.8.	Primärzellen – Tumor (130T).....	50
4.3.9.	Primärzellen – Tumor (135Tp3).....	54
4.3.10.	Primärzellen – Tumor (136Tp1).....	56
4.3.11.	Primärzellen – Tumor (Tp HUC) Zusammenfassung.....	58
4.3.12.	Primärzellen – gesund (135G)	60
4.3.13.	Primärzellen – gesund (137G)	64
4.3.14.	Primärzellen – gesund (140G)	68
4.3.15.	Primärzellen – gesund (Np HUC) Zusammenfassung	72
4.3.16.	Interaktion zwischen Lektinen und unterschiedlichen Urothelzellen im Vergleich	74

4.4. Färbungen.....	79
4.5. Zellgröße bei ausgewählten Urothelzelllinien.....	89
4.6. Lektinbindungsstudien nach Neuraminidase-Vorbehandlung.....	90
5. Diskussion.....	93
Abkürzungsverzeichnis	95
Appendix A	97
5.1. Rohdaten	97
5.1.1. Lektinbindungsversuche.....	97
5.1.2. Versuche mit Neurominidase	104
Literaturverzeichnis.....	106
Abbildungsverzeichnis.....	109
Tabellenverzeichnis	111

1. Einleitung

1.1. Motivation

Die Bindungscharakteristik von Lektinen an der Glykokalyx von Urothelzellen kann für eine zielgerichtete Krebstherapie von Bedeutung sein. Von einer idealen Therapie wird erwartet, dass nur erkrankte – mutierte – Zellen zerstört und gesunde nicht beeinträchtigt werden. Ein Ansatz einer solchen zielgerichteten Therapie ist die Anwendung von Arzneistoffen, die an Moleküle gebunden sind, die eine höhere Assoziation zu erkrankten als zu gesunden Zellen zeigen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden daher Versuche durchgeführt, die ein unterschiedliches Bindungspotential von pflanzlichen Lektinen zu gesunden und erkrankten Zellen des Blasenepithels untersuchen. Um die in-vitro Versuche möglichst nahe an den physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper zu gestalten, wurden zusätzlich zu Zelllinien (nach SV HUC, 5637, HT1376, RT112, T24, 647V), auch Primärzellen, verwendet. Diese wurden Patient_innen im Rahmen von Blasenresektionen entnommen.

1.2. Zielsetzung

Die Zellmembran ist extrazellulär von einer Polysaccharidschicht umgeben – der Glykokalyx. Diese Polysaccharide sind an Lipid- oder Proteinmoleküle gekoppelt, die in der Zellmembran verankert sind, und bilden somit Glykolipide bzw. Glykoproteine. Durch die Komplexität des Zuckergerüsts ergibt sich für jede Zelle ein spezifisches Polysaccharidmuster. So ergibt sich die Funktion der Glykokalyx als spezifisches Erkennungsareal der Zelle für Interaktionen. Weiters dient die Glykokalyx zur Kontaktaufnahme mit anderen Zellen und zur Zellkommunikation. [1]

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine nichtimmunologischen Ursprungs, die spezifisch Zucker erkennen und an glykosylierte Membranenkomponenten binden können. Diese

Interaktion kann eine Bioadhäsion oder gar eine zelluläre Internalisation zur Folge haben. Bei Tumorzellen kann es zu einer von der Norm abweichenden Glykosylierung kommen. Die Folge ist ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster im Vergleich zu gesunden Zellen und eine unterschiedliche Zell-Assoziation der Lektine. [2]

Diese Unterschiede könnten in Zuge einer Chemotherapie genutzt werden – hier sollte das applizierte Arzneimittel idealerweise ausschließlich an den erkrankten Zellen wirken und somit die gesunden Zellen nicht beeinflussen. Die zu erwartenden positiven Effekte wären:

- Geringere Nebenwirkungen, da sich die Therapie nur auf die erkrankten Zellen beschränkt,
- Längere Verweildauer des Arzneimittels am Wirkort durch die Adsorption an der Zelloberfläche oder sogar Internalisation

Da es eine Vielzahl an Lektinen gibt und jedes ein anderes Bindungspotential zu den Zellen besitzt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Screening von standardisierten (SV HUC, 5637, HT1376, RT112, T24, 647V) Zelllinien und Primärzellen durchgeführt. Einerseits wurde versucht, einen Unterschied der verschiedenen Lektine in ihrer Bindungsintensität an die menschlichen Blasen Zellen zu veranschaulichen, andererseits die unterschiedliche Assoziation der Lektine zu gesunden und erkrankten Zellen festzustellen.

2. Pathophysiologische Grundlagen

2.1. Harnblase (*Vesica urinaria*)

Lage

Die Harnblase ist ein Hohlorgan und befindet sich im kleinen Becken. Sie liegt präperitoneal hinter der Symphyse. Dorsokranial ist die Harnblase mit Peritoneum überzogen. Ventral als bindegewebiges Polster liegt das Spatium retropubicum, in das sich die Blase bei Füllung verschieben kann. [3]

Aufgaben

Die Harnblase stellt das Sammelbecken für den Urin dar. Ihre Aufgabe besteht darin, den Urin bis zur Miktion zu speichern und zu verhindern, dass der Urin während der Speicherzeit rückresorbiert wird. Zudem muss sie sich willkürlich und rasch entleeren lassen. [4] Das Fassungsvermögen der Blase beträgt beim Erwachsenen 0,6-1,0l, ein Empfinden der Blasenfüllung tritt aber schon bei einer Ansammlung von 150-300ml auf. Mit beginnender Füllung steigt der Druck innerhalb der Blase zunächst an, um bei der weiteren Volumszunahme weitgehend konstant zu bleiben. Mit stärkerer Füllung setzt die aktive Blasenentleerung ein, bevor der Druck weiter ansteigen kann. Die Blasenmuskulatur passt sich also dem Füllungszustand an, um einen konstanten Blasentonus aufrecht zu erhalten. Dieses Verhalten ist wahrscheinlich auf die viskös-elastische Eigenschaft der glatten Bauchmuskulatur zurückzuführen. [5]

Aufbau

Die Harnblasenwand besteht aus fünf Schichten: [4]

- Tunica mucosa: das Übergangsepithel der Harnwege
- Tela submucosa: eine submuköse Bindegewebsschicht, die die Faltenbildung der Schleimhaut bei der Entleerung fördert

- Tunica muscularis: ein Muskelgewebe, das aus drei Schichten glatter Muskelzellen aufgebaut ist
- Tela subserosa: ein lockeres Bindegewebe
- Tunica serosa: das Peritoneum

Das Urothel stellt das Epithel der ableitenden Harnwege – Nierenbecken, Harnleiter, proximale Teile der Harnröhre und Harnblase – dar. Das Urothel setzt sich aus drei Schichten zusammen:

- Superfizialzellen („umbrella cells“): elliptische Zellen, die sich wie Regenschirme über die nachfolgende Zellschicht ausbreiten
- Intermediärzellen: keulenförmige Zellen
- Basale Zellschicht

Die Aufgabe des Urothels besteht darin, das umliegende Harnblasengewebe vor Infektionen, Toxinen und im Harn gelösten Stoffen zu schützen. [6]

2.2. Glykokalyx

Die Glykokalyx ist eine komplexe Schicht aus Polysacchariden, welche die Plasmamembran außen umgibt. [7] Diese Polysaccharide sind an Lipid- oder Proteinmoleküle gekoppelt, die in der Zellmembran verankert sind, und bilden somit Glykolipide bzw. Glykoproteine. Die Glykokalyx enthält zumeist Glucose, Galactose, Fructose, Glucosamin und Galactosamin, sowie Neuraminsäure. Die Zucker der Glykokalyx liegen als Oligo- oder Polysaccharide vor. Daraus ergibt sich eine große Anzahl an Variationsmöglichkeiten, die höher ist als die Anzahl der Zellen im menschlichen Organismus. [8]

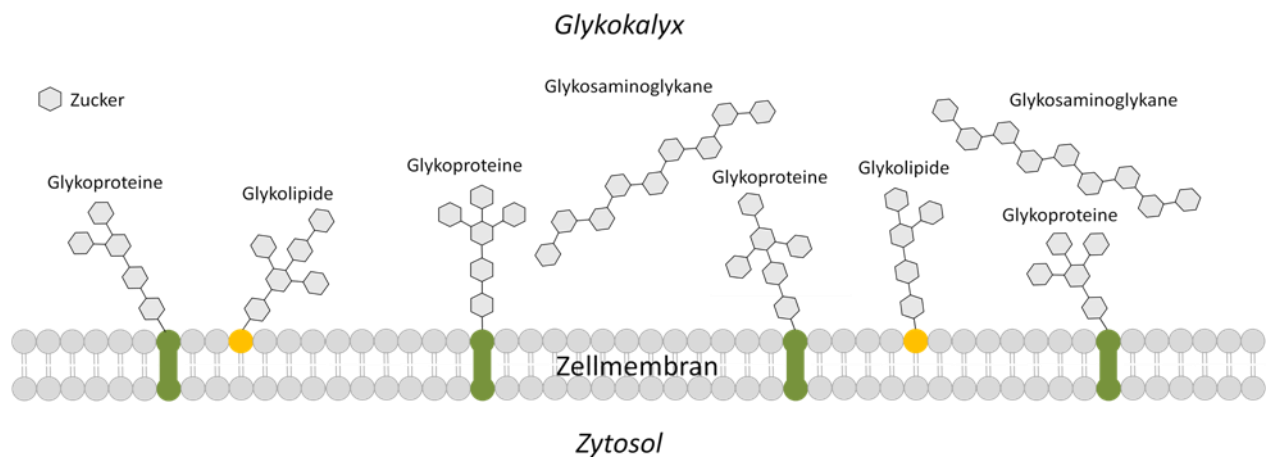


Abbildung 2-1: Aufbau der Glykokalyx

Funktion der Glykokalyx

Die Glykokalyx schützt und stabilisiert die Zelle und erkennt und interagiert mit anderen Glykanen. Daraus ergeben sich zahlreiche spezifische Funktionen, die je nach Zelltyp und Glykanen variieren können. Durch die Interaktionen sind sie in die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen und Zellkommunikation involviert; somit haben sie in der Signaltransduktion und in der Entwicklung und Differenzierung von Organen und dem Tumorwachstum eine wichtige Funktion. Die Glykane können auch Liganden für Rezeptoren und Mikroorganismen darstellen, falsch gefaltete Glykoproteine erkennen und für den Umsatz und Transport von Glykoproteinen von Bedeutung sein. [9]

Aufnahmewege über die Glykokalyx

Die Aufnahme von Molekülen in epitheliale Zellen erfolgt über aktiven Transport, wie z.B. Vesikel oder über passive Diffusion. Um die Bioverfügbarkeit von großen Molekülen und Peptiden zu verbessern, werden Substanzen, wie z.B. Lektine eingesetzt. Mukoadhäsive Substanzen können die Aufnahme und die Verweildauer von Arzneistoffen verbessern, den Kontakt zwischen dem Epithel und dem Wirkstoff intensivieren und auch die Permeabilität des epithelialen Gewebes, durch Beeinflussung der *tight junctions* (Zonula occludens), modulieren. [10] In der Glykokalyx finden sich weiters Rezeptoren für Xenobiotika. [11 (238)]

2.3. Maligne Tumore der Harnblase

Inzidenz und Epidemiologie

„Das Harnblasenkarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Harntrakts und nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste des Urogenitalsystems. In der Häufigkeit der Tumorerkrankungen stehen maligne Tumore der Harnblase beim Mann an vierter, bei der Frau an sechster Stelle [...]. [...] Das Blasenkarzinom ist für 3,5% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Die Mortalität variiert in den verschiedenen Industrieländern erheblich (3-8,5%). [...] Die Erkrankung findet sich bei Männern etwa dreimal so häufig wie bei Frauen.[...]“ [12]

„Die Latenzzeit eines Harnblasenkarzinoms kann mehrere Jahrzehnte betragen.“ [13]

Die relative Fünfjahresüberlebensrate liegt durchschnittlich bei 82%. [14]

Ätiologie und Risikofaktoren

Bei 75% der Patient_innen liegt kein berufliches oder umweltbedingtes Risiko vor. Bei dieser Patient_innengruppe können keine Kanzerogene nachgewiesen werden.[14]

Dennoch stehen viele Blasenkrebserkrankungen in Zusammenhang mit einer umwelt- oder krankheitsbedingten Disposition.

Rauchen: Bei Raucher_innen wurde ein 2-4fach erhöhtes Blasenkrebsrisiko beobachtet. Dieses Risiko ist abhängig von der Zeitspanne und der Anzahl an Zigaretten, die konsumiert wurden. Das Risiko sinkt bei einer Abstinenz wieder. Der Grund für das erhöhte Risiko liegt im mutagenen Inhalt des Zigarettenrauchs. Bei Raucher_innen konnten viermal mehr DNA-Addukte im Blasenurothel nachgewiesen werden als bei Nichtraucher_innen. Weiters sind im Zigarettenrauch Stoffe enthalten, denen blasenkanzerogene Eigenschaft zugeschrieben werden (Nitrosamine, aromatischen Amine). [15]

Phenacetinabusus: Personen, die im Rahmen eines Analgetikaabusus zwischen 1-20kg Phenacetin zu sich genommen haben, entwickeln eine Phenacetinniere. Hier tritt eine interstitielle Nephritis mit entzündlichen Infiltraten und Fibrosen der Nebenniere auf. Es wird vermutet, dass durch die phenacetinbedingte Papillennekrose häufig bakterielle

Superinfektionen sowie eine Nitrosaminentstehung verursacht werden, wodurch sich eine kanzerogene Wirkung entfaltet. Als Folge treten vermehrt Entartungen der Harnwege auf (8-10% Urothel, >50% Harnblase, 25-40% Nierenbecken, 6-20% Ureter). [15]

Aromatische Amine: Aromatische Amine werden zu hochreaktiven ultimativen Kanzerogenen metabolisiert. Dabei kommt es zur enzymatisch aktivierten Bildung von Arylnitrenium-Ionen, die mit Nukleinsäuren sämtlicher Organe interagieren können. Die Aktivierung kann nur in der Leber oder in der Harnblase erfolgen, wobei in der Leber durch Konjugation die Detoxifikation stattfindet. [15]

Bakterien: Patient_innen, die an chronisch rezidivierenden Harnwegsinfekten leiden, haben ein erhöhtes Risiko an Blasenkarzinomen zu erkranken. Im Rahmen einer Studie (Kaufmann et al. 1997) [9] wurde auch bei bis zu 20% der Paraplegiker mit einer Selbstkatheterisierung Plattenepithelkarzinome entdeckt, die wahrscheinlich mit dem vermehrten Auftreten von Bakterien in Verbindung stehen. [15]

Viren: Es ist umstritten ob Humane Papillomviren Blasenkrebs auslösen können. In mehreren Studien wurden in bis zu 62% der Biopsaten HPV 16, 18 und 33 nachgewiesen. In anderen Studien hingegen konnte kein HPV nachgewiesen werden. In einer epidemiologischen Studie konnte aufgezeigt werden, dass in Ländern mit einer höheren Inzidenz an Karzinomen der Vagina und der Vulva auch eine höhere Rate an Blasenkrebskarzinomen vorliegt. [15]

Pilze: In Ländern des ehemaligen Jugoslawiens, Bulgarien und Rumänien wird das Krankheitsbild der Balkannephropathie beobachtet. Die Balkannephropathie wird mit dem Mykotoxin Ochratoxin A in Verbindung gebracht, das bis zu einem Gehalt von 40% in den Getreiden der betroffenen Regionen vorkommt und auch bei den Patient_innen in erhöhter Menge in den Seren der Erkrankten nachgewiesen wurde. Es steht zur Diskussion, ob das Mykotoxin selbst, oder die meist als Sekundärerkrankung vorhandene chronische, bakterielle Pyelonephritis und eine damit einhergehende erhöhte Nitrosamininduktion für die Entstehung der malignen Karzinome verantwortlich ist. Die Patient_innen, die an einer Balkannephropathie leiden, weisen ein 90fach erhöhtes Risiko an Urothelkarzinomen, ein zwölfmal erhöhtes Blasenkarzinomrisiko und ein sechzigmal erhöhtes Nierenbeckenkarzinomrisiko auf. [15]

Alkylantien: Oxazaphosphorine, die als alkylkierende Chemotherapeutika eingesetzt werden, können für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen verantwortlich sein. Es wurde beobachtet, dass ca. 5% der Patient_innen, die über mehrere Jahre mit Cyclophosphamid behandelt wurden, ein Blasenkarzinom als Sekundärtumor entwickelten. [15]

Immunsuppressiva: Patient_innen, die nach einer Organtransplantation mit Immunsuppressiva behandelt werden, haben ein nachweislich höheres Blasenkarzinomrisiko. Die Kanzerogenität wird mit der Mutagenität der Substanzen und den verursachten Chromosomenschäden in den Lymphozyten erklärt. [15]

Strahlentherapie: Bei lokaler Strahlentherapie im Unterleib ist ein signifikant höheres Risiko nachgewiesen, an Blasenkrebs zu erkranken. Darüber hinaus kann eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung beobachtet werden. Frauen, die aufgrund eines invasiven Zervixkarzinoms bestrahlt wurden, haben ein zwei- bis achtfachfach erhöhtes Risiko an einem Blasenkarzinom zu erkranken. [17]

2.4. Harnblasentumor- Arten, Symptome und Therapie

„Beim Blasentumor handelt es sich um eine Erkrankung mit stark variablem Erscheinungsbild [...], das eine differenzierte Diagnostik, stadienadaptierte Therapie und eine an das individuelle Geschehen angepasste Verlaufsform erfordert. Histologischer Bautyp, Malignitätsgrad und Wachstumsverhalten (oberflächlich/infiltrierend, unifokal/multifokal) des Blasentumors bestimmen die Prognose der Erkrankung.“ [18]

Nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom

Zum Zeitpunkt der Diagnose sind ca. 70% aller Harnblasenkarzinome nicht-muskelinvasiv. Zu den Hauptsymptomen zählen die asymptomatische Mikro- und Makrohämaturie und in seltenen Fällen treten auch chronisch-zystitische Beschwerden auf. [19]

„Zur lokalen Behandlung des oberflächliche Blasenkarzinoms sind verschiedene Verfahren allein oder in Kombination mit einer transurethralen Resektion (TUR) verfügbar:

Elektrokoagulation, Laserbehandlung zur thermischen bzw. photodynamischen Tumorzerstörung, topische Therapie mit Chemotherapeutika oder Immunmodulatoren sowie die Strahlentherapie.“ [20]

Muskelinvasives Blasenkarzinom

30% der erstdiagnostischen Blasenkarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose muskelinvasiv, wobei sich bei 10-15% der Patient_innen schon Metastasen entwickelt haben. Hier treten zusätzlich zur Mikro- und Makrohämaturie und den chronisch-zystitischen Beschwerden auch Dysurie, Pollakisurie und Drangsymptomatik auf. Bei einem weit fortgeschrittenem Stadium können auch Schmerzen im kleinen Becken auftreten. [19]

Derzeit wird bei einem muskelinvasiven Blasenkarzinom eine radikale Zystektomie empfohlen. Da ca. 50% aller zystektomierten Patient_innen innerhalb von 5 Jahren an einer hämatogenen Metastasierung sterben, kann die Zystektomie um andere integrale Maßnahmen ergänzt oder in ausgewählten Fällen durch Alternativtherapien, ersetzt werden, die die Organerhaltung bei vergleichbarer Überlebensrate gewährleisten. [20]

3. Material und Methoden

3.1. Lösungen

Transportmedium

Die in der urologischen Abteilung des Wilhelminenspitals/Wien entnommenen Blasenstücke wurden in einer sterilen HBSS (+) Ca/Mg (Hank's Balanced Salt Solution mit Calcium und Magnesium) Lösung mit einer Konzentration von 10mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) als Puffer, 20 KIU (kilo international units)/ml Aprotinin (Sigma, P.Nr. A1153) und 50µg/ml Gentamycin für den Transport gelagert.

Stripping Solution

Die Stripping Solution wurde aus 50ml PBS (Phosphate buffered saline) mit 1% EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 5ml HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) 1M und 20 KIU/ml Aprotinin in 500ml HBSS (-) Ca/Mg hergestellt und anschließend steril filtriert.

Kollagenase

Zum Kollagenaseverdau wurden eine Lösung mit einer Konzentration von 10mM HBSS + Ca/Mg (Gibco, P.Nr.24020), 100 U/ml Collagenase IV (Sigma, P.Nr. C5138) und 10mM HEPES herangezogen.

PBS

PBS (Phosphate buffered saline) besteht aus destilliertem Wasser mit einem Zusatz von 0,08% (G/V) NaCl, 0,002% (G/V) KCl, 0,00765% (G/V) Na₂HPO₄, 0,002% (G/V) KH₂PO₄ und wird auf einen pH-Wert von 7,2-7,3 eingestellt.

PBS/EDTA

PBS/EDTA ist eine PBS-Lösung, der 0,1% (G/G) EDTA hinzugefügt wurde.

cKSFM

Zur Herstellung von cKSFM (Complete Keratinocyte Serum Free Medium) (Gibco, P.Nr. 17005) wurden 500ml KSFM mit 2,5µg einer 0,038775µg/ml Lösung humanem rekombinanten EGF (epithelial growth factor), 25mg einer 13,4µl/ml BPE-Lösung (Bovine Pituitary Extract), 50µl CT-Stocksolution (Cholera Toxin Stocksolution) und 10µg/ml Penicillin/Streptomycin in PBS Lösung versetzt.

CT-Stocksolution

Es wurde 1mg Cholera Toxin eines Lyophilisats mit 1×10^5 - 1×10^6 /mg (Sigma, P.Nr. C805) in 1ml sterilfiltriertem gereinigten Wasser gelöst. Von dieser Lösung wurden 150µl mit 5ml cKSFM verdünnt.

Trypsin-EDTA Lösung

Zum Ablösen der Zellen wurde eine 0,25% Trypsinlösung (Sigma, P.Nr. T4049) verwendet, die mit 0,02% EDTA versetzt war.

Trypsininhibitor

Zur Herstellung des Trypsininhibitors wurden 250mg Sojabean Trypsin Inhibitor (Sigma, P.Nr. T9003) in 5ml PBS + Ca/Mg verdünnt und anschließend in autoklavierten Eppendorfgefäßen zu je 50µl abgefüllt. Die Lagerung des Trypsininhibitors erfolgte bei -20°C.

1% Gelatinelösung

5g Gelatine, Typ B (Sigma Aldrich, P.Nr. G9391) wurden unter Erhitzen (60°C) in 500ml sterilem Wasser gelöst und anschließend noch warm in sterile Gefäße filtriert.

HEPES-Lösung

23,8g HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) wurden in 100ml sterilem Wasser gelöst und mit einer Lösung von 4M NaOH auf pH 7,6 eingestellt.

FBS

FBS (Fetal Bovine Serum) (BioWhittaker Lonza, P.Nr. DE14-801F) stellt einen in der Zellkultur breit genutzten Wachstumszusatz für Zellkulturmedien dar, da es einen hohen Gehalt an embryonalen Wachstumsfaktoren besitzt. [21]

HAMS F12

HAMS F12 (Ham's Nutrient Mixture F12) (Gibco, P.Nr. 21765-029) wurde mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,0146%L-Glutamin als Nährmedium zum Kultivieren von SV HUC verwendet.

DMEM

DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) (Gibco, P.Nr. 41966-029) mit einem Zusatz von 10% FBS (DMEM 10%) oder einem Zusatz von 15% (DMEM 15%) wurde zum Kultivieren von HT1376, T24 bzw. 647V verwendet.

RPMI

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 - (Sigma, P.Nr. R6504-1L) stellt ein Nährmedium zur Kultivierung von RT112 und 5637 da.

3.2. Geräte

COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer (Beckman Coulter)

Das Durchflusszytometer dient der Messung und Analyse von Signalen, die von Fluoreszenzmarkern, welche an Zellen gebunden sind, ausgehen. Diese Zellen fließen in einem flüssigen Hüllstrom durch einen Lichtstrahl. [22] Mit dem Gerät können biologische und physikalische Bestandteile von Zellen und anderen Partikeln in vitro gemessen werden. [23]

Infinite M200 fluorometer (TECAN, Grödig, Austria)

Um zu gewährleisten, dass den Proben dieselbe Menge an Lektinen hinzugefügt worden war, wurde mit dem Infinite M200 fluorometer die Fluoreszenz der einzelnen Proben gemessen.

Axio Observer.Z1 (Zeiss)

Die mikroskopischen Bilder der Zellen wurden mit einem Axio Observer.Z1 aufgenommen.

3.3. Urothel-Primärzellkultur

3.3.1. Gewinnung der Primärzellen

Die Blasen­zellen wurden von der urologischen Abteilung des Wilhelminenspi­tals/Wien zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 17 gesunde Primärzellproben und 22 erkrankte entgegengenommen. 5 Proben wurden nicht als gesund oder erkrankt definiert. 32 stammten von Spendern, 8 von Spenderinnen. Bei 4 Urothelgeweben war das Geschlecht der spendenden Personen nicht bekannt.

Die Gewebeproben wurden im Rahmen von Operationen des Urogenitaltraktes entnommen und jeweils in ein 50ml Tube mit 15ml Transportmedium überführt.

Die Proben wurden nach dem Transport auf das Department für Pharmazeutische Technologie aus den Sampleröhrchen entnommen und in ein Zentrifugenvial mit 5-15ml Stripping Solution übergeführt. Waren viele bereits abgelöste Zellen im Überstand, wurden diese in einem Sampleröhrchen abzentrifugiert (1000rpm, 5min), in 5ml Stripping Solution aufgenommen und in ein neues Zentrifugenvial eingebracht. Die Gewebestücke wurden entweder über 12h bei 4°C oder 3-4h bei 37°C in der Stripping Solution inkubiert.

Wenn die Zellen über 12h (Nacht) bei 4°C inkubiert wurden, wurde das Vial vor der weiteren Bearbeitung 15-20min im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Durch vorsichtiges Schütteln (z.B. unter Hilfe einer Vortexers) wurden die Urothelzellen vom Stroma getrennt. Die Stromateilchen wurden mittels Pipetten durch vorsichtiges Absaugen und mittels Pinzetten aus dem Vial entnommen und entsorgt. Die abgetrennten Zellen wurden bei 1000rpm 7min lang zentrifugiert, in 1-2ml Kollagenaselösung aufgenommen und in dieser für 20min im Brutschrank bei 37°C inkubiert (=Verdaulösung).

Zur Verdaulösung wurden 3ml cKSFM hinzugefügt und mit einer Pipette durch Auf- und Absaugen die Zellen, die noch im Zellverband vorlagen, desaggregiert. Im Anschluss wurden die Zellen wieder bei 1000rpm 5min lang zentrifugiert, die Flüssigkeit abgesaugt und die Zellen in 2200µl cKSFM aufgenommen.

3.3.2. Ansetzen der Zellen

Die Zellen wurden aus 2200µl Zellsuspension angezüchtet. Dazu wurden 12 Wells einer 24-Well-Platte und eine 25cm² Zellkulturflasche verwendet.

Die Zellkulturflasche und die Wells wurden zunächst mit 2000µl bzw. jeweils 1000µl 1% Gelatine-Lösung 30min lang beschichtet. Anschließend wurde die Gelatinelösung abgesaugt und die Zellen wie folgt angesetzt:

Die Zellkulturflasche enthielt 1000µl Zellsuspension und 4000µl cKSFM.

Die 12 Wells wurden mit jeweils 100µl Zellsuspension und 1000µl cKSFM angesetzt.

Die angesetzten Zellen wurden dreimal wöchentlich einer Wachstumskontrolle unterzogen. Der Mediumswechsel wurde nach erfolgter Anheftung der Zelle an den Untergrund und erfolgtem Wachstum durchgeführt, sobald ein Mediumsverbrauch durch einen Indikatorumschlag ersichtlich war.

3.3.3. Passagierung der Primärzellen

Sobald der Boden der Zellkulturflaschen zu circa 80-90% durch den Zellrasen bedeckt war, wurden die Zellen passagiert. Das alte Medium (cKSFM) wurde abgesaugt und die Zellen mit 2ml PBS-EDTA (0.1%EDTA) inkubiert, bis diese sich abgerundet hatten. Die PBS-EDTA-Lösung wurde wieder abgesaugt und die Zellen mit 1ml Trypsin/EDTA 2min lang trypsinisiert. Nach Ablauf der Zeit wurde mittels Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen tatsächlich von der Flaschenwand abgelöst hatten. Zusätzlich wurde durch seitliches Klopfen an der Zellkulturflasche der Ablösevorgang unterstützt. Nun wurden 5ml der Trypsininhibitorlösung zugesetzt, der Flaschenboden mehrmals mit der Suspension aus Zellen, Trypsin/EDTA und Trypsininhibitor gespült, um noch an dem Boden haftende Zellen zu entfernen. Diese Suspension wurde in ein Zentrifugenvial übergeführt und mehrmals mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Weiters wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1000rpm, 5min). Im Anschluss wurde die über dem Zellpellet stehende Lösung abgesaugt und durch 4ml frisches cKSFM ersetzt und sorgfältig resuspendiert. Nun wurden zwei gelatinegecoatete Zellkulturflaschen (50ml, 25cm² Wachstumsfläche) mit jeweils 3ml cKSFM und je 2ml der zubereiteten Zellsuspension angesetzt.

3.4. Humane Urothelkarzinom-Zelllinien

3.4.1. Passagierung und Kultivierung der humanen Urothelkarzinom-Zelllinien

Die Zelllinien wurden in Kulturflaschen (550ml) mit einer Wachstumsfläche von 75cm² angesetzt. Sobald die Zellen einen dichten Zellrasen gebildet hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 2ml PBS/EDTA gespült und wieder abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurden 2ml Trypsin hinzugefügt und die Kulturflasche 15min lang im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde mittels Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen abgelöst hatten und bei Bedarf der Prozess durch leichtes Klopfen an der Flaschenoberfläche unterstützt. Nun wurden 10ml des zu verwendenden Mediums hinzugefügt, die Zellsuspension in ein 30ml Tube übergeführt und bei 1000 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 2ml Medium resuspendiert und - je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie - 5-10ggt der Zellsuspension in einer neuen Kulturflasche angesetzt, in der bereits 10ml Medium vorgelegt worden waren. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂, 96%rH kultiviert.

3.5. Kultivierung der Zelllinien im Überblick

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht bzgl. Charakterisierung, Bezugsquelle, Nährmedien und angewandten Spalt-Methoden.

Zelltyp	Charakt.	Bezugsq.	Medium	V _{Medium}	Spalten
SV HUC	Gesund	ATTC	HAMS F12, FCS, Penicillin, Streptomycin, L-Glutamin	10ml	Trypsin, 10min
5637	Tumorgrad 2	DSMZ	RPMI, FCS, Gentamycin, L-Glutamin	10ml	Trypsin, 10min
647V	Tumorgrad 2	DSMZ	DMEM, 15%FCS, Gentamycin	10ml	Trypsin, 10min
RT112	Tumorgrad 2	DSMZ	RPMI, FCS, Gentamycin, L-Glutamin	10ml	Trypsin, 10min
T 24	Tumorgrad 3	DSMZ	DMEM, 10% FCS, Gentamycin	10ml	Trypsin, 10min
HT1376	Tumorgrad 3	DSMZ	DMEM, 10% FCS, Gentamycin	10ml	Trypsin, 10min
Np HUC	Gesund		cKSFM	5ml	Trypsin, 5min
Tp HUC	Tumor		cKSFM	5ml	Trypsin, 5min

Tabelle 3-1: Zelllinien Übersicht: Hersteller und Charakterisierung

3.6. Lektinbindungsstudie

3.6.1. Fluoreszenzmarkierte Lektine

Folgende Lektine wurden zur Lektinbindungsstudie herangezogen und in einer Konzentration von 500pmol/ml angewandt:

WGA

WGA (Wheat Germ Agglutinin) (Vector Laboratories, Burlingame, P.Nr. FL-1021) wird aus *Triticum vulgare* gewonnen. Es stellt ein Isolektin dar. Sein Isoelektrischer Punkt liegt bei pH9. Der Rezeptorzucker für WGA ist N-Acetylglucosamin. WGA kann an terminale N-Acetylglucosamine und Chitobiose binden, die im Serum und in Membranglykoproteinen vorkommen. WGA kann über Sialinsäurereste mit Glycoproteinen interagieren. [24]

PNA

PNA (Peanut Agglutinin) (Vector Laboratories, Burlingame, P.Nr. FL-1071) stammt von *Arachis hypogaea*. PNA bindet bevorzugt an T-Antigen, das eine Galactosyl (β -1,3) N-acetylglucosaminstruktur besitzt, sowie an Ganglioside und andere lösliche und membranassoziierte Glycoproteine und Glycolipide. Die Rezeptorsequenz für PNA ist meist sialyliert, was verhindert, dass das Lektin an seinen Rezeptor bindet. Auch Sialinsäure kann die Bindung an die Rezeptoren verhindern. PNA dient zur Unterscheidung zwischen normalem Gewebe und Tumorgewebe. [25]

STL

STL (*Solanum Tuberosum* Lectin) (Vector Laboratories, Burlingame, P.Nr. 1161) bindet an Oligomere von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. STL stellt ein Dimer aus 2 identischen Untereinheiten dar. Wenn diese 2 Untereinheiten dissoziieren, können sie nicht mehr an Zelloberflächen binden. [26]

LCA

LCA (*Lens culinaris* agglutinin) (Vector Laboratories, Burlingame, P.Nr. FL-1041) erkennt alpha-gebundene Mannosereste. [27]

UEA

UEA (Ulex Europaeus agglutinin) (Vector Laboratories, Burlingame, P.Nr. FL-1061) bindet an Glycoproteine und Glycolipide, die alpha-gebundene Fucosereste enthalten. [28]

DBA

DBA (Dolichos biflorus agglutinin) (Vector Laboratories, Burlingame, P.Nr. FL-1031) ist ein Glycoprotein, das spezifisch alpha-gebundene N-Acetylglucosamine bindet. [29]

3.6.2. Monensin

Monensin (Vector Laboratories, Sigma, P.Nr. 1445481) ist ein Polyetherantibiotikum und gilt somit als Ionophor, das den Austausch von Protonen gegen Kaliumionen katalysiert.

Monensin führt zu einem Ausgleich des pH Gradienten in der Zelle zwischen den sauren Kompartimenten z.B. Lysosomen und dem Cytosol. [30] [31] [32]

3.6.3. Neuraminidase

Neuraminidase (Vector Laboratories, Sigma, P.Nr. N2876-10UN) spaltet Sialinsäure [33]. Die Neuraminidaselösung wurde in einer Konzentration von 1U/ml in 0,2M Natriumacetatpuffer (pH 4,8) angewandt. Die Details werden in Kapitel 3.8 behandelt.

3.7. Durchführung der Lektinbindungsstudie

3.7.1. Versuchsvorbereitung

Die Zellen der standardisierten Zelllinien wurden in einer 24 Well-Platte mit je 1,5ml Medium angesetzt; von den Primärzellen wurden, wie oben beschrieben, die gesamte nach der Passagierung übrige Zellsuspension auf die vorbereiteten Wellplatten aufgeteilt und bei 37°C, 5%CO₂, 96% rH im Brutschrank inkubiert.

Wenn die angesetzten Zellen einen regelmäßigen Monolayer gebildet hatten, wurde der Lektinbindungsversuch durchgeführt.

3.7.2. Versuchsdurchführung

Zunächst wurden die Zellen in den einzelnen Wells mit je 1,5ml PBS (-) Ca/Mg gewaschen. Dabei sollte die Spüllösung Raumtemperatur haben. Nun wurden die Zellen gespalten. Dazu wurde die Spüllösung vorsichtig abgesaugt und die Zellen bis zur Abrundung mit 500µl PBS/EDTA (0,1%) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 500µl Trypsin/EDTA für circa 2min inkubiert, bis sich diese abgelöst hatten. Der Spaltvorgang wurde mit 50µl der unmittelbar davor zubereiteten Trypsin-Inhibitorlösung gestoppt. Die gespaltenen Zellen wurden mit einer Pipette gut resuspendiert und 30min lang auf 4°C gekühlt.

Nun wurden zu jedem Well, das eine Zellsuspension enthielt, 300µl der ebenfalls auf 4°C gekühlten Lektinlösung zugesetzt und 30 min unter mehrmaligem Schwenken bei 4°C inkubiert. Mit jedem der verwendeten Lektine wurden 3 Wells behandelt (=Triplikat).

Um die korrekte Beladung der Zelloberflächen zu kontrollieren, wurde in der Beladungsphase eine Tecan-Messung (96 Well Platte 485/525, bottom, gain80) an den Proben direkt in den 24-Wellplatten durchgeführt. Als Vergleichswerte wurden auch die verwendeten Lektinlösungen gemessen (100µl, 96 Well-Platte; 485/525, bottom, gain80).

Nach Ablauf der Oberflächenbeladungszeit wurden die Zellsuspensionen gut resuspendiert, in Eppendorfgefäße (1500µl Fassungsvermögen) pipettiert und zentrifugiert (7min, 1000rpm, 4°C).

Im Anschluß an die Zentrifugation wurden 1000µl der überstehenden Lösung aus den Eppendorfgefäßen abpipettiert und durch 1200µl partikelfreien PBS(+)Ca/Mg (4°C) ersetzt. Diese Suspension wurde gut resuspendiert und in 2 Aliquots zu je 700µl und 800µl in FACS-Röhrchen aufgeteilt.

Die Aliquots, die 700µl enthielten, wurden weiter bei einer konstanten Temperatur von 4°C aufbewahrt und die einzelnen Sampleröhrchen nur zur Messung dem Kühlschrank entnommen.

Die Aliquots mit 800µl Zellsuspension wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, 96% rH inkubiert.

Die Messungen wurden in einem vorgegebenen Zeitabstand (siehe Tabelle 3-2) durchgeführt. Nach Messung 2 wurden den mit 37°C behandelten FACS-Probenröhrchen 10µl der Monensinlösung zugefügt, und nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden diese Proben erneut analysiert.

Es wurden in der Regel 3 Vergleichsproben erstellt und gemessen. Von den jeweils 3 Vergleichsproben wurde der Mittelwert (μ) und die dazugehörige Standardabweichung (σ) ermittelt.

Formel 4.1.
$$\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i)$$

Formel 4.2.
$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}$$

Werte, die bereits während der Messung von der Norm abweichen (um Faktor 1,5 und/oder mindestens 30FIU) wurden als Ausreißer deklariert und nicht gewertet. Bei der Darstellung eines Versuches, der mehrmals durchgeführt wurde, wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Einzelversuche zur Ermittlung der zusammenfassenden Werte herangezogen.

Aliquot	Temperatur	t Messung 1	t Messung 2	t Messung 3
700µl	4°C	0min	60min	
800µl	37°C	30min	90min	90min+30min bei RT nach Monensinzugabe

Tabelle 3-2: Lektinbindungsstudie: Messzeitpunkte und Probentemperatur

3.8. Lektinbindungsversuch nach Neuraminidasevorbehandlung

3.8.1. Vorbereitung

Die Zellen wurden in 24-Wellplatten zu 18 000 Zellen/Well angesetzt und gezüchtet, bis diese einen konfluenten Monolayer ausgebildet hatten. Dann erfolgte die Spaltung: die Zellen wurden mit 500µl PBS (-) Ca/Mg gewaschen, danach nochmals mit 500µl PBS/EDTA gespült und anschließend mit 500µl Trypsin 30min im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der

Zeit wurde die Enzymaktivität von Trypsin mittels 500µl der Abstopplösung inhibiert. Nach guter Resuspendierung der Zellen wurden 150µl einer Lösung mit unterschiedlichen Neuraminidasekonzentrationen pro Well hinzugefügt. Dabei wurden 6 Wells mit 0,05 U Neuraminidase, 6 Wells mit 0,1U Neuraminidase und 6 Wells nur mit Acetatpuffer behandelt und bei 37°C für 120min im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in Eppendorfvials übergeführt, zentrifugiert (5min, 1000rpm, 4°C) und nach der Zentrifugation 1000µl des Überstandes abpipettiert und 1000µl Acetatpuffer hinzugefügt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Nach dem dritten Waschen wurden die übrigen 150µl Zellsuspension mit 150µl Acetatpuffer (4°C) verdünnt. Nun wurden 300µl der F-PNA-Lösungen mit unterschiedlichen F-PNA Gehalten (250pmol/ml und 500pmol/ml) hinzupipettiert, die erhaltene Suspension gut resuspendiert und 30min lang bei einer Temperatur von 4°C inkubiert.

Im Anschluss folgte ein Waschvorgang, bei dem zunächst zentrifugiert wurde (5min, 1000rpm, 4°C), 500µl des Überstandes abpipettiert wurden und durch 500µl Acetatpuffer ersetzt wurden. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Abpipettieren wurden 1200µl frischer PBS (+) Ca/Mg hinzugefügt, die Zellsuspension gut resuspendiert und mittels Flowcytometer (Gallios, Beckman Coulter) Messungen durchgeführt.

Well	Neuraminidasegehalt (units)	F-PNA/ml
1	0,05 U	250 pmol
2	0,05 U	250 pmol
3	0,05 U	250 pmol
4	0,05 U	500 pmol
5	0,05 U	500 pmol
6	0,05 U	500 pmol
7	0,1 U	250 pmol
8	0,1 U	250 pmol
9	0,1 U	250 pmol
10	0,1 U	500 pmol
11	0,1 U	500 pmol
12	0,1 U	500 pmol
13	0 U	250 pmol
14	0 U	250 pmol
15	0 U	250 pmol
16	0 U	500 pmol
17.	0 U	500 pmol
18	0 U	500 pmol

Tabelle 3-3: Neuraminidaseversuch: Menge der zugeführten Neuraminidase (units) und des F-PNA (pmol)

3.9. Färbungen

Um die Ergebnisse der Lektinbindungsstudie mit dem Flowcytometer auch visuell zu bestätigen, wurden Färbungen von Zellen mit Lektinen durchgeführt.

WGA zeigte in den Lektinbindungsversuchen bei nahezu allen Zelllinien ein höheres Zell-Lektinbindungspotential als die anderen fluoreszenzgelabelten Lektine. Daher ist es naheliegend, dass sich WGA zur Veranschaulichung der Lektin-Zell-Assoziation besonders gut eignet.

3.9.1. Färbematerialien

A-WGA

Alexa Fluor® 488 konjugiertes WGA fluoresziert grün (Extinktion/Emissionsmaximum ~495/519nm). [34]

DAPI

DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Mikroskopie zur Markierung von DNA eingesetzt wird. DAPI lagert sich vermehrt in Adenin-Thymin-reichen Regionen an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Licht mit blauer bis cyaner Farbe. Das Absorptionsmaximum liegt bei 358nm, das Emissionsmaximum bei 461nm. [35]

Anti-Pan-Cytokeratin

Cytokeratine stellen eine Gruppe von 29 unterschiedlichen Proteinen dar, die charakteristisch für Epitelzellen sind. Monoklonale Antikörper für Cytokeratine sind spezifische Marker für Epithelzelldifferenzierung und werden zur Tumoridentifizierung und – klassifizierung eingesetzt. Das monoklonale Anti- Cytokeratin pan ist ein reaktiver Antikörper, der Epitope in den meisten humanen epithelialen Geweben erkennt. [36]

Anti-LAMP 2-Antikörper

LAMP2 (lysosome-associated membrane protein 2) ist ein intrinsisches Protein, das in der lysosomalen Membran vorkommt. LAMP 2 ist ein stark glycosyliertes Molekül. Die Glycosylierung ist für seine Funktion – den Schutz vor proteolytischen Enzymen – wichtig. Anti-LAMP2 Antikörper sind lysosomale Marker. [37]

Anti-ZO 1

Das Tight Junction Protein ZO-1 ist ein Membranprotein, das für die Funktion der Tight Junctions essentiell ist, die bei vielen invasiven Krebsarten nicht intakt sind. [38]

3.9.2. Färbung – Versuchsreihe 1

In zwei 24-Wellplatten wurden in jeweils 10 Wells runde Objektträger eingebracht und auf diesen SV HUC angesetzt. Sobald diese Monolayer ausgebildet hatten, wurden sie zweimal mit 500µl PBS (+) Ca/Mg gewaschen und die Platten 15min lang bei 4°C gekühlt.

Nun wurde das PBS (+) Ca/Mg abgesaugt und 300µl der vorgesehenen Lösungen hinzupipettiert: 4 Wells wurden mit f-BSA/WGA-Konjugat, 2 mit f-WGA, 2 mit A-WGA und 2 mit f-BSA behandelt. Im Anschluss wurden die Platten 30min lang bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde jedes Well dreimal mit 500µl PBS (+) Ca/Mg gewaschen. Danach wurden die Platten unterschiedlicher Temperatur ausgesetzt: eine 24-Wellplatte wurde 1h lang weiterhin auf 4°C gekühlt, während die andere 1h bei 37°C im aufbewahrt wurde.

Als nächstes erfolgte ein Waschschrift mit 500µl einer der folgenden Lösungen: von den mit f-BSA/WGA-Konjugat, f-WGA, AWGA und f-BSA-behandelten Wells wurde jeweils ein Well mit NAcGlc-Lösung (5µmol/ml in PBS (+) Ca/Mg) gewaschen, ein weiteres Well mit PBS (+) Ca/Mg und die zwei übrigen mit f-BSA/WGA-Konjugat inkubierten Wells mit PBS gewaschen. Bei jedem dieser Waschschriffe wurde die Waschlösung 10min lang in dem Well gelassen und danach abpipettiert. Der Waschvorgang wurde dreimal unter Kühlung auf 4°C wiederholt.

Im Anschluss wurden die Zellen durch Behandlung mit 300µl Methanol (-20°C) pro Well 15 min bei -20°C fixiert.

Nun erfolgte wieder ein Waschschrift, wobei jedes Well dreimal mit 500µl PBS gewaschen wurde. In der letzten Waschflüssigkeit wurden die Zellen 30min bei RT unter Lichtschutz aufgewärmt.

Jetzt wurden die 50µl PBS (+) Ca/Mg abgesaugt und durch 50µl der folgenden Lösungen ersetzt und 1h unter Lichtschutz bei RT behandelt: Anti-ZO, Anti-Lamp2 oder Anti-Pan-Cytokeratin.

Nun folgte ein Waschvorgang mit je 500µl PBS/BSA 1%.

Außer bei den mit f-BSA-behandelten Wells, wurde nach dem Waschen der PBS (+) Ca/Mg bei allen Wells entfernt und durch 50µl DAPI-Lösung ersetzt. Diese Lösungen wurden bei RT unter Lichtschutz 30min lang inkubiert.

Es folgte ein Waschschrift mit 500µl einer Lösung von PBS(+)Ca/Mg + 1%BSA, wobei darauf geachtet wurde, dass die Wells weiterhin unter Lichtschutz behandelt wurden.

Im Anschluss wurden die Deckgläser auf Objektträger fixiert und unter Lichtschutz bei Raumtemperatur getrocknet.

3.9.3. Färbung – Versuchsreihe 2

Im Rahmen der Lektinbindungsversuche wurde bei 4°C eine höhere MFI (Mean Fluorescence Intensity) gemessen als bei Zellen, die bei 37°C inkubiert wurden. Hier wurde angenommen, dass es bei 4°C zu einer Bindung der Lektine an die Zelloberfläche kommt und bei einer physiologischen Temperatur von 37°C die Lektine auch in die Zelle gelangen. Um dies zu visualisieren, wurden Färbungen mit f-WGA und A-WGA bei 4°C und 37°C vorgenommen. Zusätzlich wurde verglichen, welche Auswirkung ein Zusatz von N-Acetylglucosamin zeigt. Wie bereits in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, kann N-Acetylglucosamin eingesetzt werden, um die Bindung von WGA an die Zelle zu verhindern. Daher wäre bei einem Zusatz von N-Acetylglucosamin eine geringere Oberflächenbindung und geringere Internalisation von f-WGA und A-WGA zu erwarten.

Es wurden in zwei 24-Wellplatten, deren Wells runde Objektträger enthielten, SV HUC angesetzt. Sobald diese einen Monolayer ausgebildet hatten, wurde folgender Färbeversuch durchgeführt:

Zunächst wurde die Zellen jedes Wells 2 Mal mit 500µl PBS (+) Ca/Mg gewaschen und die Platten 15min lang auf 4°C gekühlt.

Nun wurden die 500µl PBS (+) Ca/Mg entfernt und die Wells unter Kühlung durch Zusatz von 300µl unterschiedlicher Lösungen von Färbematerialien in PBS (-) Ca/Mg behandelt:

- f-BSA/WGA-Konjugat (1:10)
- f-BSA/WGA-Konjugat (1:100) + Alexa-WGA (50pmol)
- F-WGA + A-WGA (50pmol)
- F-WGA + A-WGA (100pmol)

Beide Platten wurden anschließend 30min lang bei 4°C inkubiert.

Nun wurden die Platten dreimal mit 500µl PBS (-) Ca/Mg gewaschen. Eine Platte wurde 110min bei 37°C inkubiert, die andere wurde weiterhin auf 4°C gekühlt.

Die inkubierten Zellen der Platten wurden nun mit NAcGlc oder PBS (-) Ca/Mg (4°C) gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden 500µl der jeweiligen Lösung in jedes Well pipettiert und 10min einwirken gelassen.

Die Zellen wurden nun mit 300µl MeOH (-20°C) und unter Kühlung bei -20°C fixiert.

Nach 15min wurden die Zellen mit je 300µl PBS dreimal gewaschen und in der letzten Waschflüssigkeit 30min lang bei Raumtemperatur unter Lichtschutz rehydatisiert. Nun wurde die Waschflüssigkeit abgesaugt und die Wells mit 300µl einer Lösung von anti-Lamp2-AK oder 200µl DAPI 60min lang unter Lichtschutz inkubiert.

Anschließend wurden zu den mit anti-Lamp2-AK inkubierten Zellen 300µl DAPI-Lösung hinzugefügt und 30min lang bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Wartezeit erfolgte die Umbettung der nur mit DAPI inkubierten Zellen auf Deckgläser.

4. Ergebnisse

4.1. Kultivierung von Primärzellen

Das Wilhelminenspital/Wien stellte insgesamt 44 Gewebeproben zur Verfügung. Davon konnten nur 7 soweit kultiviert werden, dass auch eine Durchführung der geplanten Studie möglich war. Vier dieser Gewebeproben konnten bis zu viermal passagiert werden. Aus den anderen Gewebeproben konnten teilweise keine Epithelzellen gewonnen und kultiviert werden oder sie waren von einer Infektion befallen. Insgesamt wurde die Studie mit 12 Primärzellproben durchgeführt: 5 Tumorproben und 6 gesunde Blasenepithelien.

4.2. Lektinbindungsstudien - Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Single Cell Bindungsstudie an Blasenzelllinien (SV HUC (gesundes Urothel), 5637 (Tumorgrad II), T24 (Tumorgrad III), 647V (Tumorgrad II), RT 112 (Tumorgrad II) & HT1376 (Tumorgrad III)) und an drei gesunden (Np HUC) sowie vier erkrankten (Tp HUC) Blasenprimärzellen durchgeführt.

Die Zellen wurden zunächst mit fluoreszenzmarkierten Lektinen beladen. Die Zelllinien T24, 647V, RT112 und HT1376 wurden dazu mit WGA (Weat Germ Agglutinin), PNA (Peanut Agglutinin), STL (Solanum tuberosum Lectine), LCA (Lens culinaris Agglutinin), UEA (Ulex europaeus agglutinin) und DBA (Dolichos Biflorus Agglutinin) inkubiert. Mit SV HUC, 5637 und den Primärzelllinien wurden Versuche mit WGA, PNA, LCA und UEA durchgeführt. Für die mit den fluoreszenzmarkierten Lektinen gelabelten Zellen wurde die zellassoziierte Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie (COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer) bestimmt.

Zu Versuchsbeginn wurden die hergestellten Proben in Versuchsproben und Vergleichsproben aufgeteilt. Zunächst wurde anhand der Vergleichsprobe die Oberflächenbeladung bei 4°C zu Versuchsbeginn (0min) bestimmt. Dieser Wert stellte den Ausgangswert dar. Die Vergleichsproben wurden anschließend bei 4°C gelagert und nach 60min ein weiterer Vergleichswert bestimmt, um zu bestätigen, dass bei einer

Umgebungstemperatur von 4°C weder eine Internalisation der fluoreszenzmarkierten Lektine noch ein Verlust der Lektine durch passive Diffusion stattfindet. Die Versuchsproben wurden hingegen bei 37°C inkubiert und nach 30min und 90min analysiert. Hierbei wurde die zellassoziierte Fluoreszenz der markierten Zellen bestimmt, um etwaige Veränderungen der Lektin-Zellbindung zu beobachten. 90min nach Beginn der Inkubation wurde Messung 2 durchgeführt. Im Anschluss wurden den bei 37°C behandelten Proben 10µl Monensinlösung zugesetzt und nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erneut analysiert. Monensin führt als Ionophor zum pH-Ausgleich zwischen sauren Kompartimenten und dem Zytosol. Es wurde erwartet, dass dadurch der pH-abhängige Quench der mit Fluorescein markierten, internalisierten Lektine aufgehoben wird – die gemessene Fluoreszenz sollte dann wieder dem Ausgangswert (0min 4°C) entsprechen und die Differenz beider Messungen entspricht dem Lektinanteil der in den Lysosomen der Zelle vorliegt. Wenn der Wert, der nach der Monensinzugabe ermittelt wurde, unter dem Ausgangswert liegt, kann man davon ausgehen, dass ein Teil des internalisierten Lektins nicht in den Lysosomen akkumuliert oder wieder von der Zelloberfläche abdiffundiert ist.

4.3. Lektinbindungsstudie — Ergebnisse der einzelnen Zelllinien

4.3.1. SV HUC

SV HUC ist eine Blasenzelllinie, die von einem gesunden, männlichen Spender stammt. Für SV HUC zeigte die Oberflächenbindung der Lektine im Vergleich folgendes Lektinbindungspotential: WGA>LCA>UEA>PNA.

Die Ausgangsfluoreszenz der WGA-beladenen Zellen betrug im Durchschnitt 66,82FIU (fluorescence intensity units). Nach 90 min Inkubationszeit bei 37°C wurden im Durchschnitt nur mehr 37,23% der ursprünglich gemessenen Oberflächenbeladung detektiert. Man kann also davon ausgehen, dass 62,24% des gebundenen Lektins während der Inkubationszeit entweder internalisiert wurden oder von der Zelloberfläche abgelöst worden sind. Im Vergleich dazu zeigte LCA nur knapp ein Drittel der Oberflächenbeladung von WGA. Die Abnahme der detektierten Mean Fluorescence Intensity (MFI) innerhalb der Inkubationszeit betrug bei LCA 57,50%. Bei PNA und UEA hingegen konnten nur Beladungen von 1,12FIU bzw. 3,41FIU festgestellt werden. Nach der Zugabe von 10µl der Monensinlösung stieg innerhalb von 30min die MFI der mit WGA inkubierten Zellen wieder auf 64,62% des Ausgangswertes an. Dies deutet darauf hin, dass 35,38% des anfangs an die Oberfläche gebundenen Lektins von der Oberfläche losgelöst wurden und bei der Messung 2 nach 90min vielleicht gar nicht internalisiert wurden. Für PNA und UEA stieg die MFI auf 81,91% bzw. 62,21%. Bei PNA überschritt der nach Monensinzugabe gemessene Wert den Ausgangswert sogar um 52,41%.

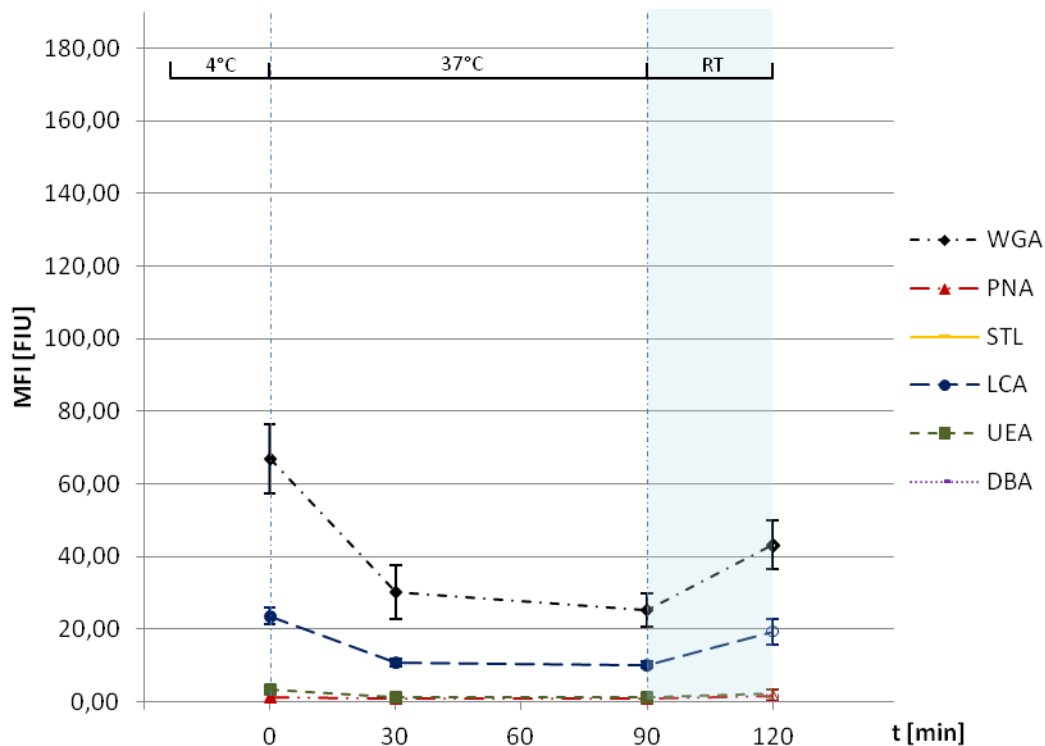


Abbildung 4-1:

MFI (SV HUC) inkl. Standardabweichung

Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C, Messungen bei 0min, 30min, 90min, zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe, abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

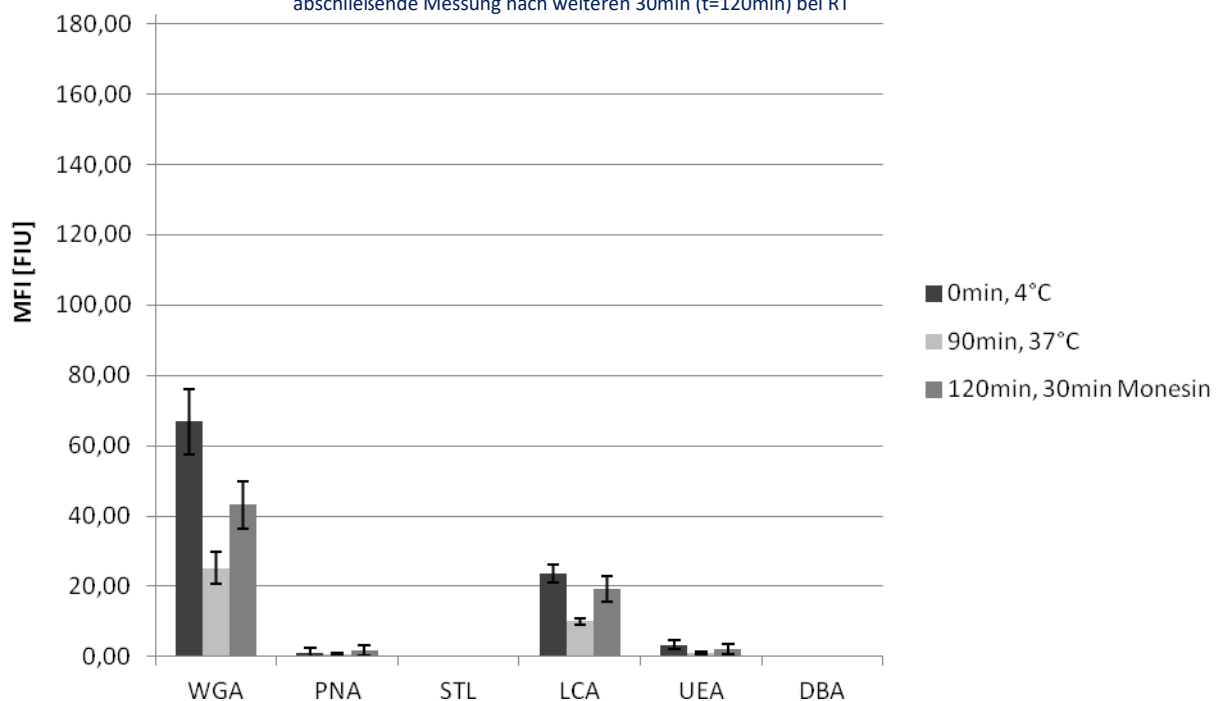


Abbildung 4-2:

MFI (SV HUC) inkl. Standardabweichung

dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Probentemperatur 4°C),
Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.2. 5637

5637 stellt eine Zelllinie des Tumorgades II dar. Sie stammt von einem 68 jährigen, männlichen Kaukasier.

5637 Zellen zeigten eine Lektin-Zell-Assoziation im folgenden Verhältnis: WGA>>LCA>PNA>UEA.

Mit einer MFI von 81,3FIU war die Oberflächenbeladung mit WGA deutlich am effektivsten. Sie nahm innerhalb der Inkubationszeit (90min) um 55,79% ab. Mit Monensin stieg die gemessene MFI wieder auf 67,07% des Ausgangswertes.

Der Ausgangswert von LCA betrug 19,31FIU und sank nach 90min bei 37°C auf 42,35%. Durch den Zusatz von Monensin konnte die MFI wieder auf 14,70FIU angehoben werden.

UEA zeigte zu Beginn eine MFI von 10,75FIU, die in der Internalisationszeit (90min) um 64,10% sank und mit Monensin wieder 55,15% des Beladungswertes erreichte.

Die Oberflächenbindung mit PNA betrug 3,35FIU. Innerhalb der Inkubationszeit sank sie auf 1,47% und stieg durch die Behandlung mit Monensin wieder auf 3,00FIU an.

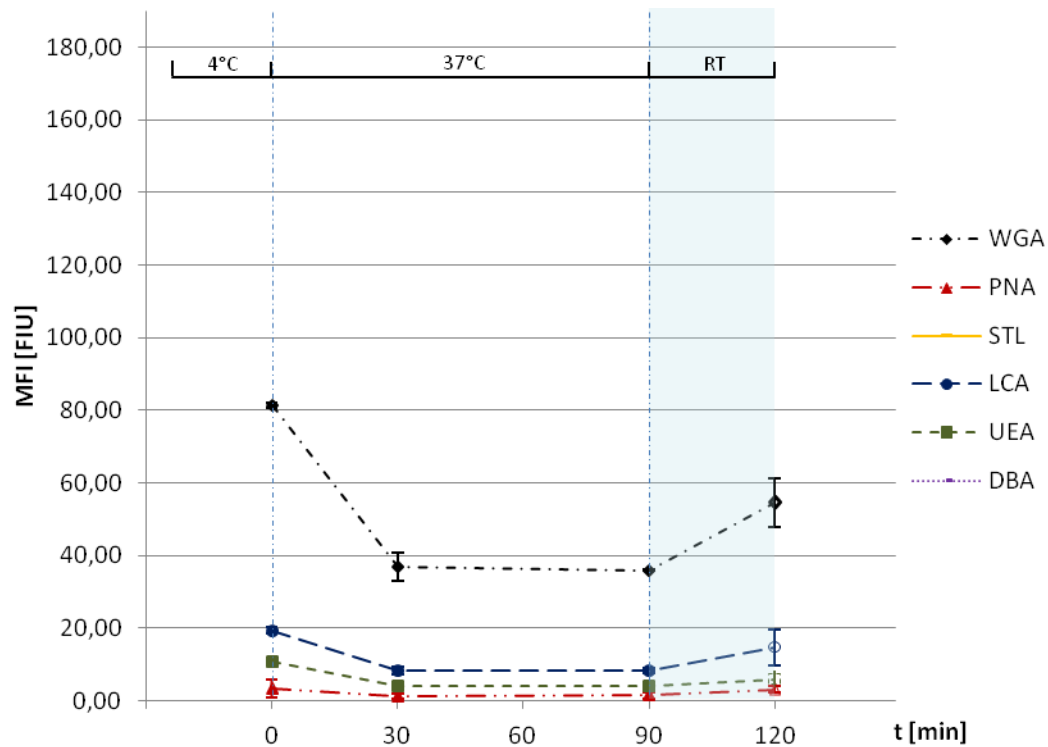


Abbildung 4-3: MFI (5637) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

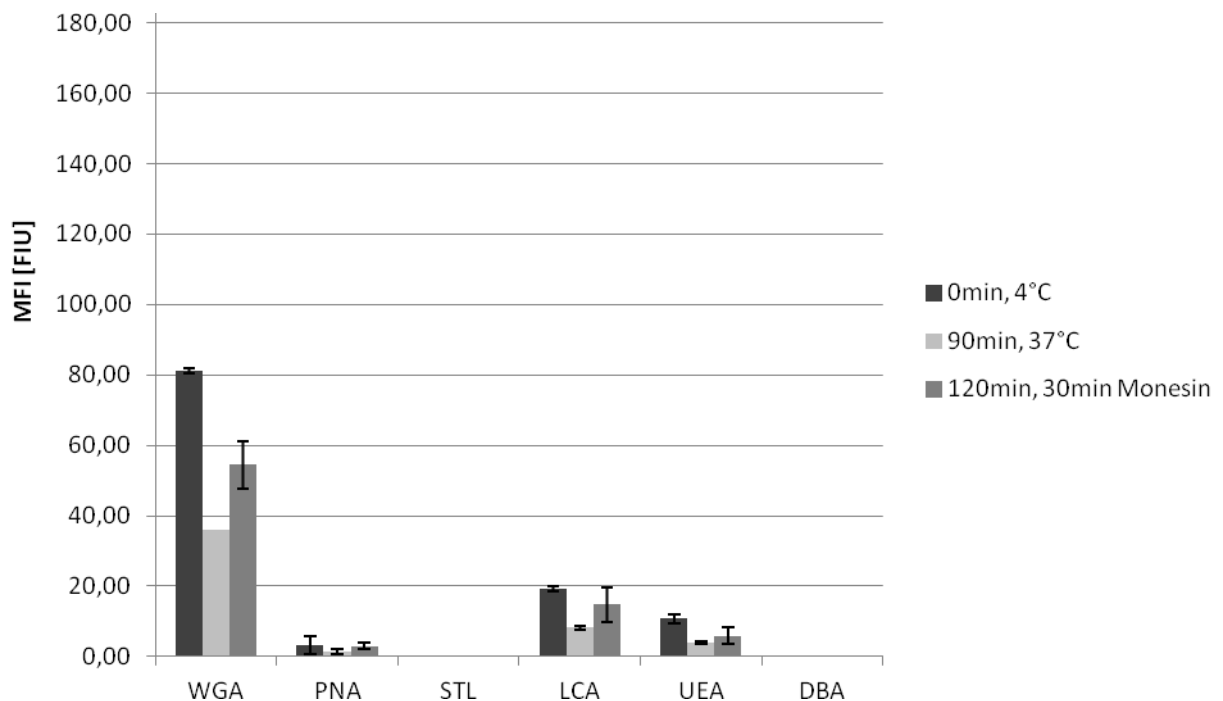


Abbildung 4-4: MFI (5637) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Probentemperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.3. T24

Die Zelllinie T24 stammt von einer 81 jährigen Kaukasierin und beinhaltet Blasenzellen des Tumorgrades 3. Hier zeigte sich zu Beginn eine Oberflächenbeladung im Verhältnis: WGA>STL>LCA>UEA>PNA>DBA.

WGA war auch hier das Lektin mit der höchsten Beladungskapazität, wobei zunächst eine Oberflächenbeladung mit einer MFI von 127,64FIU festgestellt werden konnte. Nach der 90-minütigen Inkubationszeit sank der Wert auf 42,94FIU. Nach Zugabe von Monensin stieg die MFI wieder auf 83,50FIU.

Bei STL konnte ein Ausgangswert von 75,47FIU gemessen werden. Innerhalb von 90min bei 37°C sank die Oberflächenbeladung um 57,47% und stieg nach der Behandlung mit Monensin wieder auf 44,59% des Ausgangswertes an.

LCA zeigte mit T24 eine Oberflächenbeladung von 18,18FIU. Während der Inkubation nahm sie um 68,98% ab und nahm durch nach Zusatz von Monensin wieder 70,08% des Ausgangswertes an.

Mit UEA konnte eine Oberflächenbeladung von 16,66FIU erreicht werden. Im Verlauf der Inkubation sank die gemessene MFI auf 7,8FIU und innerhalb der Behandlung mit Monensin sank sie weiter auf 5,3FIU.

PNA und DBA erreichten nur eine geringe Bindung von 0,57FIU bzw. 0,1FIU.

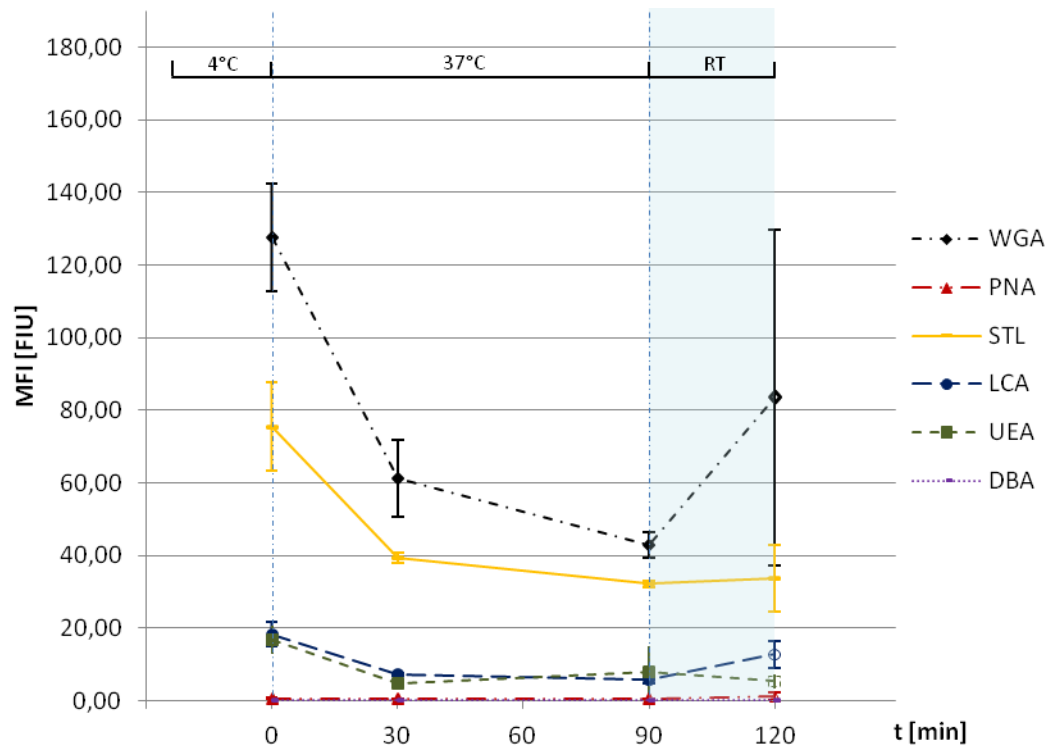


Abbildung 4-5: MFI (T24) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

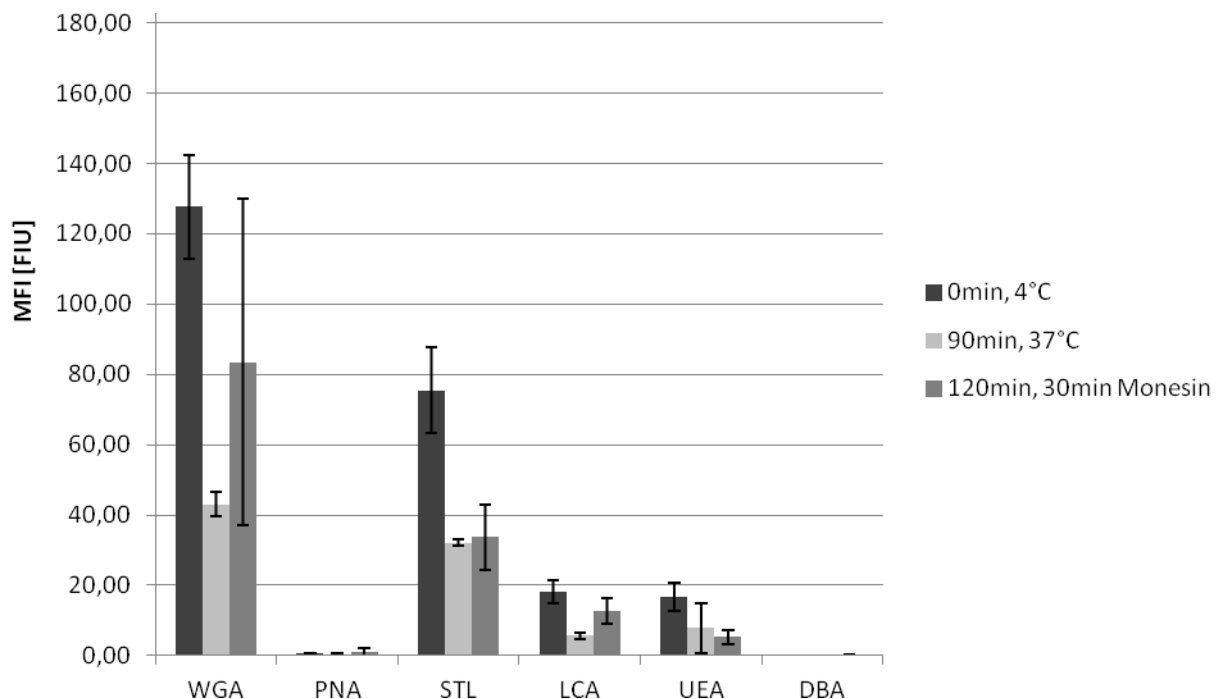


Abbildung 4-6: MFI (T24) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.4. 647V

647V stammt aus einem malignen Urothelkarzinom (Grad 2), das aus einem männlichen Patienten stammt. Das Verhältnis der Oberflächenbindung der unterschiedlichen Lektine mit 674V lässt sich wie folgt beschreiben: UEA>STL>WGA>LCA>PNA>DBA.

647V Zellen zeigten mit UEA die höchste MFI von 85,08FIU. Innerhalb des Versuchs (90min) sank sie um 49,85% und stieg nach Monensinzugabe wieder auf 55,57FIU.

Die Ausgangswerte bei STL lagen bei 79,70FIU und nahmen um 40,55% ab und erhöhten sich mit Monensin wieder auf 76,16% des Ausgangswertes.

Mit WGA konnte zu Beginn eine Oberflächenbeladung von 55,81FIU festgestellt werden, die innerhalb der 90-minütigen Inkubationszeit auf 17,28FIU sank und mit der Monensinzugabe wieder auf 36,62FIU anstieg.

Bei LCA konnte eine MFI von 32,20FIU detektiert werden, die im Rahmen des Versuchs um 64,20% abnahm und mit Monensin auf 71,09% des Ausgangswertes stieg.

PNA und DBA zeigten mit 4,41FIU bzw. 0,25FIU nur ein geringes Bindungspotential an der Oberfläche von 647V.

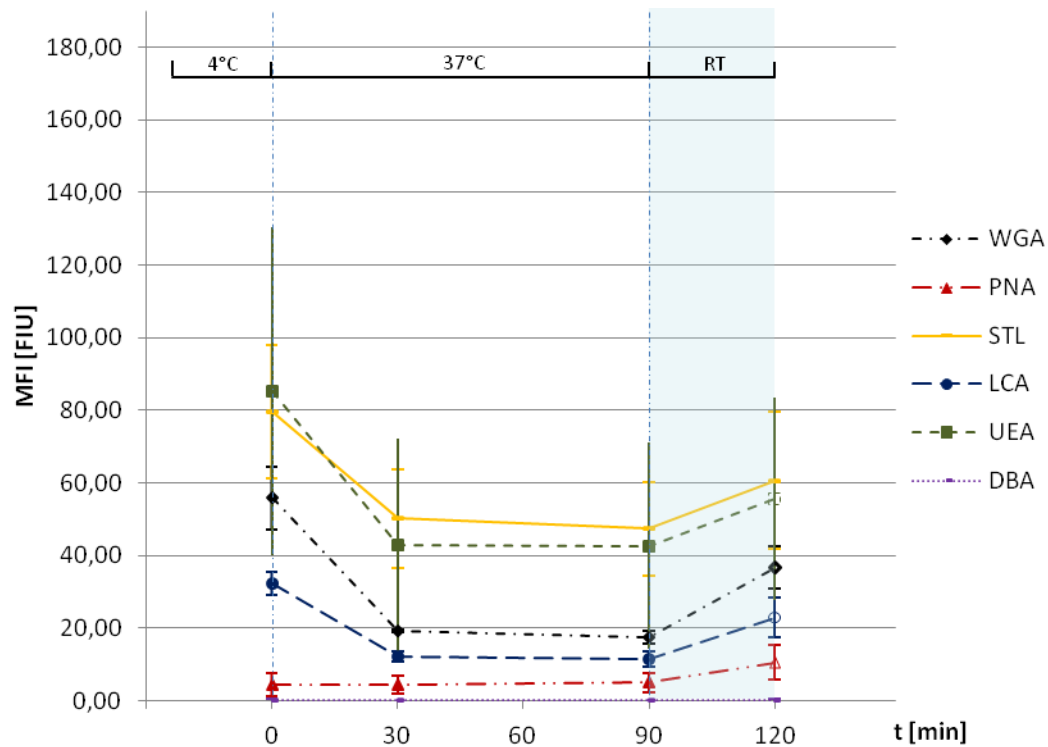


Abbildung 4-7:

MFI (647V) inkl. Standardabweichung

Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C, Messungen bei 0min, 30min, 90min, zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe, abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

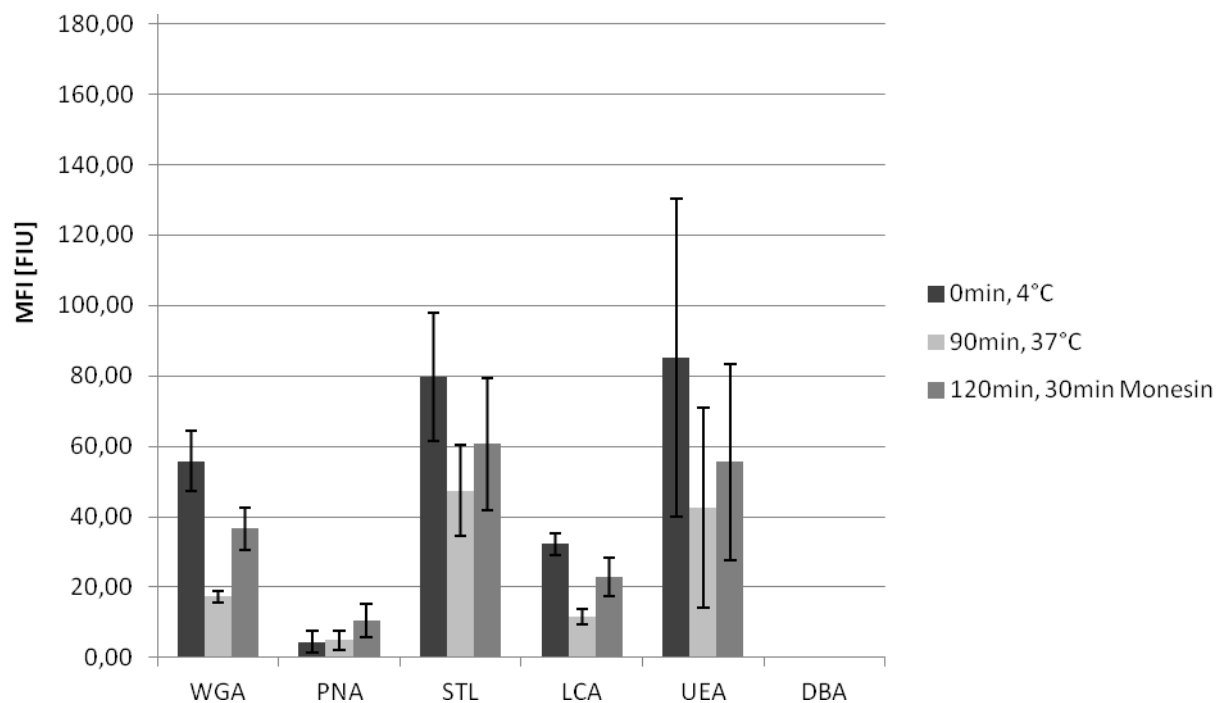


Abbildung 4-8:

MFI (647V) inkl. Standardabweichung

dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Probentemperatur 4°C),
Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.5. RT112

RT112 ist eine Zelllinie des Tumorgades 2. Hier wurde WGA signifikant besser an die Oberfläche gebunden als die anderen Lektine. Im direkten Vergleich zeichnete sich folgendes Verhältnis in der Oberflächenbindung der Lektine ab: WGA>>STL>LCA>UEA>PNA>DBA.

WGA wurde mit einer MFI von 66,88FIU an die Oberfläche gebunden. Nach der Inkubationszeit (90min) nahm die gemessene MFI um 63,17% ab. Nach der Monensinzugabe stieg die MFI wieder auf 74,40% des Ausgangswertes.

STL und LCA zeigten mit einer MFI von 12,95FIU bzw. 11,27FIU eine sehr ähnliche Bindungskapazität. Auch die nach 90 Minuten gemessenen Werte lagen nahe beisammen: die gemessene Fluoreszenzintensität der mit STL behandelten Zellen nahm um 59,61% ab, die mit LCA behandelten um 58,74%.

UEA, PNA und DBA banden kaum an die Oberfläche der RT112. Ihre MFI betrug lediglich 1,97FIU, 0,52FIU und 0,12FIU.

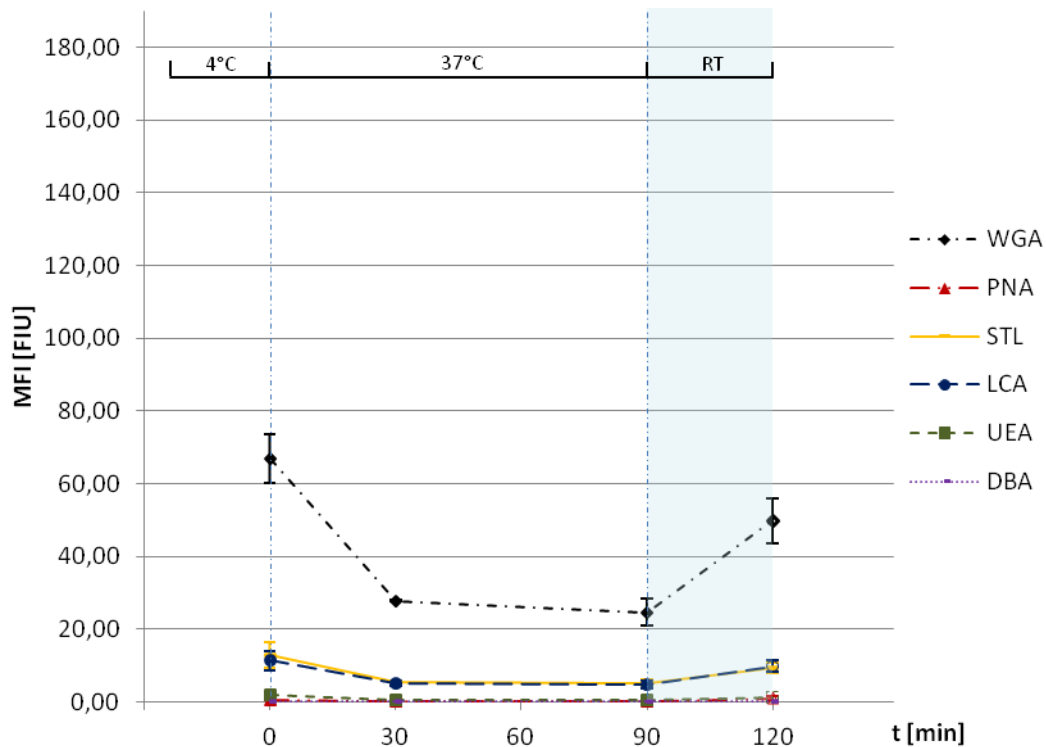


Abbildung 4-9: MFI (RT112) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

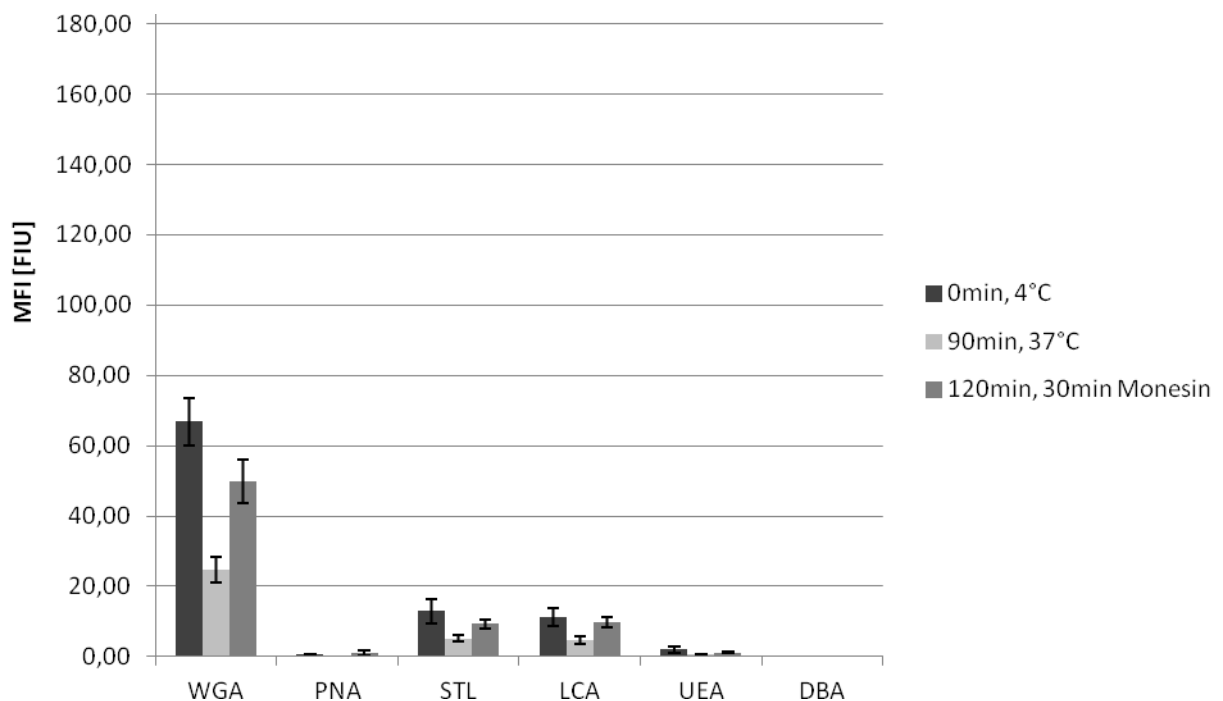


Abbildung 4-10: MFI (RT122) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.6. HT1376

HT1376 stellen Blasenkarzinomzellen des dritten Grades dar. Sie stammen von einer 58-jährigen Kaukasierin. HT1376 Zellen zeigten folgendes Bindungsverhältnis: WGA>LCA>STL>PNA>UEA>DBA.

Bei der Messung von WGA an HT1376 wurde eine MFI von 37,58FIU ermittelt. Diese sank in der neunzigminütigen Inkubationszeit bei 37°C auf 42,50% und erreichte nach Monensinzugabe wieder 61,02% des Ausgangswertes.

Mit LCA wurde zunächst eine MFI von 20,32FIU gemessen. Im Versuchsverlauf sank sie auf 10,2FIU und stieg mit Monensin wieder auf 13,65FIU.

Die Oberflächenbeladung mit STL betrug im Mittel 10,13FIU. Innerhalb der Inkubationszeit (30min) nahm die MFI der STL-behandelten Zellen um 48,0% ab. Durch Monensin konnte hier nur eine geringfügige Steigerung der MFI detektiert werden.

PNA, UEA und DBA zeigten nur eine vergleichsweise geringe Oberflächenbeladung von 4,17FIU, 2,17FIU und 0,20FIU.

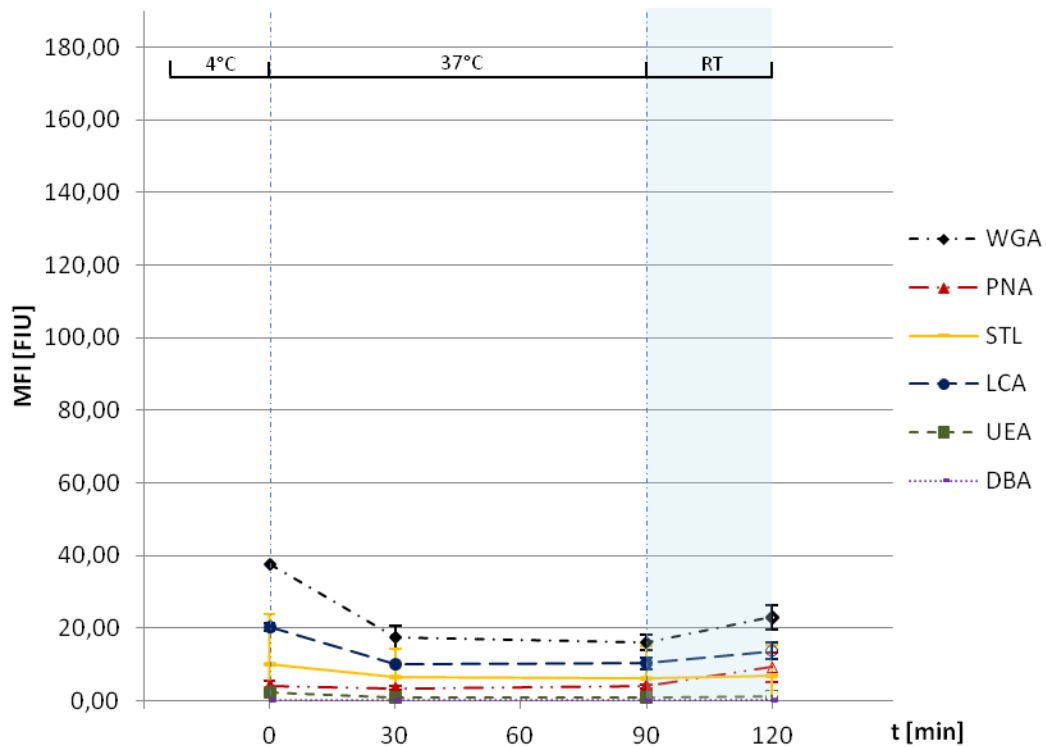


Abbildung 4-11: MFI (HT1376) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

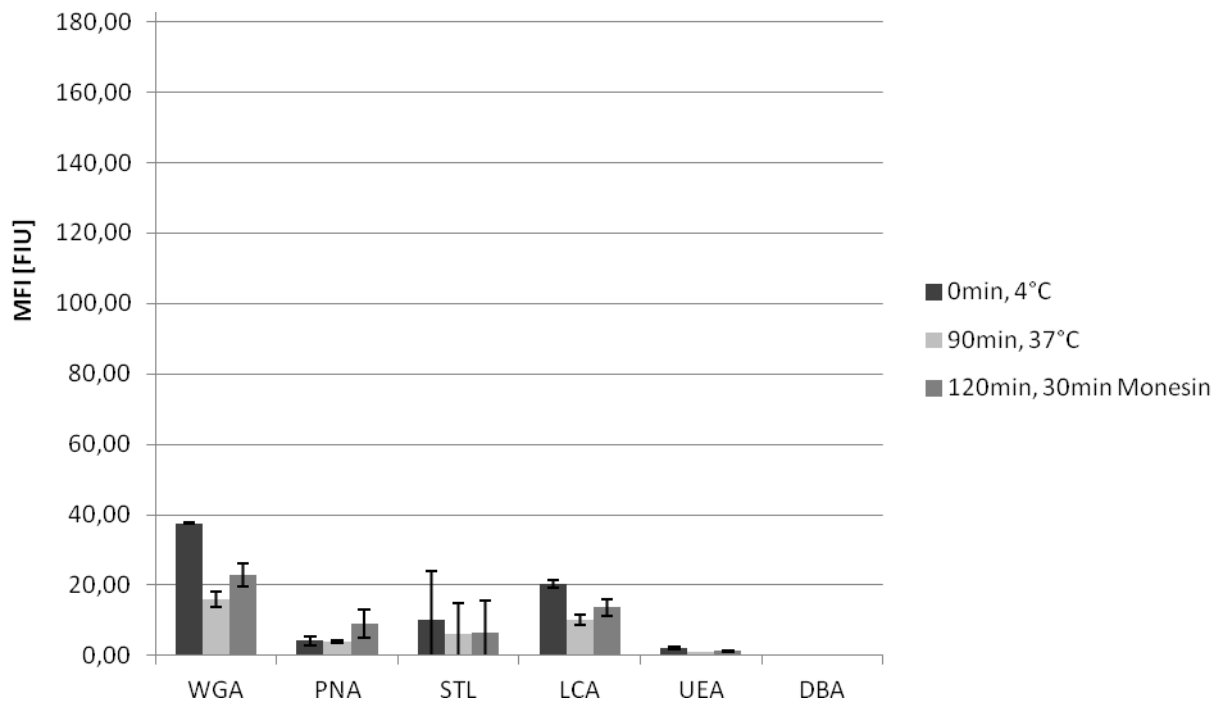


Abbildung 4-12: MFI (HT1376) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.7. Primärzellen – Tumor (129T)

129T stammten von einem männlichen, 72 jährigen Patienten. Nach der 2. Passagierung konnte mit diesen Zellen eine Studie mit den Lektinen WGA, PNA, LCA und UEA durchgeführt werden.

Für 129Tp2 konnte mit WGA eine Oberflächenbindung von 126,25FIU gemessen werden. 54,46% des gebundenen WGAs wurden internalisiert. Monensin führte zum Anstieg der MFI auf 81,70% des Ausgangswertes.

Mit LCA konnte eine MFI von 31,80FIU erreicht werden. Nach Inkubation (90min) bei 37°C sank diese auf 16,80FIU. Nach Monensinzugabe stieg die MFI wieder auf 83,65% des Ausgangswertes.

Mit UEA wurde eine MFI von 29,03FIU gemessen, die nach Ablauf der Inkubationszeit (90min) um 50,05% abnahm. Mit Monensin stieg die gemessene MFI wieder auf 22,67FIU an.

PNA zeigte mit 1,90FIU ein eher sehr geringes Bindungspotential an der 129Tp2 Oberfläche.

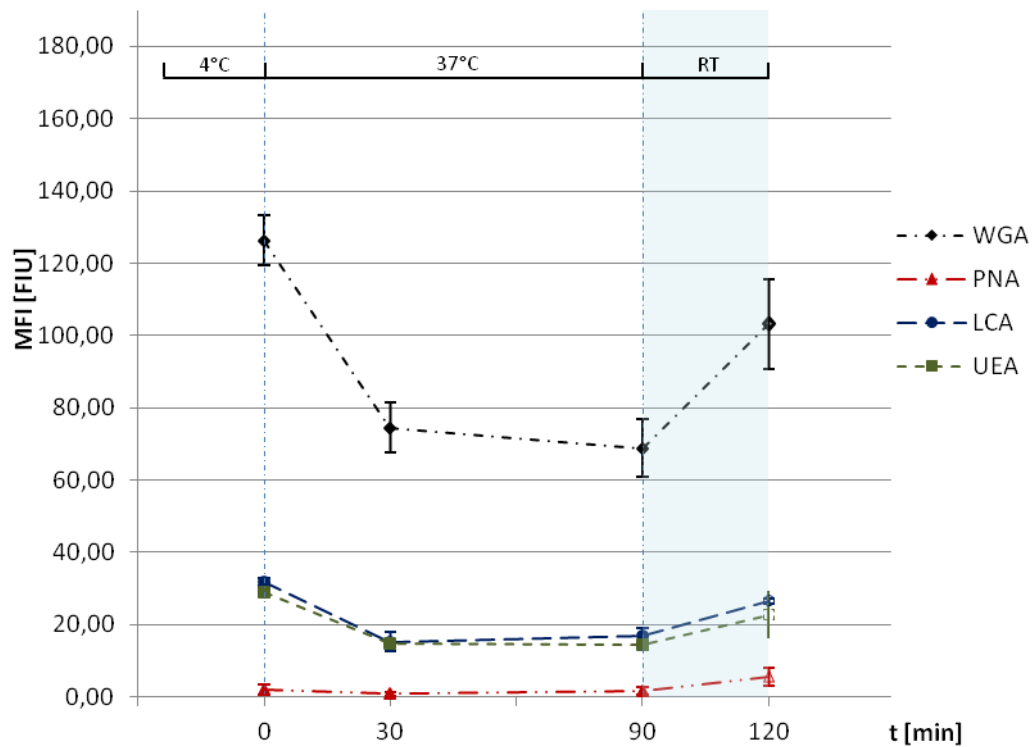


Abbildung 4-13: MFI (129Tp2) inkl. Standardabweichung
Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
Messungen bei 0min, 30min, 90min,
zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

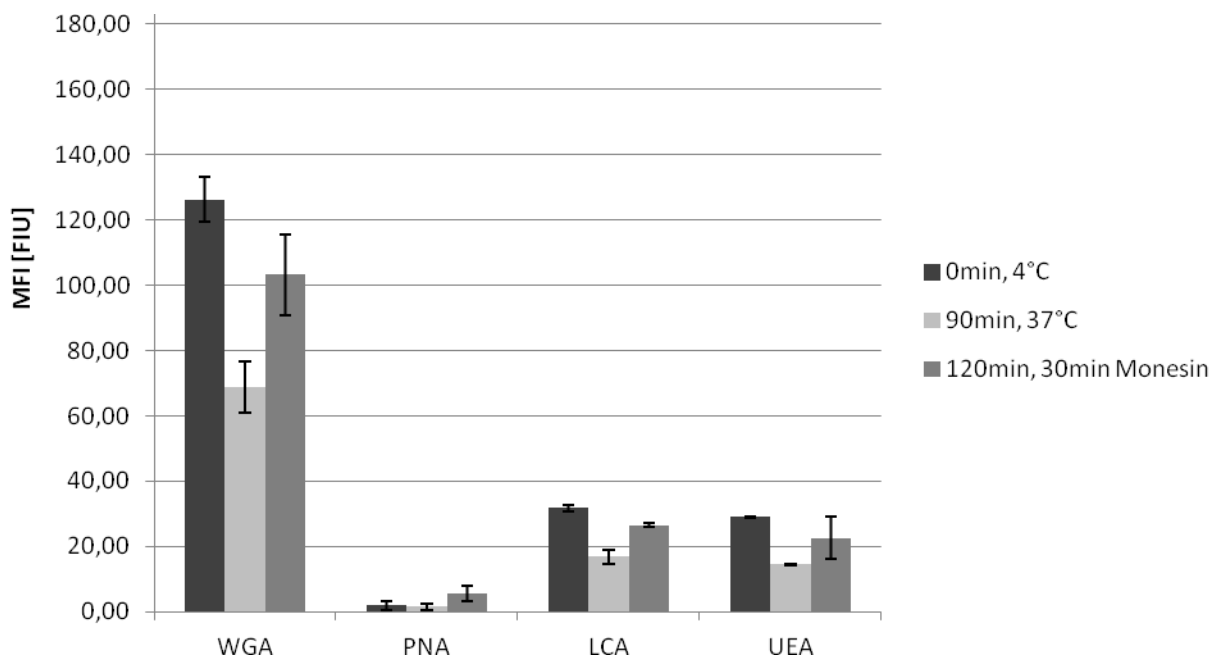


Abbildung 4-14: MFI (129Tp2) inkl. Standardabweichung
dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
Messung nach 90min Inkubationzeit (Inkubationstemperatur 37°C)
Messung nach weiteren 30min Inkubationzeit mit Monensin

4.3.8. Primärzellen – Tumor (130T)

Bei 130T handelte es sich um Tumorzellen, die von einem männlichen Spender stammten. Diese Zellen konnten dreimal passagiert werden und der beschriebene Versuch wurde zweimal durchgeführt.

130Tp2

Für die Passage 2 (130Tp2) konnten aufgrund eines bakteriellen Befalles nur für WGA Bindung und Internalisation bestimmt werden.

WGA zeigte bei 130Tp2 eine Oberflächenbeladung von 109,10FIU die im Verlauf der Inkubation bei 37°C (90 min) um 25,62% sank und durch die Behandlung mit Monensin wieder auf 89,37% des Ausgangswertes anstieg.

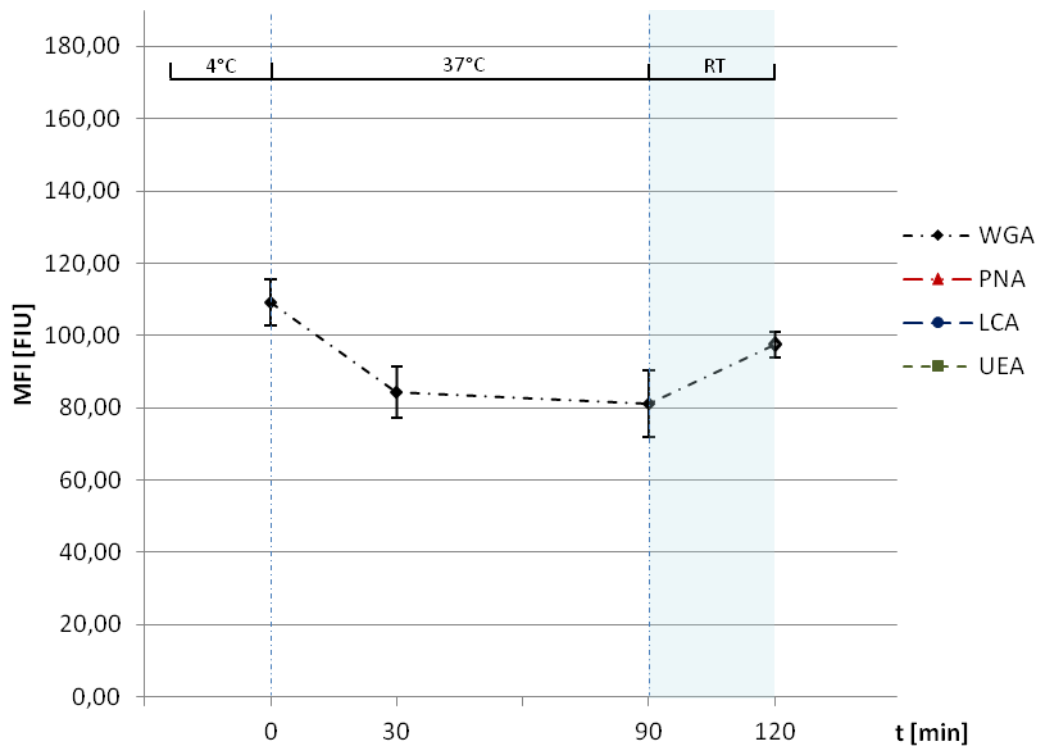


Abbildung 4-15: MFI (130Tp2) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

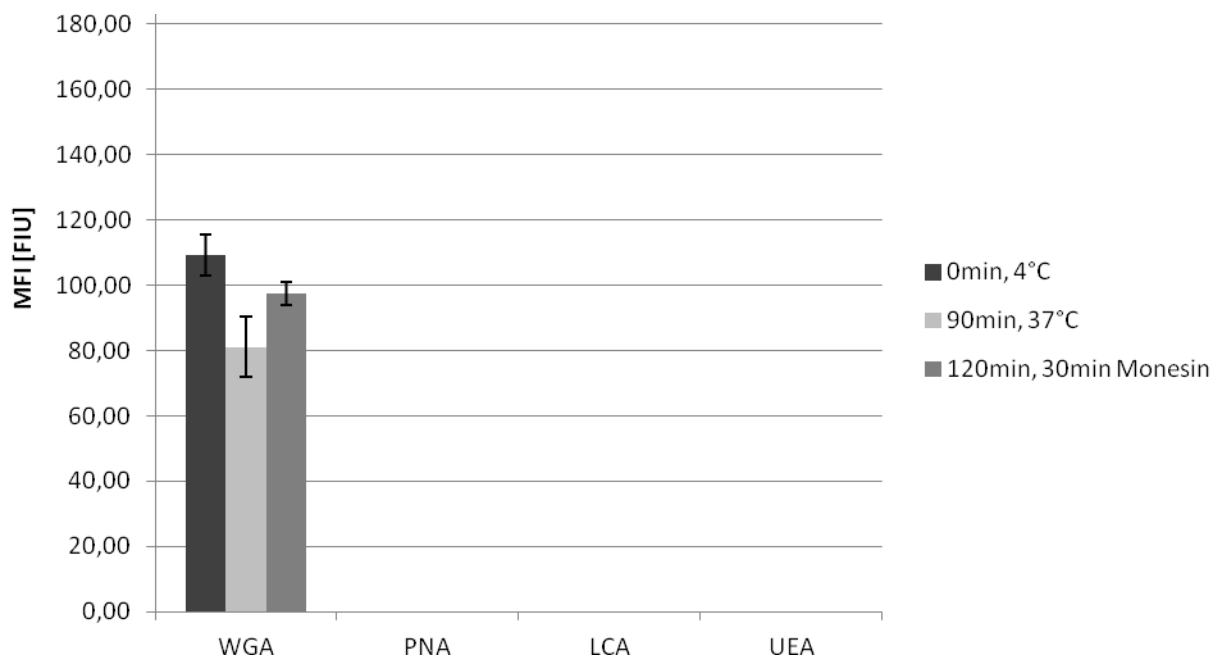


Abbildung 4-16: MFI (130Tp2) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

130Tp3

Mit der 3.Passage (130Tp3) konnte das Oberflächenbindungspotential für WGA, PNA, LCA und UEA bestimmt werden.

Im Gegensatz zu 130Tp2, konnte hier eine um 37% höhere Beladung mit WGA (149,95FIU) gemessen werden. Durch Inkubation (90min) unter physiologischen Bedingungen sank die MFI um 39,58% und stieg nach Monensinbehandlung wieder auf 46,82% des Ausgangswertes an.

LCA zeigte ein Oberflächenbindungspotential von 55,67FIU, das mit der Inkubation auf 35,80FIU sank und durch die Monensinbehandlung auf 64,43% des Ausgangswertes anstieg.

Mit PNA und UEA konnten nur eine eher geringe MFI von ca. 7FIU gemessen werden.

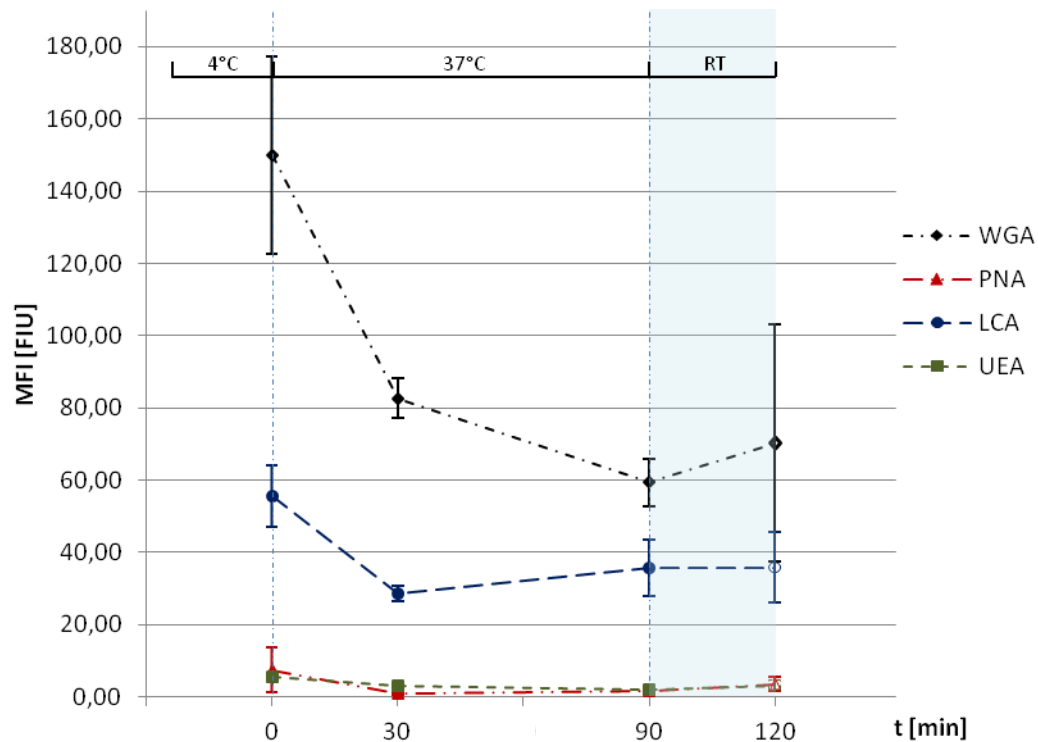


Abbildung 4-17: MFI (130Tp3) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

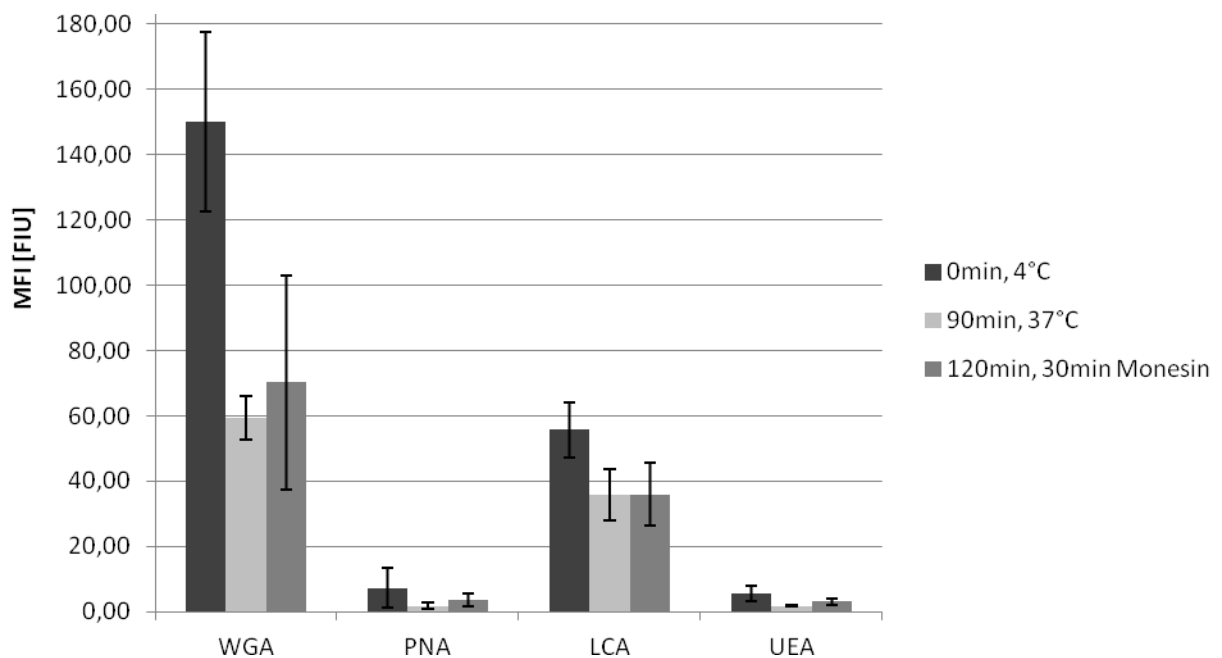


Abbildung 4-18: MFI (130Tp3) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.9. Primärzellen – Tumor (135Tp3)

135T stammten von einem männlichen, zweiundsechzigjährigen Patienten; analysiert wurde hier die 3. Passage.

Bei 135Tp3 konnte für WGA eine Oberflächenbindung von 131,75FIU festgestellt werden. Nach einer Inkubation von 90min nahm die MFI um 41,78% ab. Monensin führte zum Anstieg der MFI auf 87,49% des Ausgangswertes.

Bei der Behandlung mit LCA wurde eine MFI von 20,00FIU detektiert, die innerhalb der neunzigminütigen Inkubationszeit auf 16,23FIU sank und durch die Monensinzugabe wieder auf 17,73FIU stieg.

Für UEA lag die MFI zunächst bei 5,4FIU. Sie sank im Verlauf der Inkubation bei 37°C um 44,40% und stieg nach der Behandlung mit Monensin nur geringfügig an.

Mit PNA wurde zunächst eine MFI von 2,83FIU gemessen, die auf 2,07FIU sank und änderte sich mit Monensin kaum.

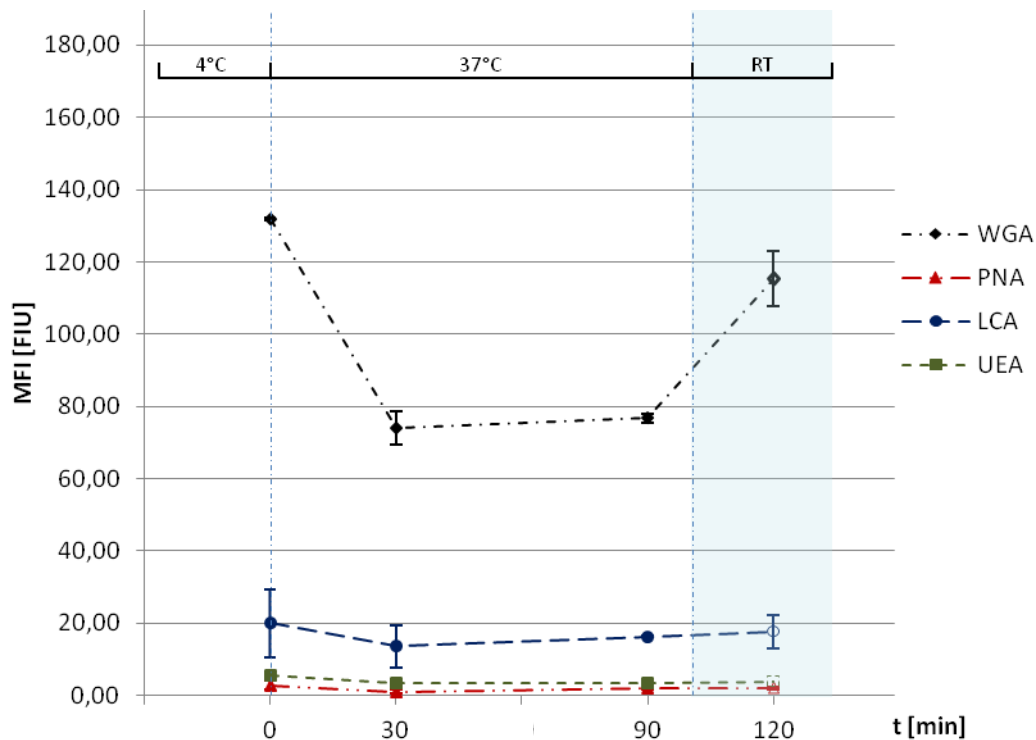


Abbildung 4-19: MFI (135Tp3) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

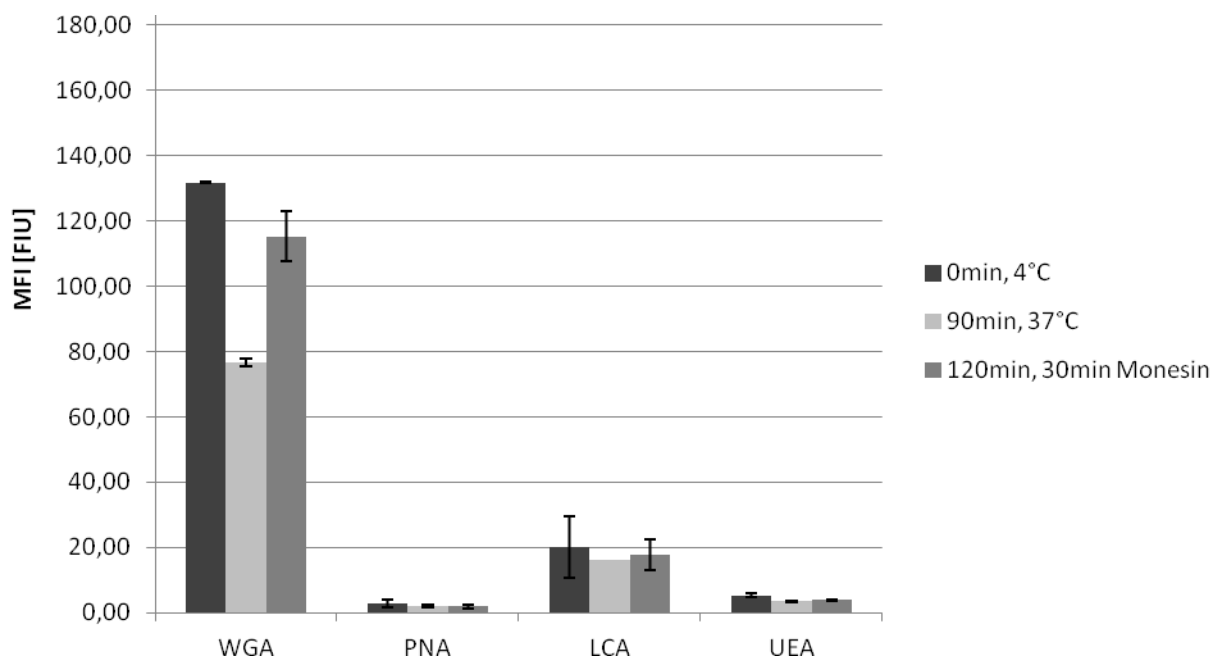


Abbildung 4-20: MFI (135Tp3) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.10. Primärzellen – Tumor (136Tp1)

Die Zellen 136T stammten von einem männlichen, neunundvierzigjährigen Patienten, verwendet wurde hier Passage 1.

Die MFI der Zellen nach Beladung mit WGA betrug hier im Durchschnitt 171,13FIU. Nach einer Inkubationszeit (90min) bei 37°C konnten allerdings im Durchschnitt nur mehr 60,34% der ursprünglichen MFI detektiert werden. Mittels Monensin war ein Anstieg der MFI auf 80,11% des Ausgangswertes zu beobachten.

Die LCA-Bindung zeigte bei 136Tp1 einen Ausgangswert von 61,27FIU. Die Abnahme der zellassoziierten Fluoreszenzintensität innerhalb einer Inkubationszeit von 90min betrug 15,94FIU. Die nach Monensinbehandlung gemessenen MFI lag mit 65,00FIU über dem Ausgangswert.

Für UEA konnte eine MFI von 24,97FIU nachgewiesen werden, die nach 90 Minuten auf 55,95% des Ausgangswertes sank und mit Monensin wieder 75,15% des Ausgangswertes erreichte.

Für PNA konnte eine nur sehr geringe Oberflächenbeladung von 2,50FIU festgestellt werden. Nach Inkubation bei 37°C wurde eine MFI von 2,70FIU und nach Monensinzugabe von 2,85FIU gemessen.

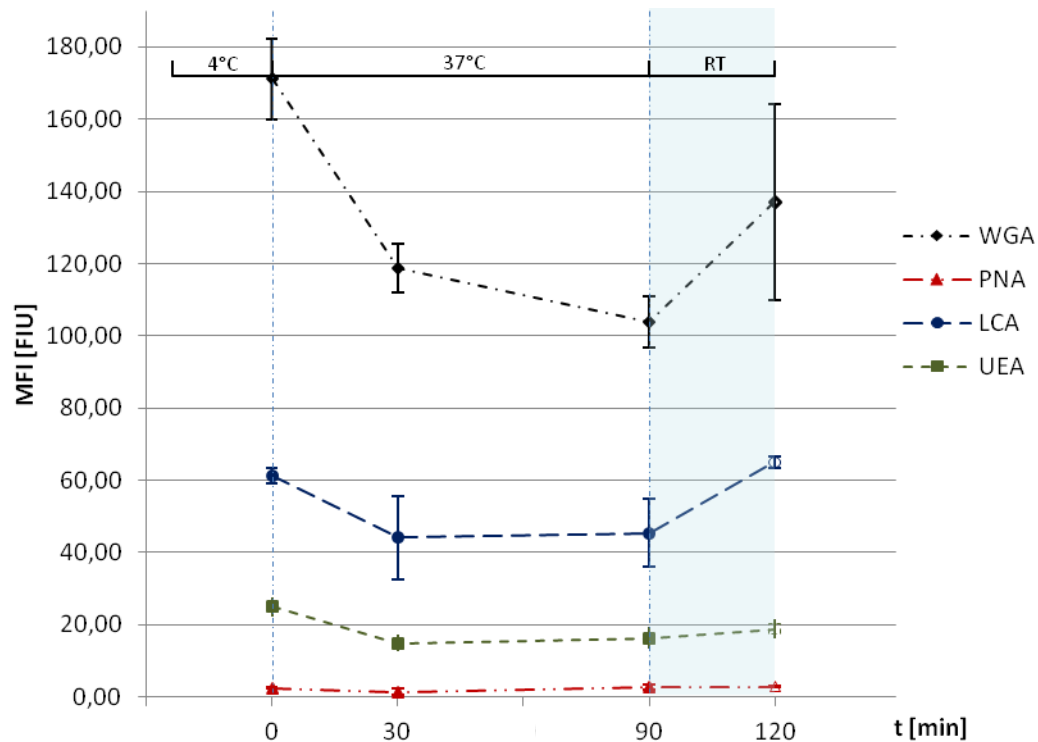


Abbildung 4-21: MFI (136Tp1) inkl. Standardabweichung
Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C, Messungen bei 0min, 30min, 90min, zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe, abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

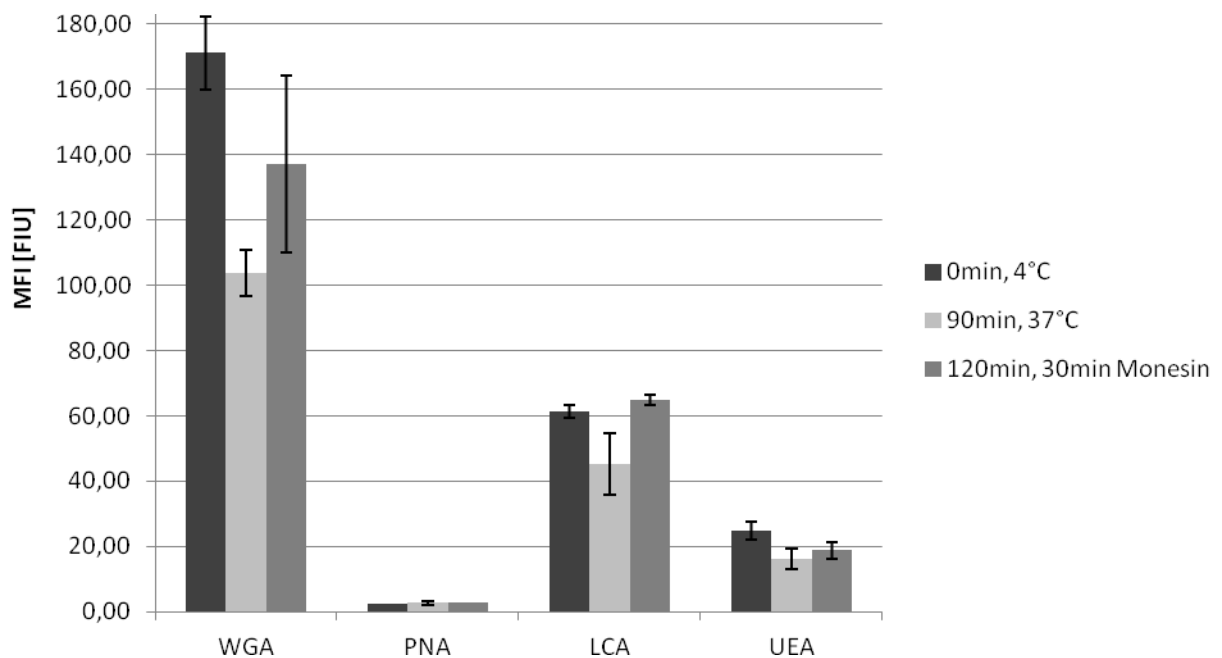


Abbildung 4-22: MFI 136Tp1) inkl. Standardabweichung
dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
Messung nach 90min Inkubationzeit (Inkubationstemperatur 37°C)
Messung nach weiteren 30min Inkubationzeit mit Monensin

4.3.11. Primärzellen – Tumor (Tp HUC) Zusammenfassung

Die Lektinbindungsstudie an Primärzellen aus Tumormaterial wurde mit WGA, PNA, LCA und UEA durchgeführt. Insgesamt konnten 5 Analysen mit Tp HUC durchgeführt werden, wobei diese 4 Gewebeproben entstammten.

An Tp HUC konnte für WGA im Mittel eine Oberflächenbindung von 137,64FIU bestimmt werden. Bis zu 43,37% des oberflächlich gebundenen WGA könnten nach einer Inkubationsdauer von 90 min bei 37°C in internalisierter Form vorliegen. Monensin führte hier zum Anstieg der MFI auf 76,02% des Ausgangswertes.

Mit LCA wurde zunächst eine MFI von 52,65FIU bestimmt, die innerhalb der Inkubationszeit (90min) auf 35,56 FIU sank und durch die Monensinzugabe wieder auf 45,28 stieg.

Die für UEA ermittelte MFI an Tp HUC betrug 16,24FIU. Sie sank im Zuge der Internalisation um 44,40% und nahm nach Monensinzusatz wieder um 34,33% zu.

Für PNA konnte eine vergleichsweise nur sehr geringe Oberflächenbeladung mit einer MFI von lediglich 3,65FIU festgestellt werden.

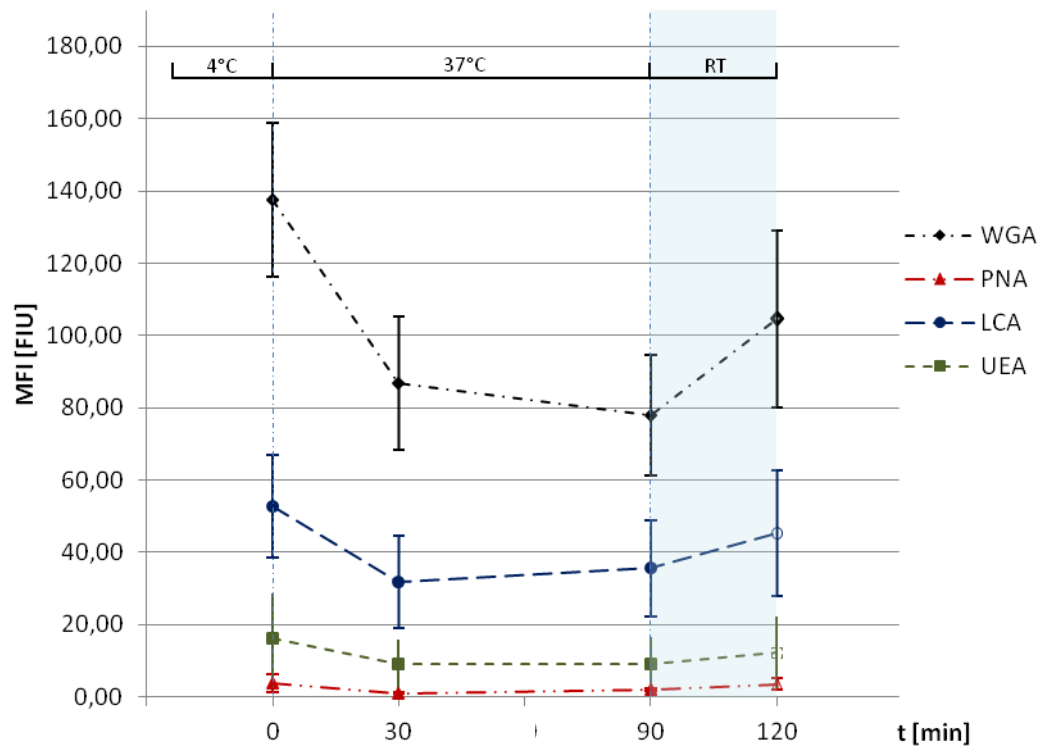


Abbildung 4-23: MFI (Tp HUC) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

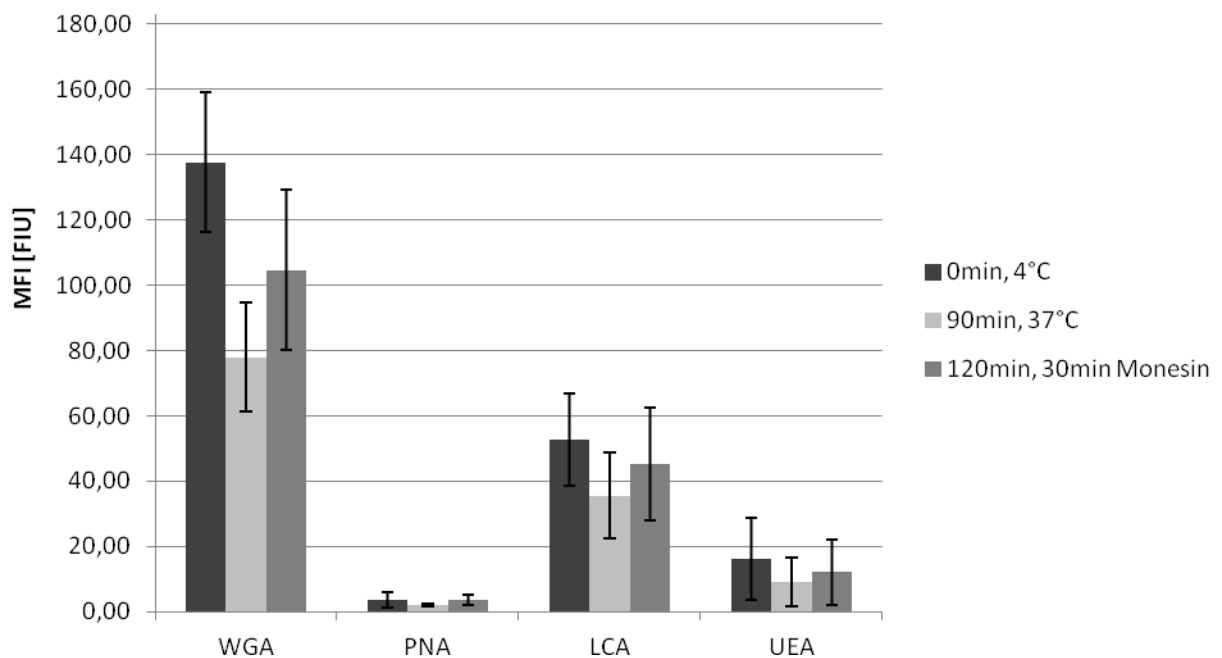


Abbildung 4-24: MFI (Tp HUC) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationzeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationzeit mit Monensin

4.3.12. Primärzellen – gesund (135G)

135G stammt von einem männlichen, zweiundsechzigjährigen Patienten. Mit der Gewebeprobe 135G konnte die Untersuchung mit den Lektinen WGA, PNA, LCA und UEA insgesamt zweimal durchgeführt werden:

135Gp1

In der ersten Studie zeigte WGA zu den gesunden Primärzellen der Probe 135G mit einer gemessenen MFI von 111,03FIU das insgesamt höchste Bindungspotential aller getesteten Lektine. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 90 min bei 37°C konnten nur mehr 60,31% der Ausgangsfluoreszenz detektiert werden. Nach Behandlung mit Monensin stieg die MFI wieder auf 77,12% der Ausgangsfluoreszenz an.

Mit LCA behandelte Zellen zeigten eine MFI von 23,75FIU. Sie sank unter den Inkubationsbedingungen auf 16,0FIU und stieg nach Monensinzugabe auf 23,45FIU.

Für mit dem Lektin UEA behandelte Zellen lag die detektierte MFI zunächst bei 10,47FIU. Nach neunzigminütiger Inkubation bei 37°C betrug sie 5,77FIU und stieg nach der Inkubation mit Monensin bei Raumtemperatur auf 62,37% des Ausgangswertes an.

Für PNA konnte erneut nur eine sehr geringe Bindung mit einer MFI von 1,23FIU beobachtet werden.

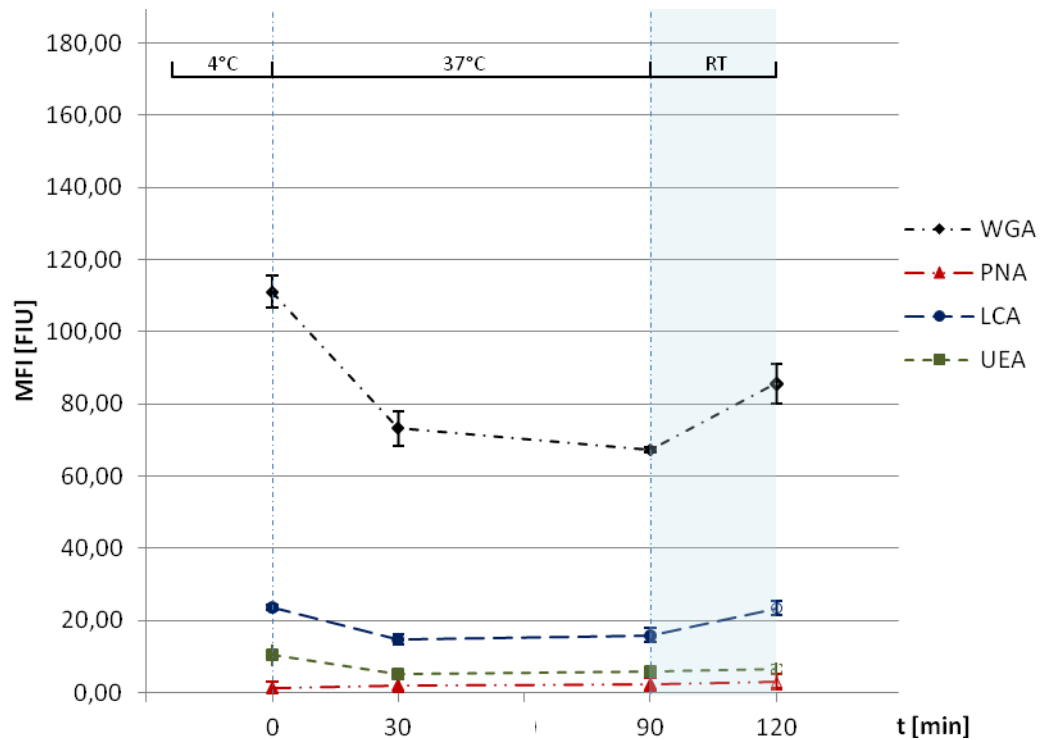


Abbildung 4-25: MFI (135Gp1) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

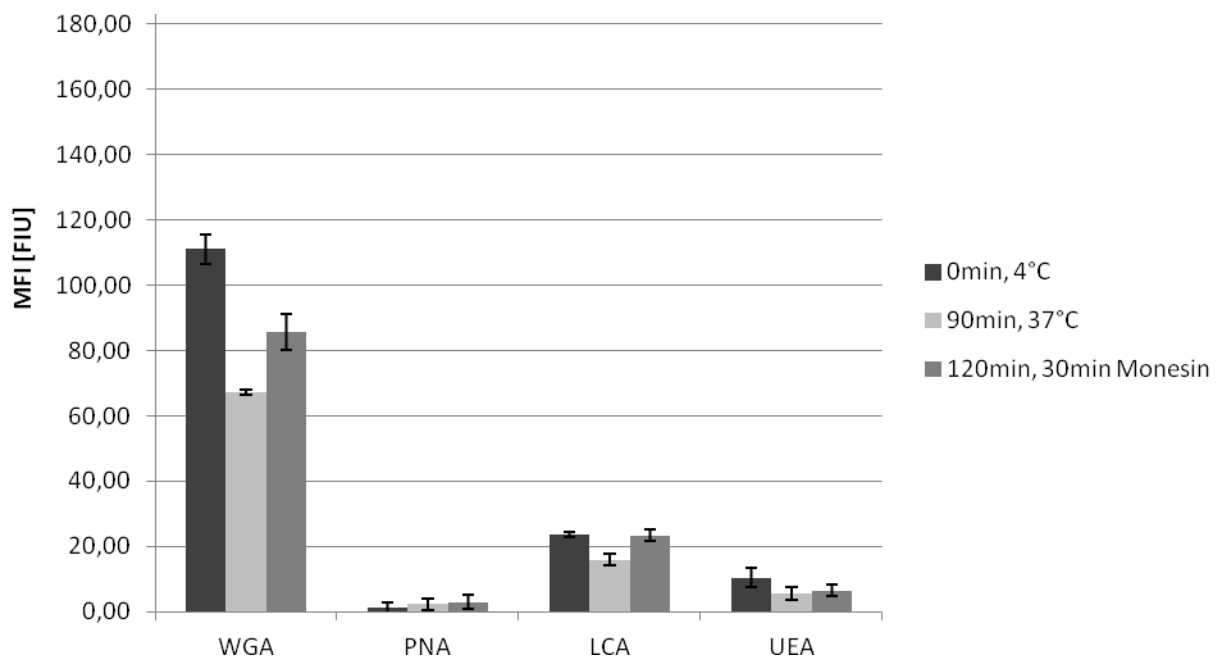


Abbildung 4-26: MFI (135Gp1) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationzeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationzeit mit Monesin

135Gp2

Für WGA konnte in Studie 2 eine noch etwas stärker ausgeprägte Oberflächenbeladung von 150,05FIU gemessen werden. Sie nahm im Verlauf der Inkubation bei 37°C um 52,01% ab und stieg nach der Monensinzugabe wieder auf 109,17FIU.

LCA zeigte zu Beginn eine MFI von 41,40FIU. Im Zuge der neunzigminütigen Inkubation bei 37°C sank die MFI auf 23,00FIU. Nach Zusatz von Monensin konnte eine MFI von 36,43FIU bestimmt werden.

Die detektierte Oberflächenbeladung mit UEA betrug 12,57FIU. Im Verlauf der Inkubation sank sie auf 6,75FIU und wurde mit Monensin wieder auf 10,67FIU erhöht.

Die für PNA gemessene MFI lag bei 3,6FIU.

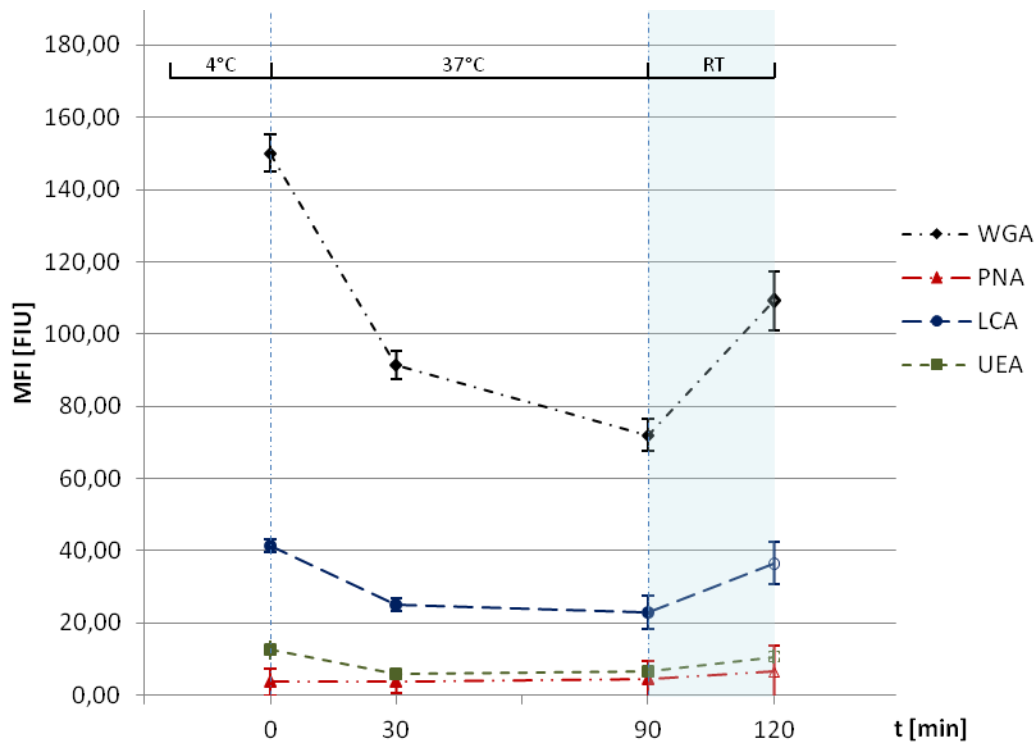


Abbildung 4-27: MFI (135Gp2) inkl. Standardabweichung
Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
Messungen bei 0min, 30min, 90min,
zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

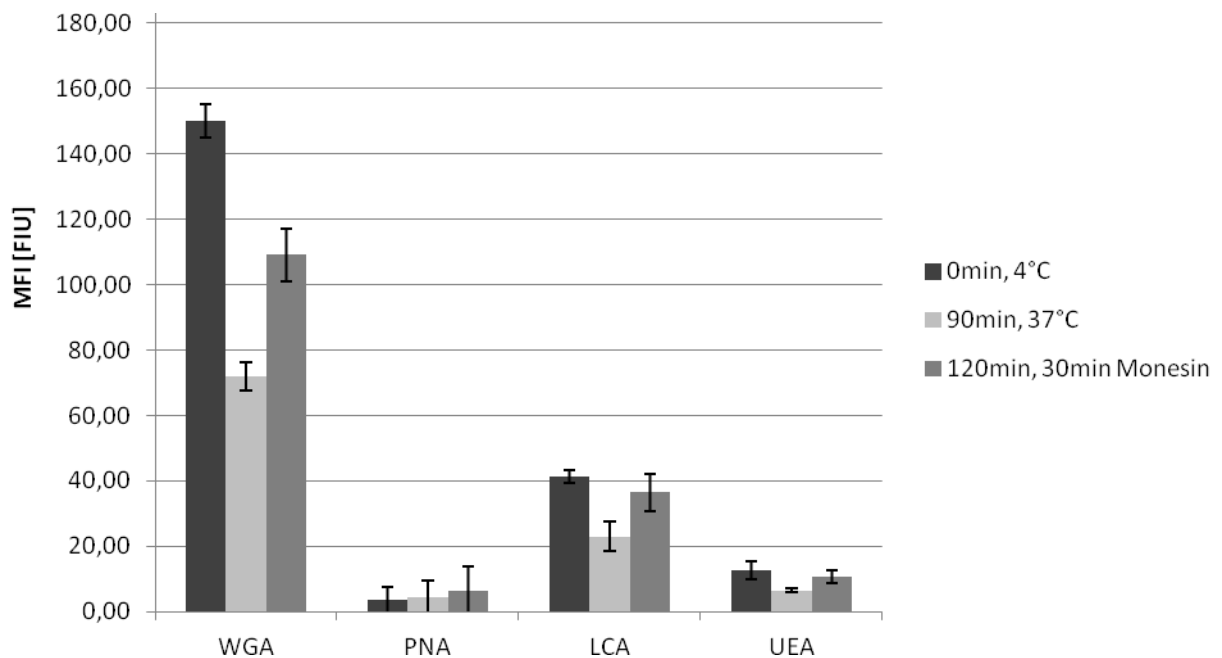


Abbildung 4-28: MFI (135Gp2) inkl. Standardabweichung
dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Probentemperatur 4°C),
Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.13. Primärzellen – gesund (137G)

Die Zellen des Sampels 137G stammten von einem siebenundfünfzigjährigen, männlichen Patienten. Mit diesen Gewebezellen konnten 2 Studien durchgeführt werden:

137Gp2

Für die Lektin-Zell-Assoziation konnte in dieser Studie folgendes Verhältnis bestimmt werden: WGA>>LCA>UEA>PNA.

Die gemessene Oberflächenbeladung mit WGA betrug 155,17FIU. Sie sank während der neunzigminütigen Inkubationszeit bei 37°C auf 94,73FIU. Nach der Behandlung mit Monensin betrug die MFI 116,97FIU.

Für LCA konnte eine MFI von 48,27FIU an der Oberfläche der 137Gp2 Zellen detektiert werden. Die MFI sank im Verlauf der Inkubation bei 37°C auf 26FIU und stieg nach Monensinzusatz wieder auf 40,00FIU an

UEA zeigte eine Lektin-Zelladhäsion von 21,23FIU. Sie sank durch Inkubation bei 37°C auf 9,7FIU und nahm im Rahmen der Monensinbehandlung wieder 63,12% des Ausgangswertes an.

Für PNA konnte nur eine vergleichsweise geringe Oberflächenbeladung mit einer MFI von 2,23FIU festgestellt werden. Durch Inkubation bei 37°C nahm der Wert geringfügig zu (2,6FIU) und stieg nach der Monensinzugabe sogar auf 4,60FIU.

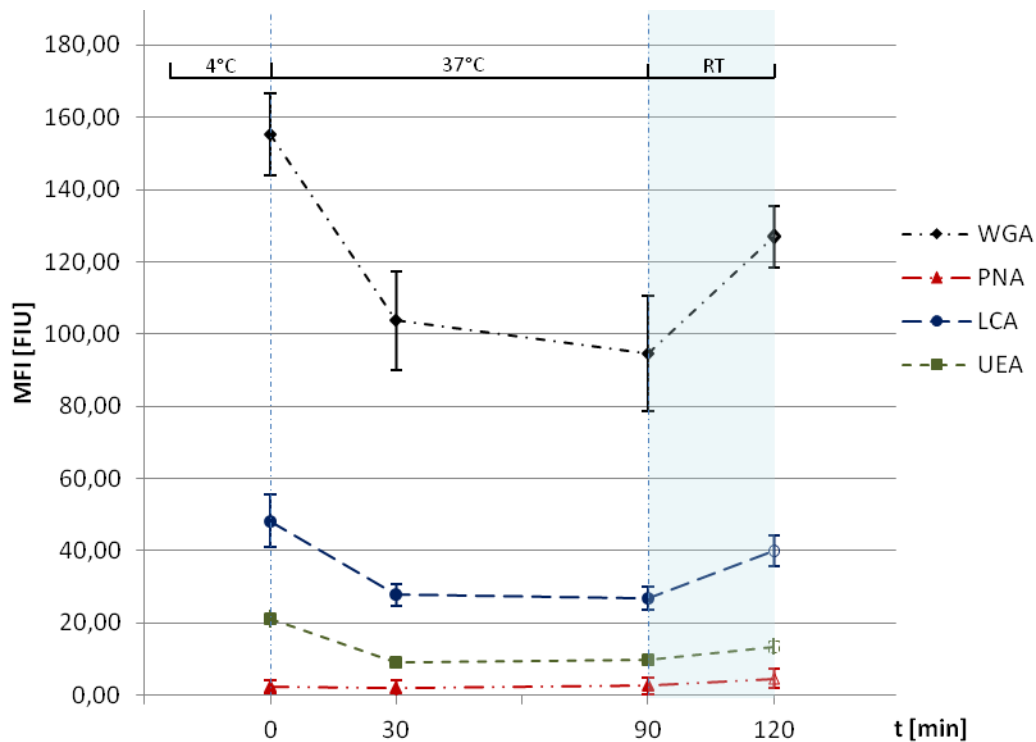


Abbildung 4-29: MFI (137Gp2) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

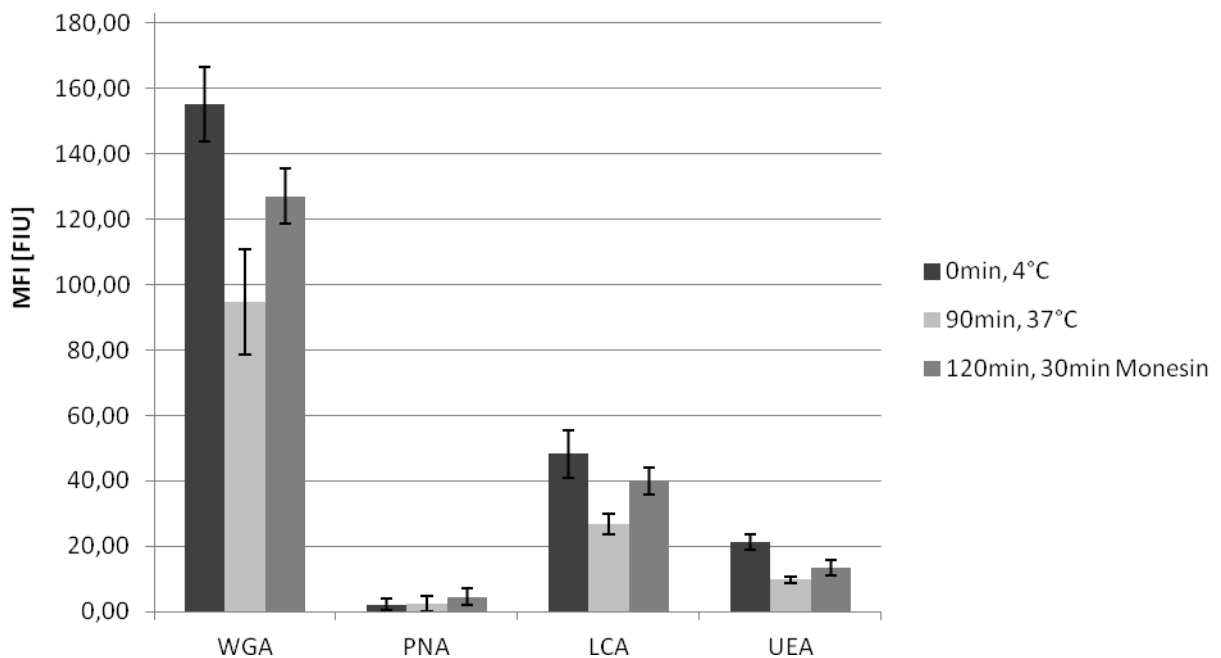


Abbildung 4-30: MFI (137Gp2) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationzeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationzeit mit Monensin

137Gp3

Auch in dieser Untersuchung konnte folgendes Lektin-Zell-Adhäsionsverhältnis beobachtet werden: WGA>>LCA>UEA>>PNA.

WGA zeigte wie auch schon bei Passage 2 die höchste MFI (124,55FIU) an der Zelloberfläche. Nach Inkubation unter physiologischen Bedingungen nahm sie um 41,47% ab. Durch Zusatz von Monensin stieg die MFI allerdings wieder auf 105,50% des Ausgangswertes an.

Mit LCA wurde eine Oberflächenbindung im Ausmaß von 51,97FIU detektiert. Sie sank im Verlauf der Inkubation bei 37°C um 34,25% ab und stieg nach Behandlung mit Monensin wieder auf 43,87FIU.

Die gemessene Oberflächenadhäsion von UEA betrug 12,17FIU. Sie nahm innerhalb der Inkubationszeit von 90 min bei 37°C um 58,92% ab und stieg auch nach Zusatz von Monensin nicht wieder an, sondern sank um weitere 6%.

Für PNA konnte mit einer detektierten MFI von 0,97FIU keine nennenswerte Interaktion mit der Zelloberfläche festgestellt werden. Allerdings stieg die MFI im Verlauf der Inkubationszeit auf 2,90FIU und erreichte nach Monensinzugabe sogar einen Wert von 10,45FIU.

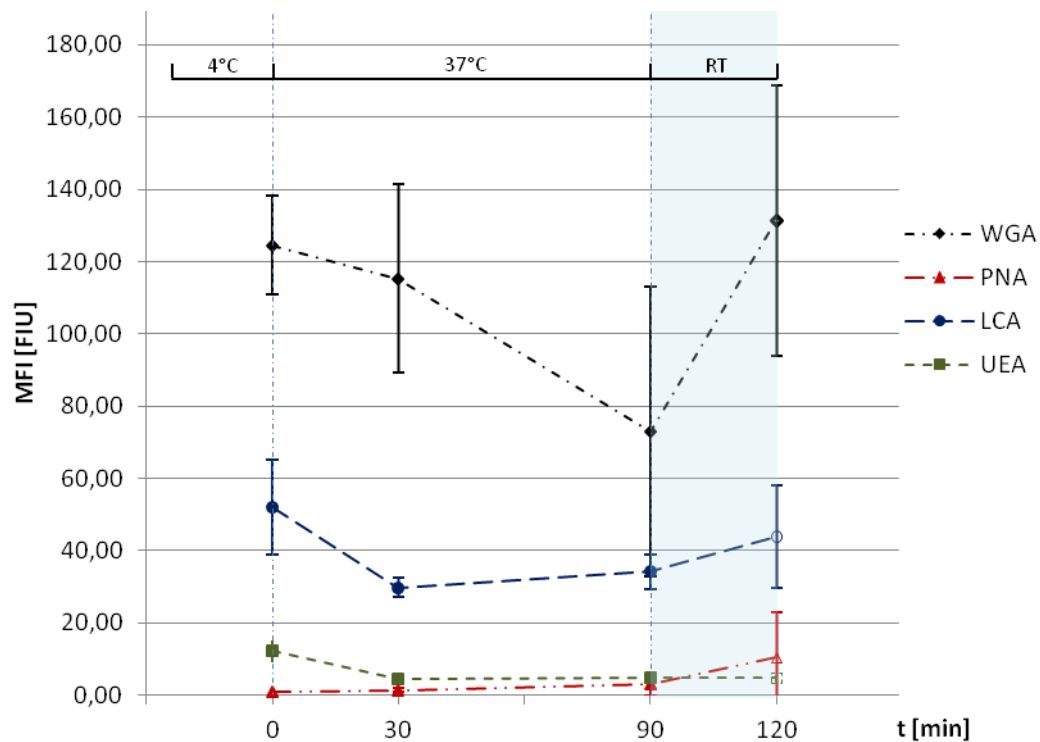


Abbildung 4-31: MFI (137Gp3) inkl. Standardabweichung
 Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
 Messungen bei 0min, 30min, 90min,
 zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
 abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

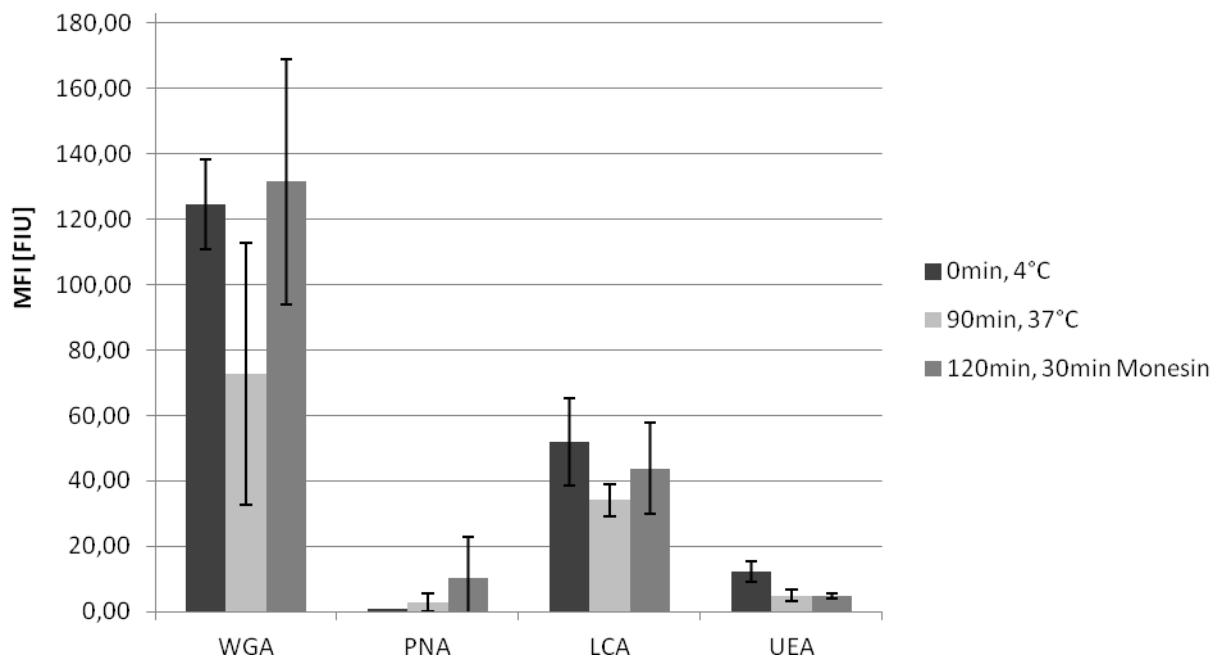


Abbildung 4-32: MFI (137Gp3) inkl. Standardabweichung
 dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
 Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Proben temperatur 4°C),
 Messung nach 90min Inkubationzeit (Inkubationstemperatur 37°C)
 Messung nach weiteren 30min Inkubationzeit mit Monensin

4.3.14. Primärzellen – gesund (140G)

Die Zellen der Gewebeprobe 140G stammten von einem männlichen Spender unbekannten Alters. Mit diesem Sample konnte je eine Studie aus der 1. und 2. Passage durchgeführt werden.

140Gp1

Die Oberflächenbeladung mit Lektinen zeigte hier folgendes Verhältnis: WGA>>UEA>LCA. PNA konnte in dieser Versuchsreihe aufgrund eines bakteriellen Befalles nicht untersucht werden.

Für WGA wurde zunächst eine MFI von 107,20FIU an der Zelloberfläche festgestellt. Diese nahm während der Inkubationszeit von 90 min bei 37°C zunächst auf eine MFI von 61,90FIU ab und stieg nach Monensinzugabe wieder auf eine MFI von 86,35.

UEA zeigte in dieser Studie die zweitbeste Lektin-Zell-Adhäsion. Die MFI betrug anfangs 47,10FIU und nahm innerhalb von neunzig Minuten bei einer physiologischen Temperatur von 37°C um 45,44% ab. Die Monensinzugabe hatte danach einen Anstieg der MFI auf 38,75FIU zur Folge.

Die für LCA gemessene Oberflächenbeladung lag zunächst bei 32,60FIU. Während der Inkubationszeit von 90 min bei 37°C sank die MFI auf 18,85FIU ab und nahm durch Behandlung mit Monensin wieder zu und überstieg sogar knapp den Ausgangswert .

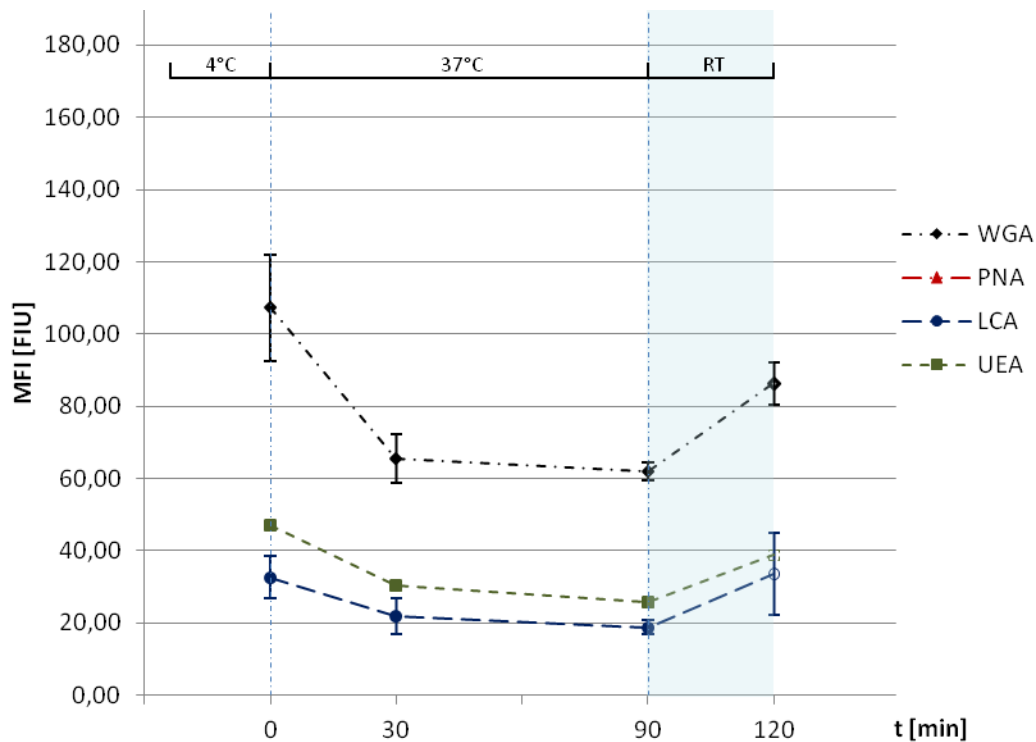


Abbildung 4-33: MFI (140Gp1) inkl. Standardabweichung
Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
Messungen bei 0min, 30min, 90min,
zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

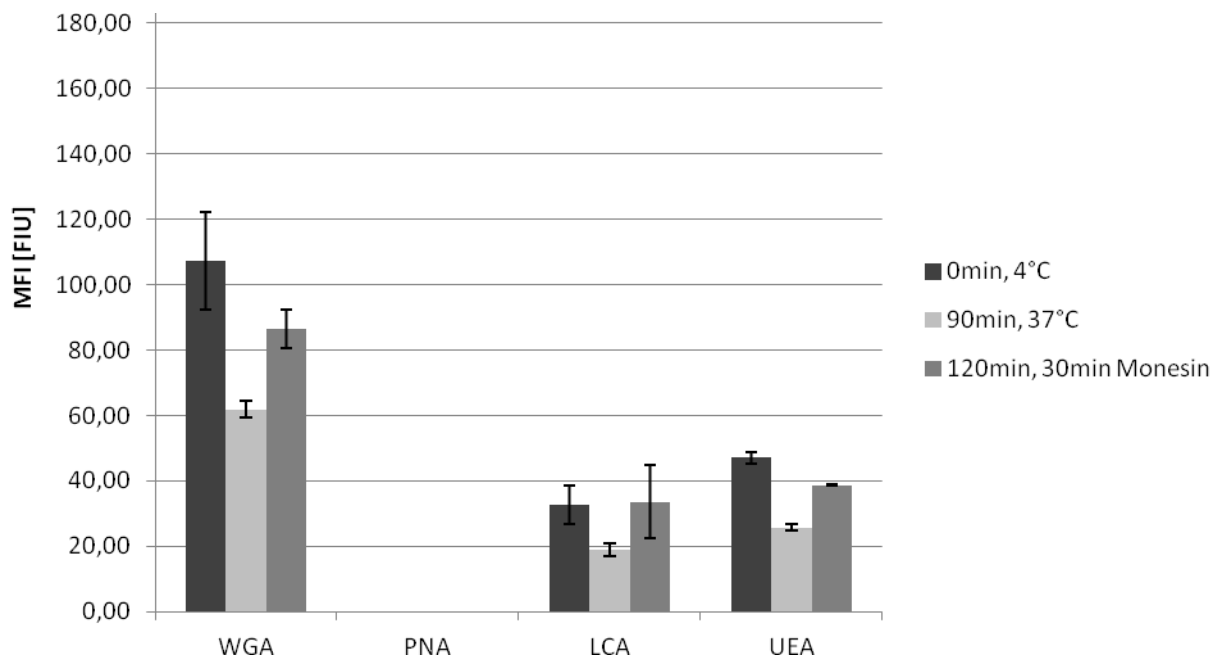


Abbildung 4-34: MFI (140Gp1) inkl. Standardabweichung
dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Probentemperatur 4°C),
Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

140Gp2

In der zweiten Versuchsreihe mit 140G konnten die Lektine WGA, LCA, UEA und PNA untersucht und dabei das Lektin-Zell-Adhäsionsverhältnis wie folgt bestätigt werden: WGA>>UEA>LCA>PNA.

Für WGA wurde diesmal eine Oberflächenbeladung von 118,07FIU gemessen. Sie nahm im Verlauf der Inkubation um 58,50% ab und stieg mit Monensin wieder auf eine MFI von 73,37FIU.

Die Lektinbindung von UEA an der Zelloberfläche lag bei 49,50FIU. Sie sank innerhalb der Inkubationszeit von 90 min bei 37°C auf 29,03FIU und stieg mit Monensin wieder auf 40,77FIU an.

LCA zeigte zu Beginn eine MFI von 39,93FIU. Während der Inkubationszeit von 90 min bei 37°C sank die MFI auf 23,87FIU und stieg durch die Monensinbehandlung wieder auf 39,57FIU an.

Mit PNA konnte eine MFI von 13,17FIU erreicht werden. Bei 37°C sank diese auf 5,57FIU und stieg nach Monensinbehandlung wieder auf 17,35FIU an.

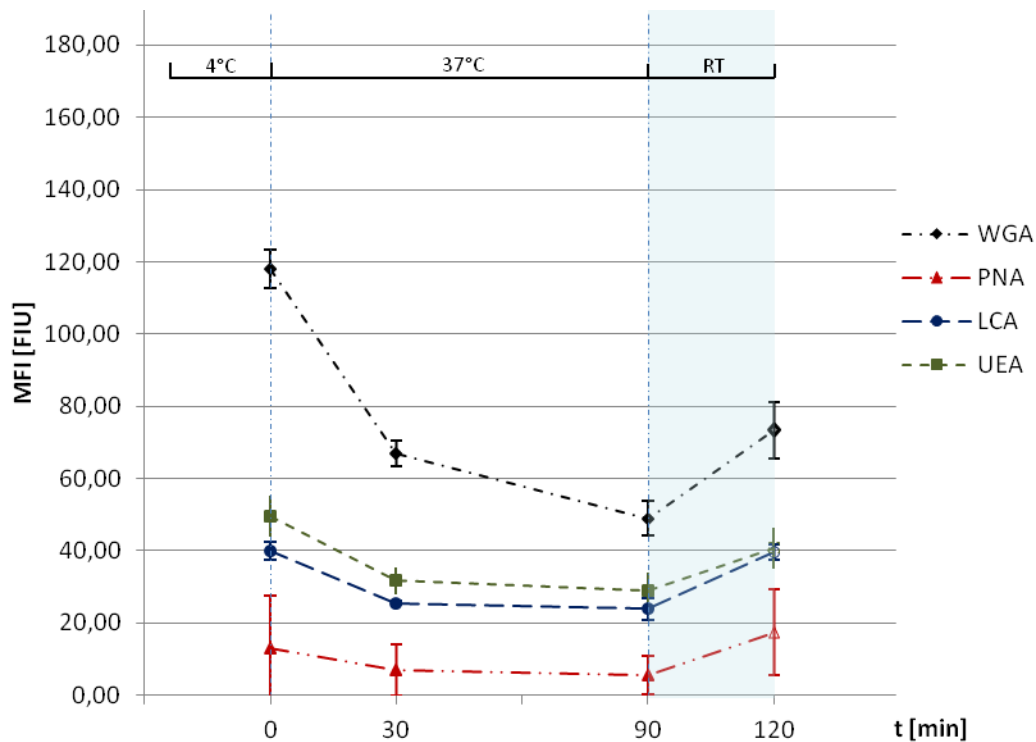


Abbildung 4-35: MFI (140Gp2) inkl. Standardabweichung
Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
Messungen bei 0min, 30min, 90min,
zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

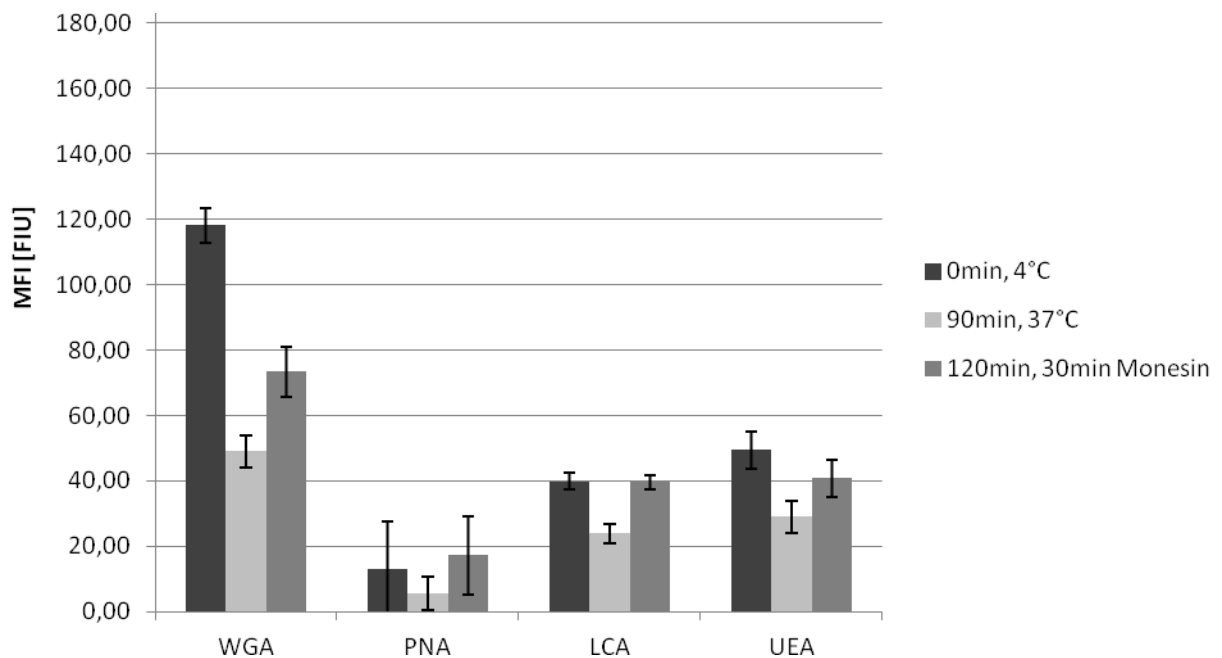


Abbildung 4-36: MFI (140Gp2) inkl. Standardabweichung
dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Probentemperatur 4°C),
Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.15. Primärzellen – gesund (Np HUC) Zusammenfassung

Für die Studien mit Np HUC wurden insgesamt 3 Gewebesamples verwendet, wobei 2 Samples einmal und ein weiteres zweimal passagiert werden konnten.

An gesunden Primärzellen konnte im Mittel folgendes Oberflächenbindungsverhältnis beobachtet werden: WGA>LCA>UEA>PNA.

Für WGA lag die Oberflächenbeladung im Mittel bei 127,68FIU. Sie nahm im Verlauf der Inkubation bei 37°C (90min) um 45,67% ab und stieg mit Monensin wieder auf 102,1FIU.

LCA zeigte zu Beginn eine MFI von 39,65FIU. Der Abnahme der an der Oberfläche gebundenen Lektinmenge nach Inkubation bei 37°C für 90 min betrug im Mittel 40%. Durch Monensinzusatz stieg die MFI wieder auf 91,15% des Ausgangswertes.

Bei UEA wurde zunächst eine MFI von 25,51FIU gemessen, die nach 90min bei 37°C auf 13,64FIU sank und mit Monensin wieder auf 19,14FIU anstieg.

Die gemessene MFI nach Oberflächenbeladung mit PNA betrug im Mittel lediglich 4,24FIU.

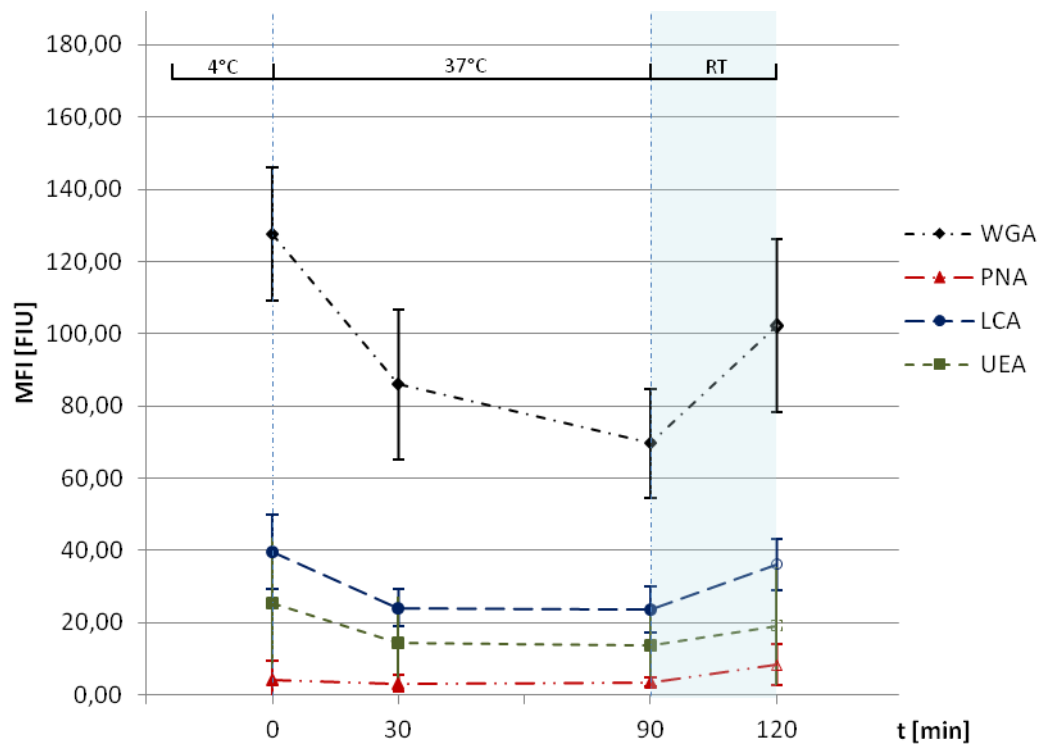


Abbildung 4-37: MFI (Np HUC) inkl. Standardabweichung
Anfangstemperatur (t=0min) der Probe 4°C, Inkubation bei 37°C,
Messungen bei 0min, 30min, 90min,
zum Zeitpunkt t= 90min Monensinzugabe,
abschließende Messung nach weiteren 30min (t=120min) bei RT

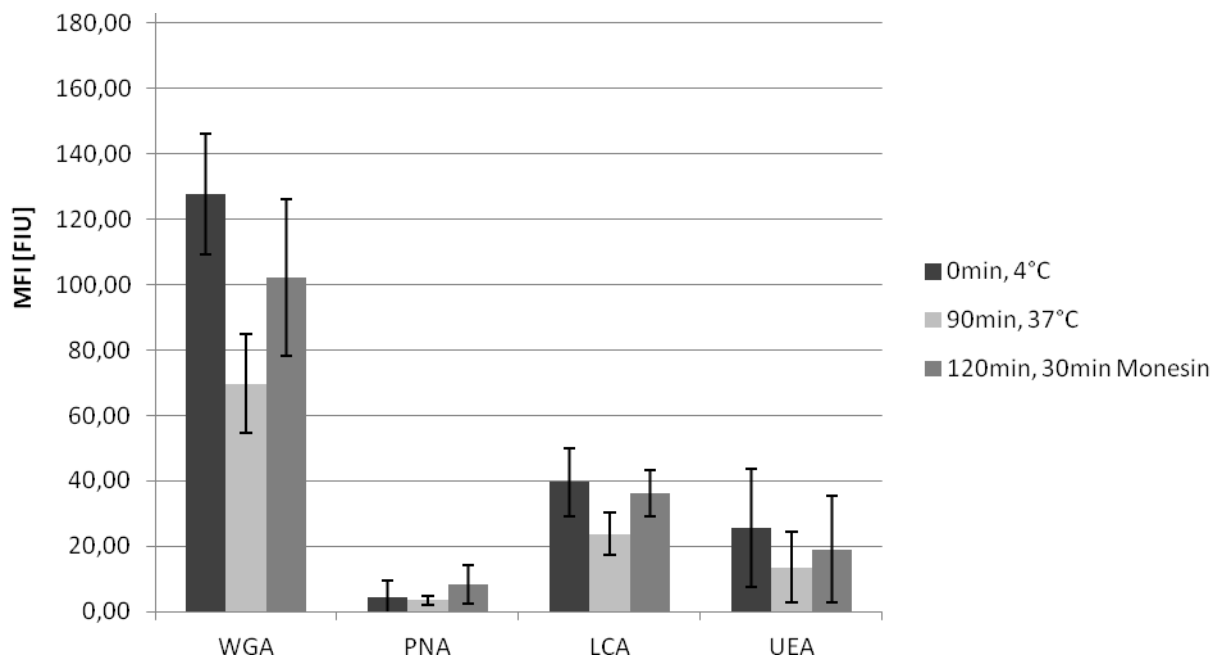


Abbildung 4-38: MFI (Np HUC) inkl. Standardabweichung
dargestellt nach den verschiedenen Lektinen
Messung zum Anfangszeitpunkt (t=0, Probentemperatur 4°C),
Messung nach 90min Inkubationszeit (Inkubationstemperatur 37°C)
Messung nach weiteren 30min Inkubationszeit mit Monensin

4.3.16. Interaktion zwischen Lektinen und unterschiedlichen Urothelzellen im Vergleich

Abschließend zu den durchgeführten Studien soll hier noch die Zelladhäsion und Zellinvasion der unterschiedlichen Lektine für die diversen Zelltypen verglichen werden.

Bei einer Gegenüberstellung der einzelnen Zelltypen wird deutlich, dass für die Zelllinien SV HUC, 5637, T24, RT112 und HT1376 sowie die gesunden (Np HUC) und erkrankten Primärzellen (Tp HUC) WGA das Lektin mit der höchsten Oberflächenbindungskapazität ist. Dabei zeigte sich für T24, Np HUC und Tp HUC eine besonders stark ausgeprägte Oberflächenbindung, dargestellt durch eine signifikant höhere MFI als bei HT1376, RT112, 647V, SV HUC und 5637.

Für eine therapeutische Anwendung wäre neben einer hohen Oberflächenbindung aber auch eine hohe Internalisationsrate von Bedeutung. Die erkrankten Primärzellen zeigten die höchste Oberflächenbeladung mit WGA. Im Verlauf der Inkubation bei 37°C (90min) sank die MFI hier auf 77,94FIU, also könnten bis zu 43,37% des an die Oberfläche gebundenen Lektins von der Zelle aufgenommen worden sein. Die gesunden Primärzellen zeigten etwas geringere, im Mittel aber doch ähnliche Werte und auch ein entsprechendes Verhältnis zwischen Oberflächenbeladung und Internalisation. Die beste potentielle Internalisationsrate bezogen auf die Oberflächenbeladung konnte hingegen bei der T24 Zelllinie beobachtet werden. Die relativ hohe MFI für die Oberflächenbeladung von 127,64FIU sank während der Inkubation bei 37°C (90min) auf 42,94FIU herab. Hier könnten bis zu 66,19% des oberflächengebundenen WGA internalisiert sein.

647V zeigte als einzige Zelllinie im Mittel die höchste Oberflächenbeladung mit UEA, allerdings liegt hier, im Gegensatz zu den meisten anderen Zelllinien, eine sehr hohe Standardabweichung vor.

In allen getesteten erkrankten Primärzellen (129Tp2, 130Tp2, 130Tp3, 135Tp3 und 136Tp1) und allen gesunden Primärzellen - mit Ausnahme der mit 140G durchgeführten Versuche (140G, 140Gp1) - konnte folgendes Verhältnis in der Oberflächenbindung beobachtet werden: WGA>LCA>UEA>PNA. Bei 140G lag sowohl in den unpassagierten Zellen als auch in den Zellen der ersten Passage im Mittel folgendes Bindungsverhältnis vor:

WGA>UEA>LCA>PNA. Beim Vergleich der Primärzellen lässt sich eine etwas höhere Bindung und Internalisation von TP HUC zu Np HUC für WGA und LCA erkennen.

Für PNA wurde für alle Zelllinien und Primärzellen generell eine nur sehr geringe Bindung festgestellt.

Durch Behandlung der Zellen mit Monensin sollte festgestellt werden, wie viel des potentiell internalisierten Lektins in den Lysosomen der Zellen akkumuliert. Monensin führt als Ionophor zu einem pH-Ausgleich zwischen den Lysosomen und dem Cytosol, wodurch der pH-abhängige Quench von Fluorescein wieder aufgehoben wird. Nach Behandlung mit Monensin (30min) stieg bei allen Proben die MFI wieder an. Bei Proben mit einer bereits eher niedrigen Oberflächenbindung der Lektine (SV HUC mit PNA, T24 mit PNA, T24 mit PNA und DBA, 647V mit PNA, RT112 mit PNA, HT1376 mit PNA) überstieg die MFI nach Monensinzugabe sogar den Ausgangswert (0min, 4°C). Für WGA konnten nach Monensinzugabe zwischen 61,02% (HT1367) und 79,98% (Np HUC) des Ausgangswertes erreicht werden. Dies deutet darauf hin, dass WGA zumindest teilweise über den lysosomalen Internalisationsweg in die Urothelzellen aufgenommen wird.

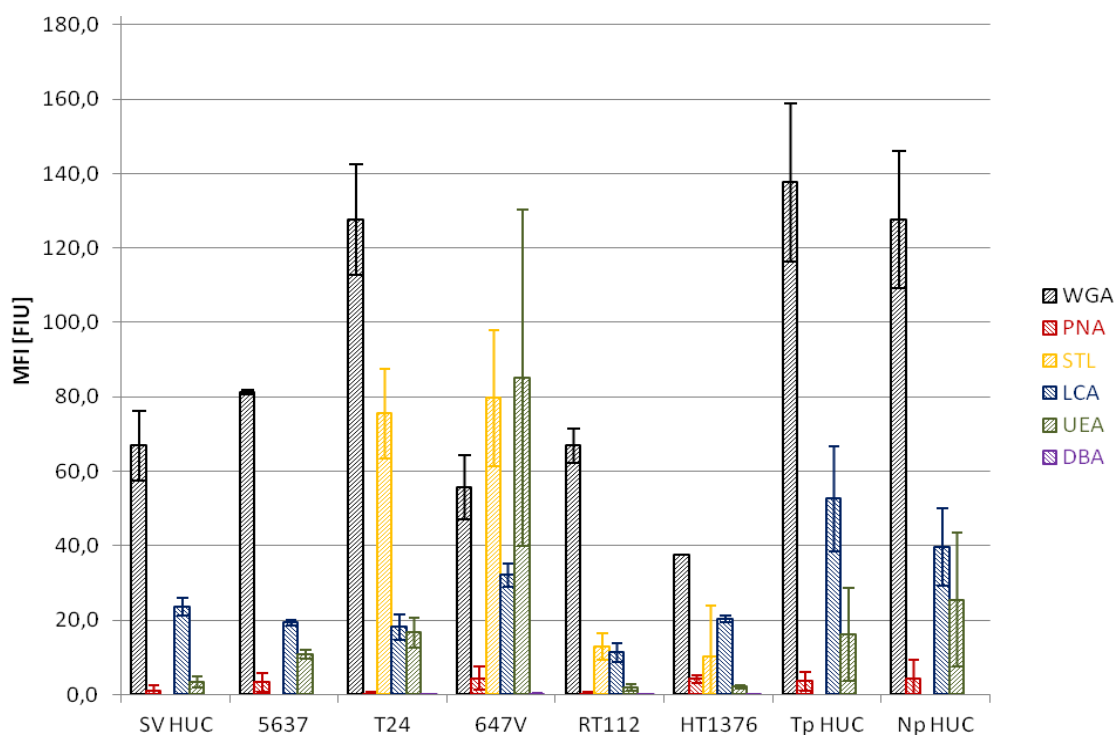


Abbildung 4-39: Lektinbindungsversuch, Vergleich der Oberflächenadhäsion (MFI) bei 4°C zum Anfangszeitpunkt (0min)

FI [FIU]	WGA			PNA			STL		
	4°C	37°C	Monensin	4°C	37°C	Monensin	4°C	37°C	Monensin
SV HUC	66,83	25,23	43,18	1,12	0,68	1,71			
Stabw	9,42	4,58	6,69	1,25	0,50	1,44			
5637	81,30	35,95	54,53	3,35	1,47	3,00			
Stabw	0,70	0,02	6,69	2,52	0,85	0,85			
T24	127,64	42,94	83,50	0,58	0,41	1,18	75,47	32,10	33,65
Stabw	14,87	3,46	46,34	0,28	0,16	1,15	12,12	0,99	9,12
647V	55,81	17,28	36,62	4,41	4,96	10,44	79,67	47,38	60,67
Stabw	8,62	1,77	5,95	3,08	2,72	4,78	18,34	12,85	18,76
RT112	66,88	24,63	49,76	0,53	0,25	0,88	12,95	5,23	9,28
Stabw	6,68	3,72	6,23	0,32	0,07	0,73	3,56	0,80	1,30
HT1376	37,58	15,97	22,93	4,17	3,95	9,17	10,13	6,29	6,68
Stabw	0,12	2,22	3,35	1,13	0,49	4,01	13,82	8,73	8,80
TpHUC (MW)	137,64	77,94	104,64	3,65	2,03	3,49			
Stabw	21,22	16,65	24,52	2,51	0,49	1,54			
NpHUC (MW)	127,68	69,64	102,15	4,24	3,58	8,37			
Stabw	18,51	15,08	23,96	5,10	1,37	5,74			
	LCA			UEA			DBA		
	4°C	37°C	Monensin	4°C	37°C	Monensin	4°C	37°C	Monensin
SV HUC	23,60	10,03	19,33	3,41	1,12	2,12			
Stabw	2,40	0,90	3,54	1,42	0,44	1,34			
5637	19,32	8,18	14,73	10,75	3,87	5,93			
Stabw	0,78	0,68	4,90	1,20	0,38	2,26			
T24	18,18	5,64	12,74	16,66	7,86	5,30	0,10	0,10	0,15
Stabw	3,38	0,88	3,78	3,97	7,11	2,00	0,00	0,00	0,07
647V	32,20	11,53	22,89	85,08	42,67	55,57	0,25	0,20	0,25
Stabw	3,13	2,17	5,44	45,17	28,46	27,77	0,07	0,00	0,07
RT112	11,27	4,65	9,82	1,97	0,53	1,13	0,12	0,12	0,12
Stabw	2,55	1,01	1,58	0,85	0,09	0,14	0,02	0,02	0,02
HT1376	20,32	10,23	13,65	2,17	0,93	1,27	0,20	0,20	0,20
Stabw	0,97	1,51	2,29	0,42	0,05	0,33	0,00	0,00	0,00
TpHUC (MW)	52,65	35,56	45,28	16,24	9,03	12,13			
Stabw	14,18	13,21	17,29	12,53	7,42	10,05			
NpHUC (MW)	39,65	23,79	36,14	25,51	13,64	19,14			
Stabw	10,31	6,37	7,14	18,07	10,81	16,28			

Tabelle 4-1: Direktvergleich der MFI der unterschiedlichen Urothelzelltypen zu den Messzeitpunkten (37°C 90min, Monensin, 4°C 0min)

FI [FIU]	WGA			PNA		
	4°C	37°C	Monensin	4°C	37°C	Monensin
129Tp2	126,25	68,75	103,15	1,90	1,57	5,60
Stabw	6,86	7,99	12,52	1,35	1,05	2,42
130Tp2	109,10	81,15	97,50			
Stabw	6,35	9,32	3,46			
130Tp3	149,95	59,35	70,20	7,37	1,77	3,50
Stabw	27,37	6,58	32,81	6,25	0,98	1,98
135Tp3	131,75	76,70	115,27	2,83	2,07	2,00
Stabw	0,35	1,13	7,70	1,29	0,57	0,52
136Tp1	171,13	103,77	137,10	2,50	2,70	2,85
Stabw	11,12	7,15	27,19	0,14	0,57	0,07
TpHUC MW	137,64	77,94	104,64	3,65	2,03	3,49
Stabw	21,22	16,65	24,52	2,51	0,49	1,54
	LCA			UEA		
	4°C	37°C	Monensin	4°C	37°C	Monensin
129Tp2	31,80	16,80	26,60	29,03	14,50	22,67
Stabw	1,06	2,07	0,71	0,21	0,17	6,53
130Tp2						
Stabw						
130Tp3	55,67	35,80	35,87	5,57	1,87	3,17
Stabw	8,60	7,77	9,60	2,29	0,32	1,02
135Tp3	20,00	16,23	17,73	5,40	3,47	3,90
Stabw	9,47	0,14	4,63	0,57	0,28	0,21
136Tp1	61,27	45,33	65,00	24,97	16,30	18,77
Stabw	2,06	9,42	1,51	2,75	3,12	2,67
TpHUC MW	52,65	35,56	45,28	16,24	9,03	12,13
Stabw	14,18	13,21	17,29	12,53	7,42	10,05

Tabelle 4-2: Direktvergleich der MFI der Tumorprimärzelllinien zu den Messzeitpunkten (4°C 0min, 37°C 90min, Monensin)

FI [FIU]	WGA			PNA		
	4°C	37°C	Monensin	4°C	37°C	Monensin
135G	111,03	67,30	85,63	1,23	2,40	2,97
Stabw	4,43	0,85	5,61	1,70	1,70	2,08
135Gp1	150,05	72,00	109,17	3,60	4,45	6,50
Stabw	5,20	4,39	8,06	3,82	5,02	7,21
137Gp2	155,17	94,73	126,97	2,23	2,60	4,60
Stabw	11,41	15,97	8,47	1,72	2,40	2,60
137Gp3	124,55	72,90	131,40	0,97	2,90	10,45
Stabw	13,65	40,02	37,48	0,12	2,86	12,37
140G	107,20	61,90	86,35			
Stabw	14,85	2,55	5,87			
140Gp1	118,07	49,00	73,37	13,17	5,57	17,35
Stabw	5,26	4,85	7,71	14,39	5,25	11,95
NpHUC (MW)	127,68	69,64	102,15	4,24	3,58	8,37
Stabw	18,51	15,08	23,96	5,10	1,37	5,74
	LCA			UEA		
	4°C	37°C	Monensin	4°C	37°C	Monensin
135G	23,75	16,00	23,43	10,47	5,77	6,53
Stabw	0,78	1,90	1,86	2,95	1,94	1,72
135Gp1	41,40	23,00	36,43	12,57	6,57	10,67
Stabw	1,93	4,50	5,86	2,73	0,55	1,99
137Gp2	48,27	26,83	40,00	21,23	9,75	13,40
Stabw	7,27	3,09	4,25	2,39	0,92	2,31
137Gp3	51,97	34,17	43,87	12,17	5,00	4,70
Stabw	13,22	4,88	14,03	3,06	1,68	0,79
140G	32,60	18,85	33,55	47,10	25,70	38,75
Stabw	5,94	1,91	11,24	1,84	0,99	0,21
140Gp1	39,93	23,87	39,57	49,50	29,03	40,77
Stabw	2,41	2,97	2,21	5,65	4,90	5,75
NpHUC (MW)	39,65	23,79	36,14	25,51	13,64	19,14
Stabw	10,31	6,37	7,14	18,07	10,81	16,28

Tabelle 4-3: Direktvergleich der MFI der gesunden Primärzelllinien zu den Messzeitpunkten (4°C 0min, 37°C 90min, Monensin)

4.4. Färbungen

Ziel der im Verlauf der Diplomarbeit durchgeführten Färbungen war die Visualisierung von Bindung und Internalisation der einzelnen Lektine. Die verwendeten Farbstoffe und deren Zielstrukturen in der Zelle sind in Kapitel 3.9. näher beschrieben. Der jeweilige Vergrößerungsfaktor ist bei den einzelnen Abbildungen angeführt.

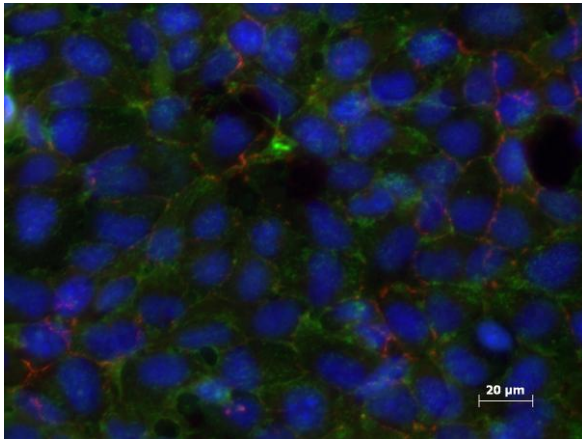


Abbildung 4-40-A: Färbung: SV HUC 4°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün), anti-ZO1-AK (rot), DAPI (blau), mit PBS gewaschen; 40x

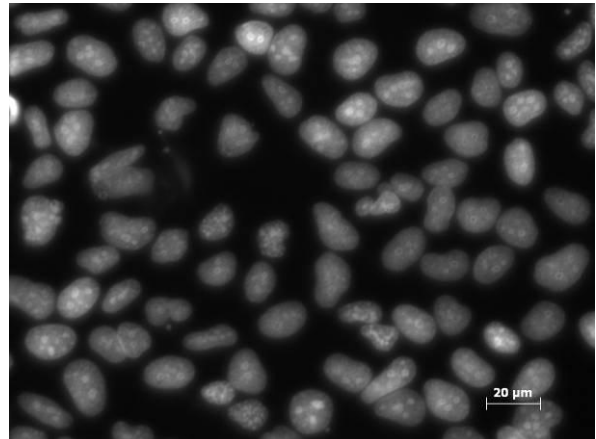


Abbildung 4-40-A-1: Färbung: SV HUC 4°C, DAPI (blau)

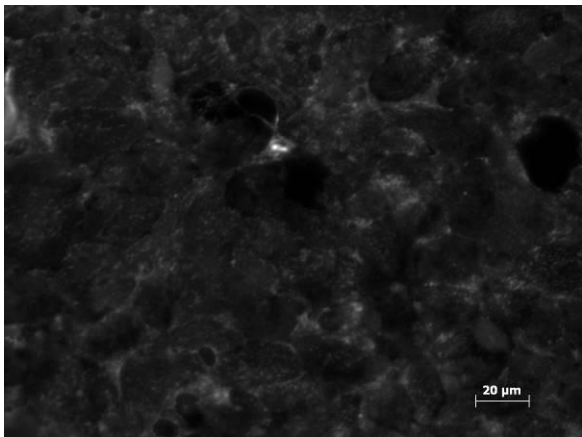


Abbildung 4-40-A-2: Färbung: SV HUC 4°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün)

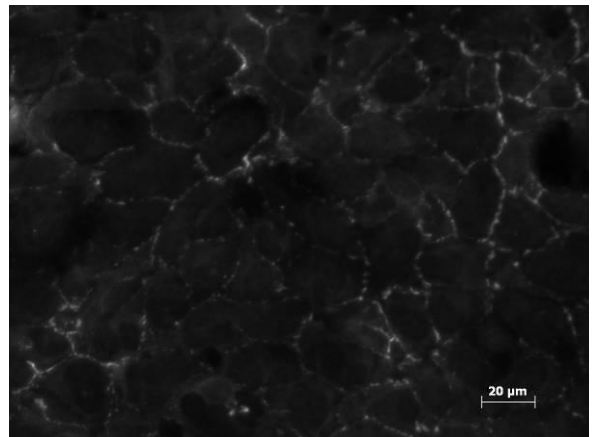


Abbildung 4-40-A-3: Färbung: SV HUC 4°C, anti-ZO1-AK (rot)

In den Abbildung 4-40-A sind SV HUC Zellen, die mit AWGA, anti-ZO1-AK und DAPI gefärbt wurden, zu sehen. Während des Färbeversuches wurden die Waschschrirte mit PBS durchgeführt. Abbildung 4-40-A-1 bis 3 geben dasselbe Motiv in den verschiedenen Kanälen wieder. 4-40-A-1 hebt die Markierung mittels DAPI hervor, 4-40-A-2 das f-BSA-AWGA-Konjugat und 4-40-A-3 die Zellgrenzen durch den anti-ZO1-AK. 4-40-A zeigt das Overlay zu den 3 Kanälen – AWGA (grün) ist an die Zelloberfläche gebunden, ZO1 markiert die tight junctions in rot und DAPI die Zellkerne in blau.

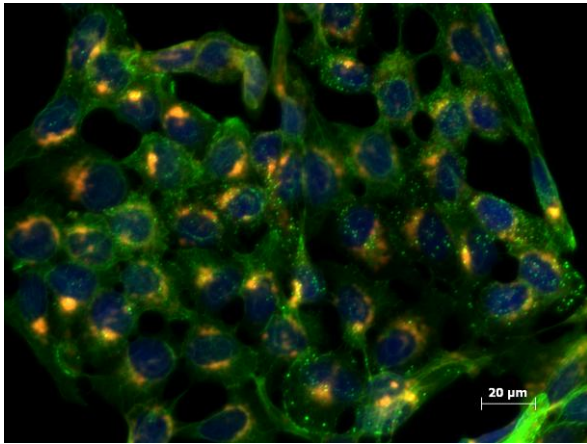


Abbildung 4-40-B: Färbung: SV HUC 37°C, AWGA (rot), anti-Pan-AK (grün), DAPI (blau), mit NAcGlc gewaschen; 40x

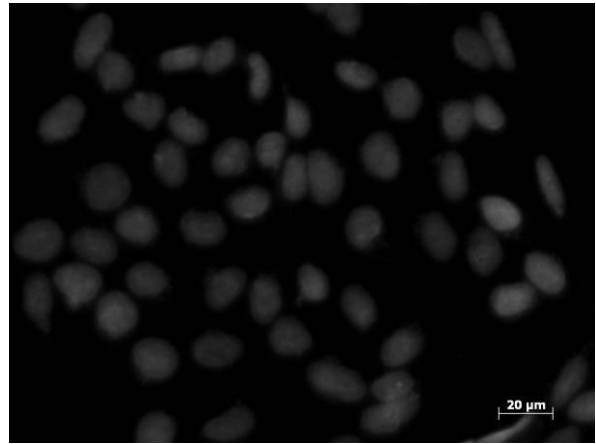


Abbildung 4-40-B-1: Färbung: SV HUC 37°C, DAPI (blau)

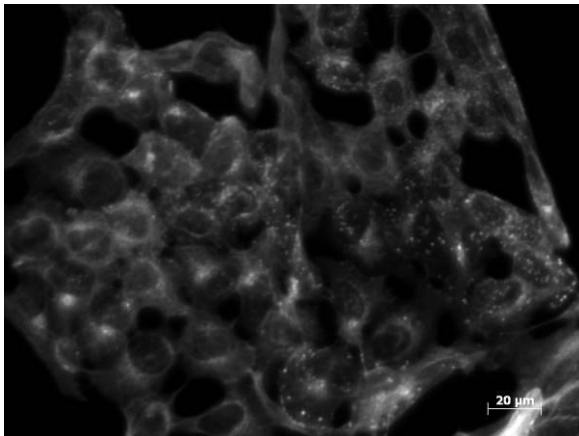


Abbildung 4-40-B-2: Färbung: SV HUC 37°C, anti-Pan-AK (grün)

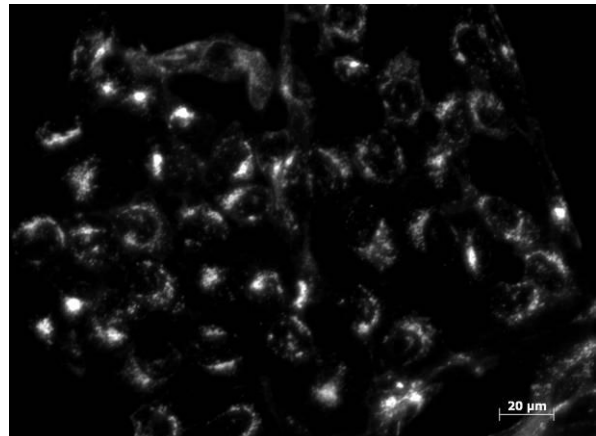


Abbildung 4-40-B-3: Färbung: SV HUC 37°C, AWGA (rot)

In Abbildung 4-40-B wurden SV HUC mittels AWGA, anti-Pan-Cytokeratin-AK und DAPI gefärbt. Hier ist eine deutliche Überlagerung der Areale zu beobachten, die mit AWGA und mit anti-Pan-Cytokeratin-AK hervorgehoben werden. anti-Pan-Cytokeratin-AK lagert sich vermehrt in keratinreichen Regionen der Zelle an, wie z.B.: dem intrazellulären Zytoskelett epithelialer Gewebe. In diesen Bildern zeigt sich, dass sich AWGA bei 37°C sowohl an der Zelloberfläche anlagert als auch nach Internalisation in unterschiedlichen Zellkompartimenten akkumuliert.

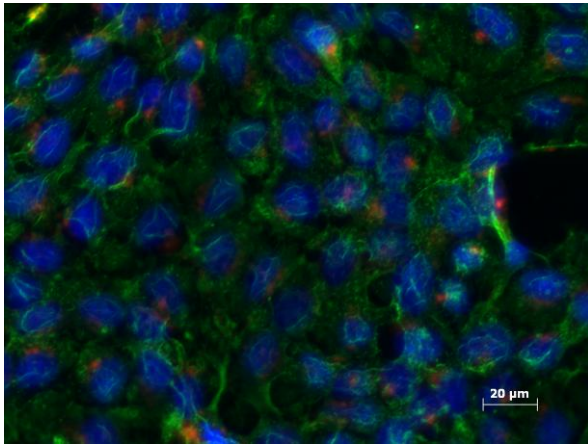


Abbildung 4-41-A : Färbung: SV HUC 4°C,
f-WGA (grün), anti-Lamp2-AK (rot), DAPI
(blau) mit PBS gewaschen; 40x

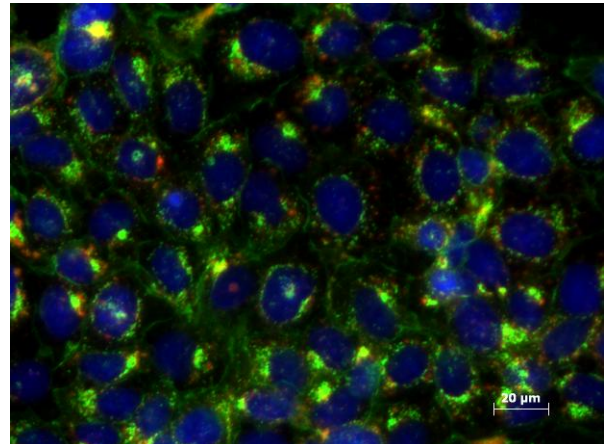


Abbildung 4-41-B: Färbung: SV HUC 37°C,
f-WGA (grün), anti-Lamp2-AK (rot), DAPI
(blau) mit PBS gewaschen; 40x

In Abbildung 4-41-A und Abbildung 4-41-B wurden SV HUC mit anti-Lamp2-AK und DAPI gefärbt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei 4°C f-WGA nur an der Zelloberfläche haftet. Wurden die Zellen bei 37°C inkubiert, konnte f-WGA internalisieren.

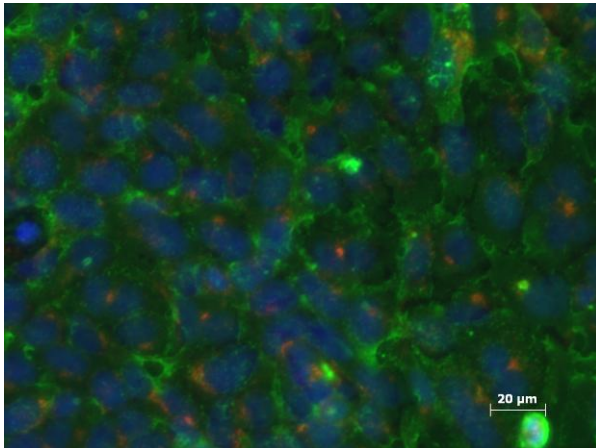


Abbildung 4-42-A: Färbung: SV HUC 4°C,
f-BSA/WGA-Konjugat (grün), anti-Lamp2-AK
(rot), DAPI (blau), mit PBS gewaschen; 40x

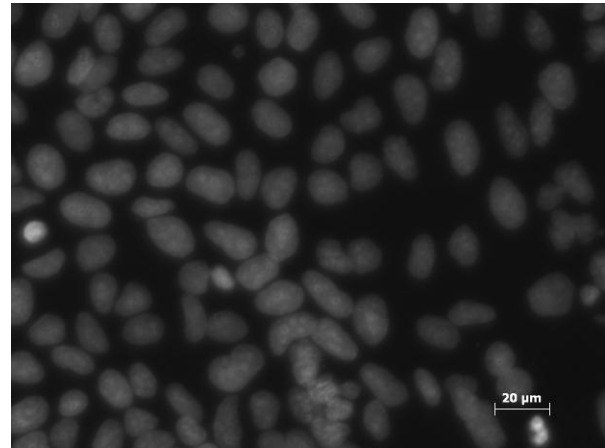


Abbildung 4-42-A-1: Färbung: SV HUC 4°C,
DAPI (blau)

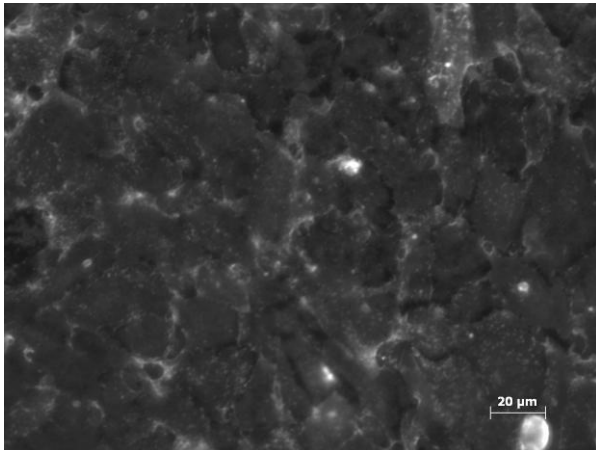


Abbildung 4-42-A-2: Färbung: SV HUC 4°C,
f-BSA/WGA-Konjugat (grün)

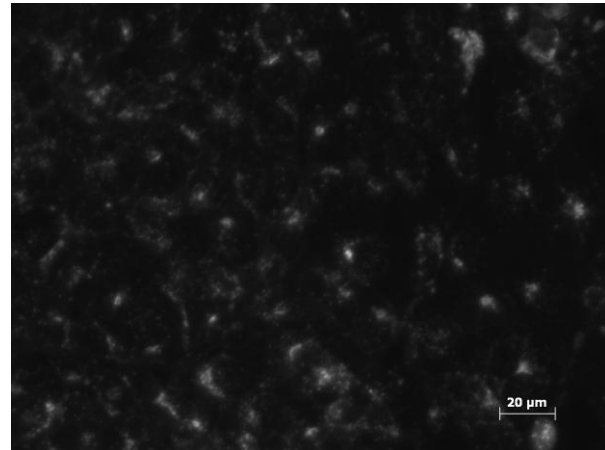


Abbildung 4-42-A-3: Färbung: SV HUC 4°C,
anti-Lamp2-AK (rot)

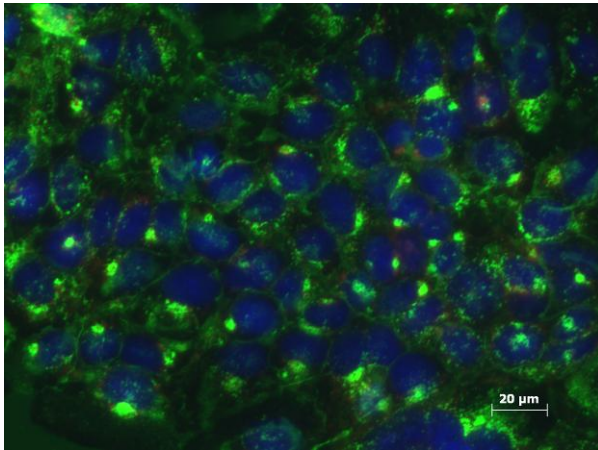


Abbildung 4-42-B: Färbung: SV HUC 37°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün), anti-Lamp2-AK (rot), DAPI (blau), mit PBS gewaschen; 40x

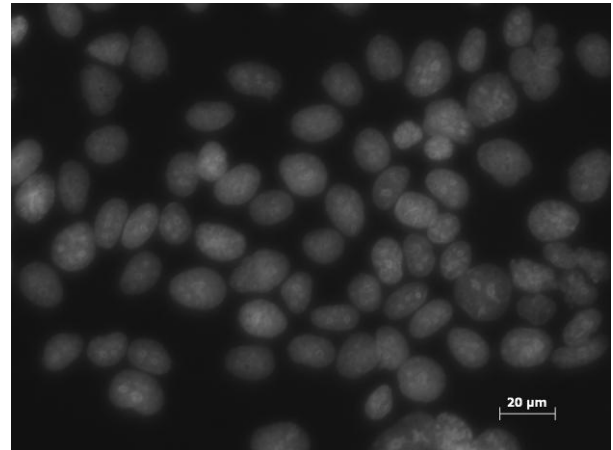


Abbildung 4-42-B-1: Färbung: SV HUC 37°C, DAPI (blau)

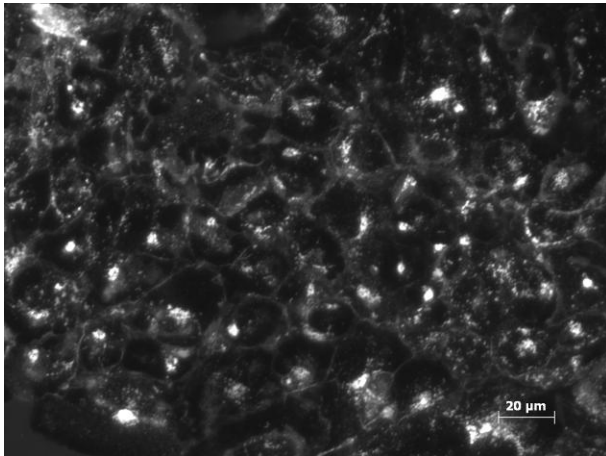


Abbildung 4-42-B-2: Färbung: SV HUC 37°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün)

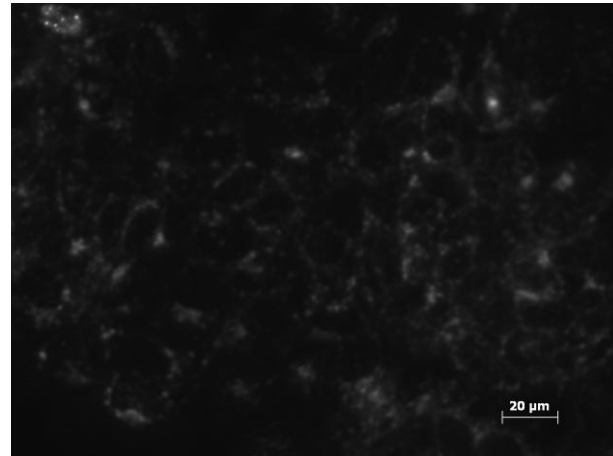


Abbildung 4-42-B-3: Färbung: SV HUC 37°C, anti-Lamp2-AK (rot)

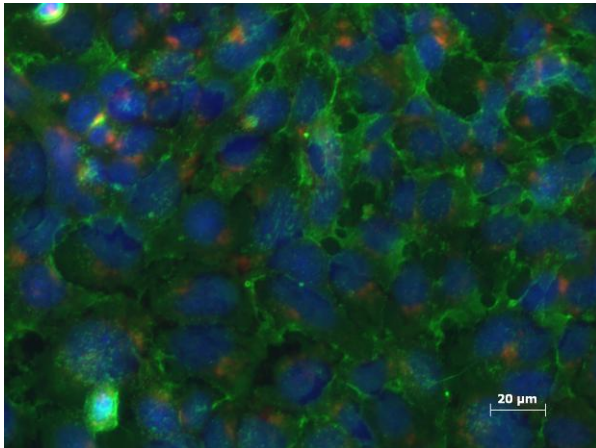


Abbildung 4-42-C: Färbung: SV HUC 4°C, , f-BSA/WGA-Konjugat (grün), anti-Lamp2-AK (rot), DAPI (blau) mit NAcGlc gewaschen; 40x

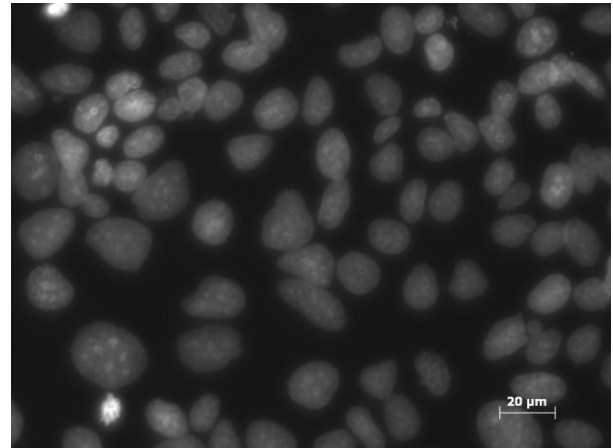


Abbildung 4-42-C-1: Färbung: SV HUC 4°C, DAPI (blau)

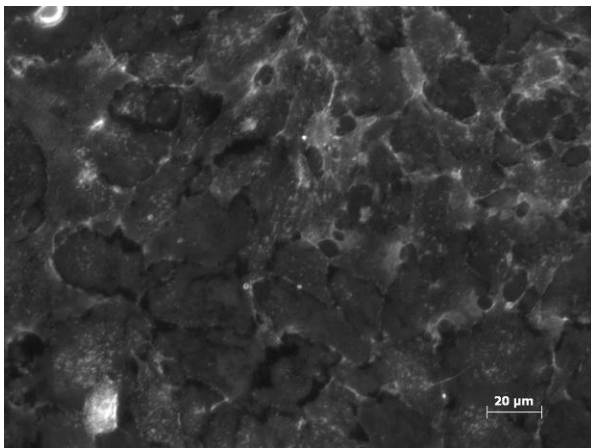


Abbildung 4-42-C-2: Färbung: SV HUC 4°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün)

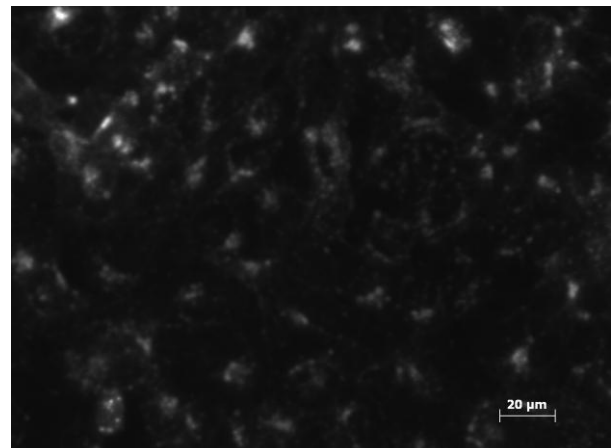


Abbildung 4-42-C-3: Färbung: SV HUC 4°C, anti-Lamp2-AK (rot)

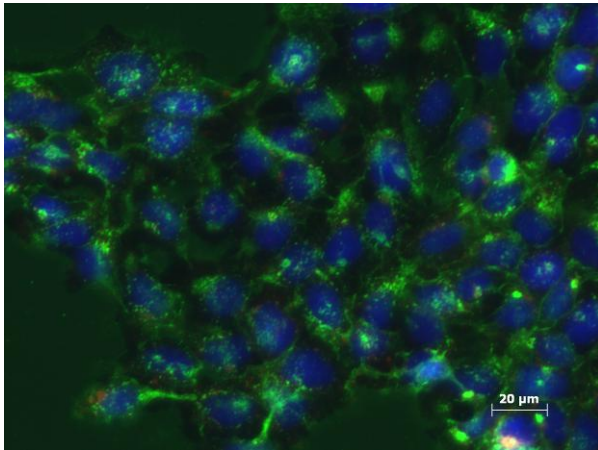


Abbildung 4-42-D: Färbung: SV HUC 37°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün), anti-Lamp2-AK (rot), DAPI (blau) mit NAcGlc gewaschen; 40x

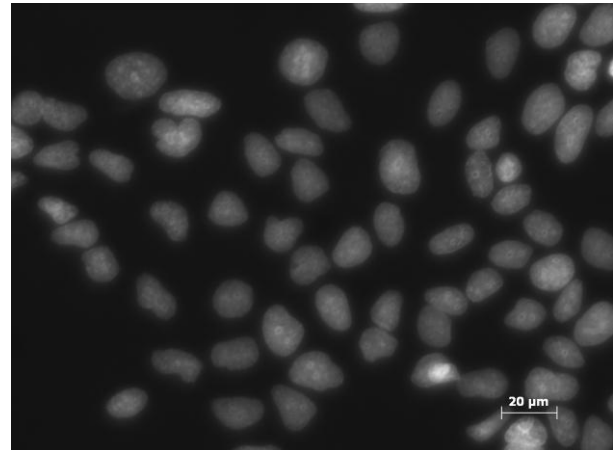


Abbildung 4-42-D-1: Färbung: SV HUC 37°C, DAPI (blau)

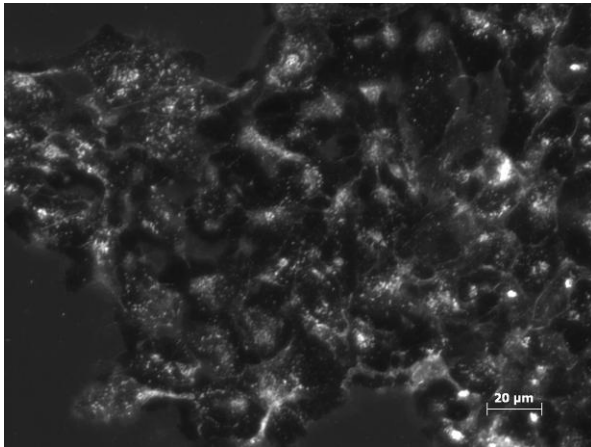


Abbildung 4-42-D-2: Färbung: SV HUC 37°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün)

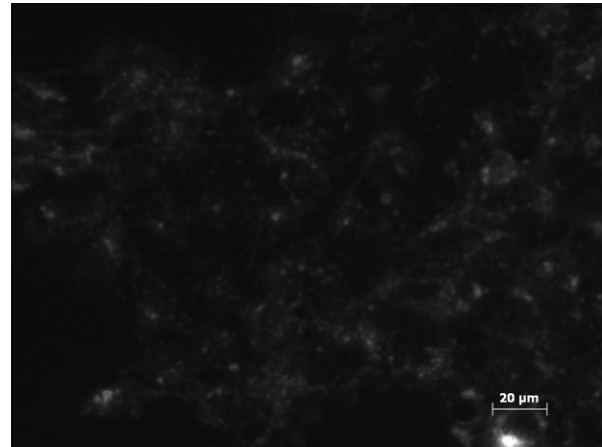


Abbildung 4-42-D-3: Färbung: SV HUC 37°C, anti-Lamp2-AK (rot)

Auf Abbildung 4-42-A bis -D ist zu erkennen, dass das f-BSA/WGA-Konjugat bei 4°C an die Zelloberfläche bindet, bei einer Temperatur von 37°C jedoch in die Zelle aufgenommen wird und sich in bestimmten Zellkompartimenten vermehrt ansammelt. Gleichzeitig ist sichtbar, dass nach Zusatz von N-Acetylglucosamin die Bindung des f-BSA/WGA-Konjugates nur gering herabgesetzt ist.

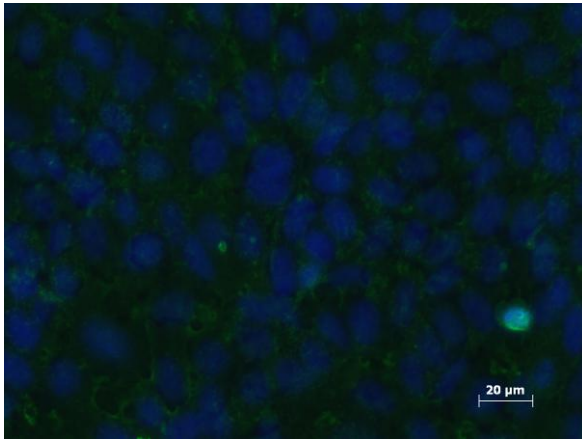


Abbildung 4-43-A: Färbung: SV HUC 4°C 2h f-BSA/WGA-Konjugat; mit PBS gewaschen; 40x

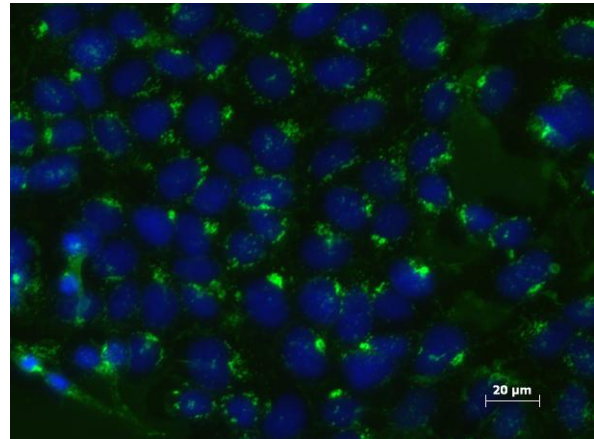


Abbildung 4-43-B: Färbung: SV HUC 37°C 2h, f-BSA/WGA-Konjugat; mit PBS gewaschen; 40x

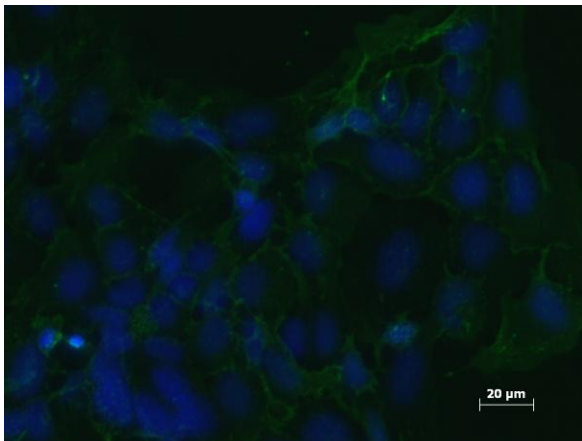


Abbildung 4-43-C: Färbung: SV HUC 4°C 2h f-BSA/WGA-Konjugat; mit NAcGlc gewaschen; 40x

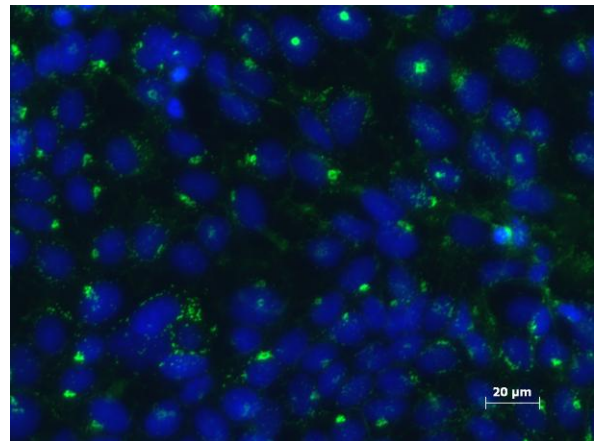


Abbildung 4-43-D: Färbung: SV HUC 37°C 2h f-BSA/WGA-Konjugat; mit NAcGlc gewaschen; 40x

In Abbildung 4-43-A bis Abbildung 4-43-D wurden SV HUC Zellen sowohl bei 4°C als auch bei 37°C mit dem f-BSA/WGA-Konjugat behandelt. In Abbildung 4-43-C und Abbildung 4-43-D sind Zellen zu sehen, die mit N-Acetylglucosamin-Lösung gewaschen wurden. Inkubiert man 2h mit dem f-BSA/WGA-Konjugat bei 4°C, so ist zu erkennen, dass das f-BSA/WGA-Konjugat nur oberflächlich bindet. Im Gegensatz dazu ist bei 37°C das f-BSA/WGA-Konjugat auch innerhalb der Zellen zu erkennen. Unter N-Acetylglucosamin-Zusatz erscheint die WGA-Bindung an die Zelloberfläche bei 4°C schwächer und auch die Internalisation bei 37°C ist geringer.

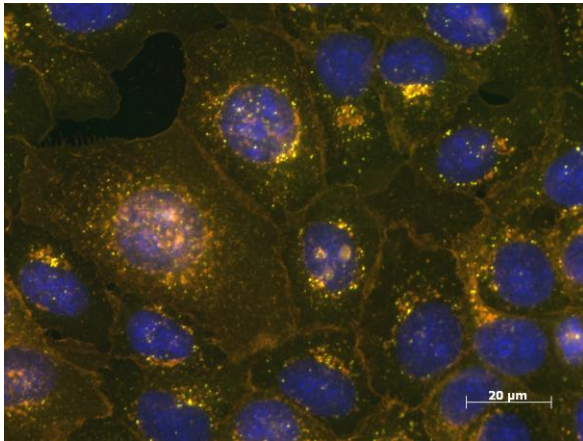


Abbildung 4-44-A: Färbung: SV HUC, 37°C f-BSA/WGA, mit PBS gewaschen; 63x

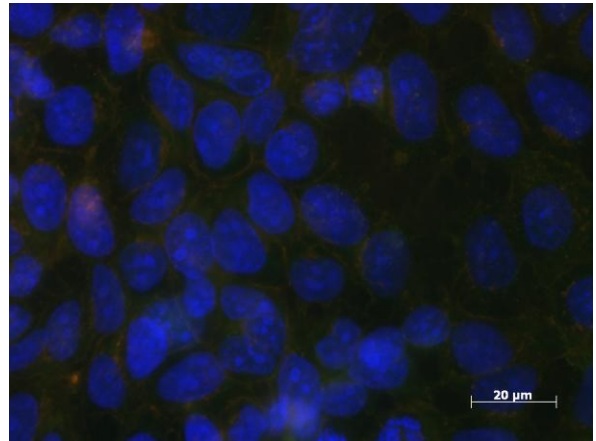


Abbildung 4-44-B: Färbung: SV HUC, 4°C f-BSA/AWGA, mit NAcGlc gewaschen; 63x

In Abbildung 4-44-A und Abbildung 4-44-B sind SV HUC Zellen in 63-facher Vergrößerung zu sehen. Die Zellen in der linken Abbildung wurden mit f-BSA und AWGA bei 37°C 2h lang inkubiert, während die Zellen rechts bei 4°C inkubiert und zusätzlich mit N-Acetylglucosamin gewaschen wurden.

4.5. Zellgröße bei ausgewählten Urothelzelllinien

Eine Zellgrößenmessung an T24, RT112 und 647V (siehe Abbildung 4-45-A bis D) ergab, dass die Zellen bei diesen drei Zelllinien annähernd gleich groß sind; ihre Durchmesser betragen circa 20µm. Die Varianz der Zellgrößen innerhalb einer Linie (vgl. Zellgrößen T24 Messung 1 zu Messung 2) ist dabei größer als der Unterschied der Größen zwischen den Zelllinien. Die Zellgrößen der anderen verwendeten Zelllinien wurden nicht evaluiert und könnten daher potentiell differieren.

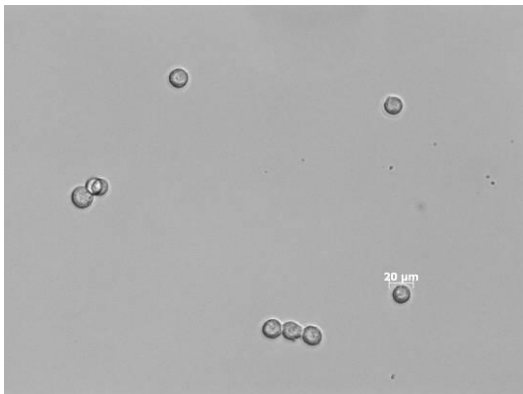


Abbildung 4-45-A: Zellgröße 647V

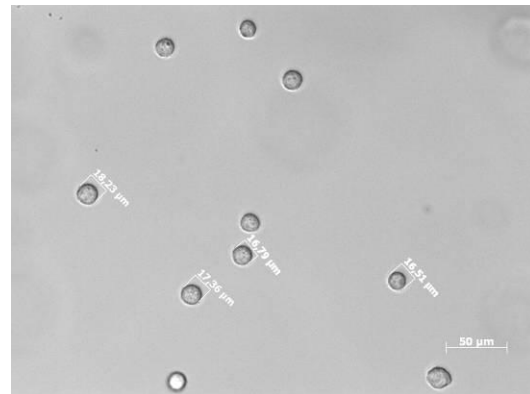


Abbildung 4-45-B: Zellgröße RT112

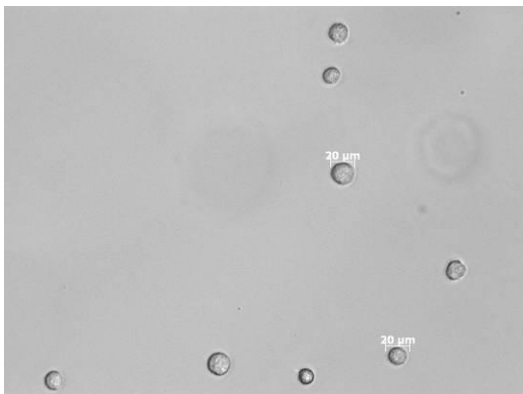


Abbildung 4-45-C: Zellgröße T24 (Messung 1)

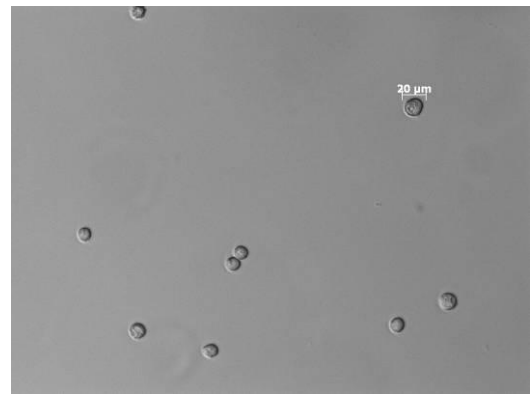


Abbildung 4-45-D: Zellgröße T24 (Messung 2)

4.6. Lektinbindungsstudien nach Neuraminidase-Vorbehandlung

Neuraminidase spaltet an der Zelloberfläche befindliche terminale Sialinsäurereste der Glycocalyx ab. Somit ist zu erwarten, dass nach einer Vorbehandlung mit Neuraminidase für Verbindungen, die an Sialinsäurereste binden, eine schlechtere Adhäsion stattfindet. Hingegen sollten für Strukturen, die an andere Reste binden, mehr potentielle Bindungsstellen an der Oberfläche sterisch zugänglich sein; wie z.B. D-galactose beta 1->3 N-acetyl-D-galactosamine-Reste für PNA. Dies hätte zur Folge, dass eine höhere Bindungsaffinität für bestimmte Lektine (wie z.B. PNA) resultieren könnte. Aufgrund der unterschiedlichen Glykosylierung der Zelloberfläche der einzelnen Zelllinien sind hier differierende Ergebnisse möglich.

In dieser Versuchsreihe wurde die Oberflächenadhäsion von F-PNA in unterschiedlichen Konzentrationen sowie mit und ohne Neuraminidase-Vorbehandlung an den Zelllinien SV HUC, T24, 647V, RT112 und HT1376 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz von Neuraminidase die Menge an gebundenem F-PNA an der Zelloberfläche signifikant steigt.

Bei 647V stieg die MFI nach Vorbehandlung mit Neuraminidase im Vergleich zu den anderen Zelllinien am geringsten – bei 250pmol/ml F-PNA und 0,1U Neuraminidase auf das 1,99-fache. Der höchste Anstieg der Oberflächenbindung von F-PNA wurde hingegen bei T24 beobachtet – bei 250pmol/ml F-PNA und Neuraminidasebehandlung (0,1U) auf das 31,56-fache des Ausgangswertes. Für RT112 stieg die Fluoreszenzintensität und damit die Bindung von PNA auf das 19,9-fache des Ausgangswertes an, für HT1376 auf das 17,8-fache.

Erhöht man die F-PNA-Konzentration von 250pmol/ml auf 500pmol/ml, lässt sich bei den Zelllinien T24 und RT112 nur ein eher geringer Anstieg der MFI feststellen - bei 0,1U Neuraminidase z.B. auf 108% bzw. 115,32%. Für RT112 stieg zwar die gemessene Fluoreszenz durch eine höhere F-PNA-Konzentration auf 115%, hingegen war die bei 250pmol/ml gemessene Fluoreszenz im Vergleich mit T24 und 647V signifikant geringer. Für HT1376 und SV HUC wurde mit 500pmol/ml F-PNA im Vergleich zu einem Zusatz von 250pmol/ml sogar eine etwas geringere MFI detektiert (99,56% bzw. 85,68%).

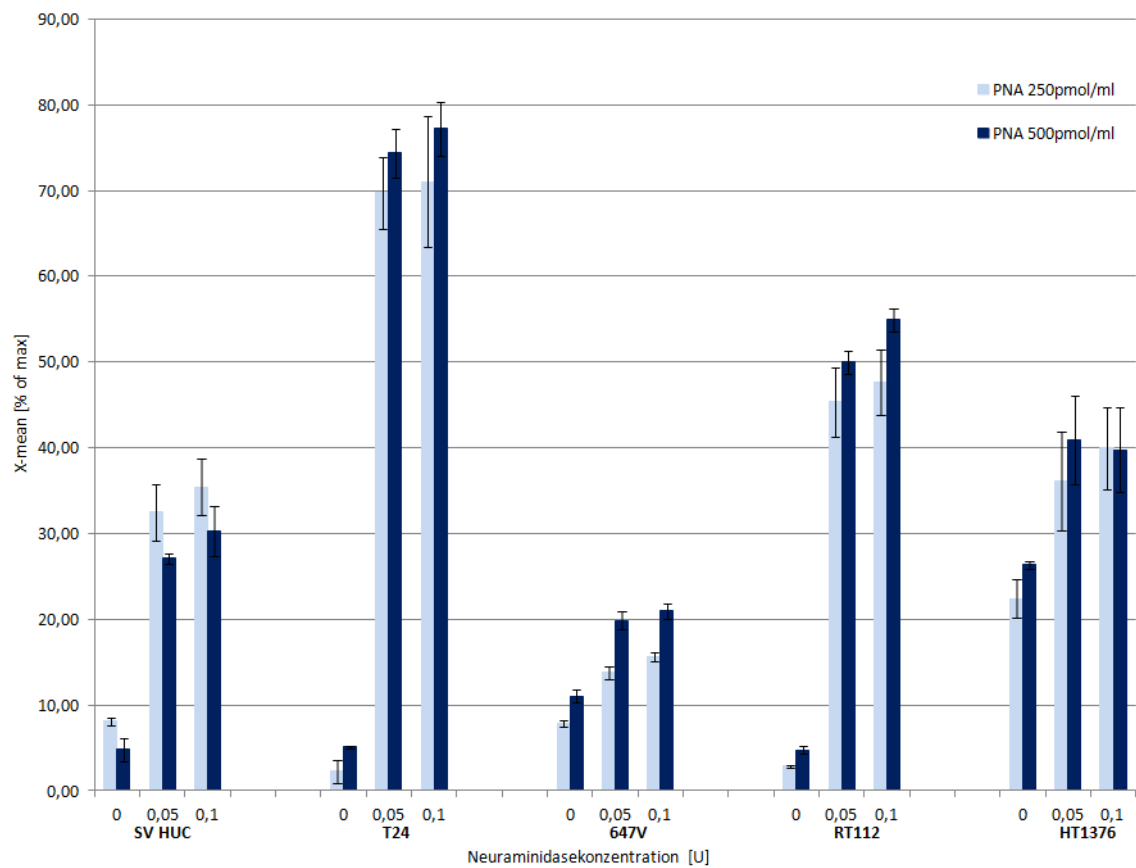


Abbildung 4-46: MFI der Zelllinien SV HUC, T24,647V,RT112 und HT1376 nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Neuraminidase und Inkubation mit F-PNA.

Zelllinie	F-PNA-Konz. [pmol/ml]	Neuraminidasekonz. [U]	Mittelwert	Stabw.
SV HUC.	250 pmol/ml	0,00	8,12	0,46
		0,05	32,47	3,29
		0,10	35,40	3,30
	500 pmol/ml	0,00	4,80	1,30
		0,05	27,10	0,62
		0,10	30,33	2,93
T24	250 pmol/ml	0,00	2,25	1,32
		0,05	69,73	4,23
		0,10	71,03	7,66
	500 pmol/ml	0,00	5,09	0,15
		0,05	74,37	2,80
		0,10	77,20	3,11
647V	250 pmol/ml	0,00	7,84	0,37
		0,05	13,80	0,78
		0,10	15,63	0,59
	500 pmol/ml	0,00	11,07	0,81
		0,05	19,87	1,00
		0,10	20,97	0,87
RT112	250 pmol/ml	0,00	2,87	0,19
		0,05	45,33	3,99
		0,10	47,63	3,85
	500 pmol/ml	0,00	4,75	0,45
		0,05	49,97	1,30
		0,10	54,93	1,39
HT1376	250 pmol/ml	0,00	22,43	2,28
		0,05	36,13	5,71
		0,10	39,97	4,77
	500 pmol/ml	0,00	26,33	0,46
		0,05	40,93	5,15
		0,10	39,78	4,97

Tabelle 4-4: Direktvergleich der MFI der Zelllinien nach Vorbehandlung mit Neuraminidase und Inkubation mit F-PNA

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung und Internalisation von Lektinen an unterschiedlichen Blasen- und Blasenkrebszelllinien, sowie Blasenprimärzellen untersucht. Unter den verwendeten Lektinen (WGA, PNA, STL, LCA, UEA, DBA) zeigte WGA das höchste Bindungspotential zu allen getesteten Zelllinien (SV HUC, HT1376, 5736, RT112, T24) sowie primären Blasenzellen (NpHUV, NtHUC) und eine durchschnittliche potentielle Internalisationsrate von bis zu 42,14%. Daher würde sich unter den getesteten Lektinen WGA in Kombination mit einem daran gekoppelten Cytostatikum am besten für eine zielgerichtete Therapie eignen. Die Annahme, dass Lektine bei einer physiologischen Temperatur von 37°C tatsächlich in die Zellen aufgenommen werden und sich in bestimmten Zellkompartimenten vermehrt ansammeln, konnte mittels Färbungen bestätigt werden.

Mit dem Ionophor Monensin erfolgt ein pH-Ausgleich zwischen Cytosol und Lysosomen, wodurch der pH-abhängige Quench von Fluorescein rückgängig gemacht werden kann. Die nach Zusatz von Monensin gemessene MFI war jedoch niedriger als der Wert zum Messzeitpunkt 0min bei einer Anfangstemperatur von 4°C. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Lektine auch über andere Internalisationswege in die Zelle gelangen oder aber, dass sich ein Teil des ursprünglich gebundenen Lektins von der Zelloberfläche losgelöst hat. Dass die Lektine vermehrt in vesikulären Kompartimenten wie den Lysosomen akkumulieren, ist in den mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen. Bei einer physiologischen Temperatur von 37°C können Lektine, wie z.B. WGA, in die Zelle aufgenommen werden und reichern sich auch in den Lysosomen an. Dies ist an der Überlagerung der Signale für WGA und den anti-Lamp 2-AK zu erkennen.

Durch Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase konnte bewiesen werden, dass durch Abspaltung von terminalen Sialinsäureresten der Glycocalyx der Zellen andere Zuckerstrukturen als potenzielle Bindungsstellen frei werden können. So konnte in den Versuchen mit PNA, das im herkömmlichen Test ohne Neuraminidasevorbehandlung nur in sehr geringem Ausmaß an die Zelloberfläche bindet, eine deutlich höhere Zelladhäsion beobachtet werden. Bei einer lektinbasierten Therapie könnte eine Vorbehandlung mit

Enzymen, die die Zelloberfläche verändern, dazu dienen, die Aufnahme eines gekoppelten Arzneistoffs in die Zielzelle zu erhöhen. Zudem ist aus den Ergebnissen ersichtlich, dass die Neuraminidasevorbehandlung bei SV HUC Zellen – also gesunden Blasen Zellen – eine deutliche, aber dennoch weitaus geringere Erhöhung der Bindung von PNA an die Zelloberfläche hervorruft als dies bei den Zelllinien T24, RT112 und HT1376 der Fall war. Hier stieg die gemessene MFI nach der Neuraminidaseeinwirkung um das bis zu 31,57-fache des Ausgangswertes an.

Im Vergleich zwischen gesunden und malignen transformierten primären Urothelzellen konnten bei den getesteten Gewebeproben keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Diese wären natürlich für eine therapeutische Anwendung sehr interessant. Denn bei einer idealen Tumorthherapie würde vorwiegend erkrankte Zellen als Target erkannt werden, gesunde Zellen sollten eine geringere Zell-Assoziation zeigen. Somit würde gesundes Gewebe weniger beeinträchtigt werden und durch Dosisreduktion könnte das Maß an Nebenwirkungen verringert werden.

Prinzipiell haben alle Untersuchungen seitens der Methodik sehr gut vergleichbare Ergebnisse gebracht. Bei der Kultivierung der Primärzellen konnten sieben der 45 Gewebeproben so weit bearbeitet werden, dass eine Versuchsdurchführung möglich war. Die meisten Ausfälle ergaben sich durch Infektionen, die wahrscheinlich bereits von den Patient_innen stammten, oder es konnten keine Urothelzellen aus den Gewebeproben gewonnen werden. Die Züchtung und Passagierung der Primärzellen an sich erfolgte problemlos, selbst ohne Zugabe eines Antibiotikums. Da Primärzellen ein Modell darstellen, das wesentlich näher an den physiologischen Bedingungen ist als immortalisierte oder standardisierte Zelllinien, sollten damit noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um abschließend festzustellen, inwieweit hier doch Unterschiede zu den etablierten und auch häufig eingesetzten Zelllinien bestehen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die durchgeführten Studien zeigen, dass sich Lektine vor allem aufgrund ihres cytoadhäsiven und cytoinvasiven Potentials für einen Einsatz in der Arzneimitteltherapie von Blasenerkrankungen eignen könnten.

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mittelwert
σ	Standardabweichung
AWGA	Alexa Fluor® 488 conjugate of WGA
BPE	Bovine Pituitary Extract
Ca	Kalzium
cKSFM	complete Keratinocyte Serum Free Medium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Cholera Toxin
DBA	Dolichos biflorus agglutinin
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epithelial growth factor
FBS	Fetal Bovine Serum
f-BSA	fluorescein-labeled bovine serum albumin
f-WGA	fluorescein Wheat Germ Agglutinin
HAMSF12	Ham's Nutrient Mixture F12
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KSFM	Keratinocyte Serum Free Medium
LCA	Lens culinaris Agglutinin
Mg	Magnesium
Na ₂ HPO ₄	Natriummonohydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxyd
P.Nr.	Produktnummer
PBS	Phosphate buffered saline
PNA	Peanut Agglutinin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raumtemperatur
STL	Solanum Tuberosum Lectin
UEA	Ulex Europaeus agglutinin
WGA	Wheat Germ Agglutinin

Pysikalische Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mykrogramm
µl	Mykroliter
cm2	Centimeter
FIU	fluorescence intensity units
g	Gramm
G/G	Gewicht/Gewicht
G/V	Gewicht/Volumen
h	Stunde
kg	Kilogramm
KIU	kilo International Units
L	Liter
MFI	Mean Fluorescence Intensity
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
pH	pH-Wert (potentia Hydrogenii)
pmol	Pikomol
rH	relative humidity (relative Luftfeuchtigkeit)

Appendix A

5.1. Rohdaten

5.1.1. Lektinbindungsversuche

x keine Daten vorhanden / Ausreißer nicht gewertet (siehe Kapitel 3.7.2)

Zelltyp/ Passage	Datum	Events/ 30s	Lektine	Vergleichsprobe		Proben			
				4°C 0min	4°C 60min	4°C 0min	37°C 30min	37°C 90min	+Mon 30min
SV HUC p65	01.04.2011	450	WGA1	53,1	59,7	53,1	20,4	17,5	31,4
		186	WGA2	51,8	58,7	51,8	21,6	x	34,6
		282	WGA3	56,3	57,4	56,3	22,8	22,6	40,4
		1121	PNA1	0,3	1,4	0,3	0,6	0,3	1,2
		1422	PNA2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5
		1342	PNA3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,4
		438	LCA1	22,8	23,8	22,8	9,5	10,6	16,4
		408	LCA2	23,4	25,1	23,4	11,2	9,3	17,9
		340	LCA3	19,5	25,5	19,5	9,2	8,3	16,2
		x	UEA1	x	x	x	0,9	1,6	1,6
		1541	UEA2	3,0	3,6	3,0	0,9	0,9	1,6
		696	UEA3	4,4	4,7	4,4	1,2	1,3	2,1
SV HUC p67	22.04.2011	320	WGA1	x	76,7	x	31,3	24,6	45,3
		1066	WGA2	75,1	80,3	75,1	32,7	25,9	47,0
		823	WGA3	75,9	80,8	75,9	34,1	30,2	48,2
		2781	PNA1	3,8	5	3,8	1,8	1,8	3,7
		2932	PNA2	3,4	3,9	3,4	1,5	1,5	3,0
		2778	PNA3	0,5	0,6	0,5	0,7	0,4	0,8
		1070	LCA1	23,7	26,5	23,7	11,3	10,3	18,4
		1694	LCA2	25,2	28,2	25,2	11,8	10,1	22,9
		1977	LCA3	27,0	30,2	27,0	13,1	11,6	24,2
		3064	UEA1	7,5	9,5	7,5	3,4	3,2	6,3
		2833	UEA2	4,8	5,9	4,8	2,1	0,6	3,5
		2712	UEA3	1,7	2,2	1,7	0,7	0,6	1,0
5637 p22	01.04.2011	1189	WGA1	76,6	79,4	76,6	33,0	34,5	51,0
		1483	WGA2	83,3	85,3	83,3	34,3	35,4	48,7
		1601	WGA3	86,1	88,3	86,1	35,1	37,9	49,7
		2835	PNA1	5,0	5,6	5,0	1,9	2,8	4,6
		3972	PNA2	4,1	4,4	4,1	1,3	1,5	2,6
		1838	PNA3	6,3	6,7	6,3	1,8	1,9	3,6
		1985	LCA1	18,4	19,6	18,4	6,8	7,0	10,8
		1502	LCA2	22,4	23,9	22,4	9,7	9,5	13,5
		2782	LCA3	18,8	19,5	18,8	6,4	6,6	9,5
			UEA1	10,3	7,9	10,3	3,0	3,3	5,2
		1984	UEA2	11,1	11	11,1	3,1	3,4	2,3
		1900	UEA3	13,4	14,1	13,4	4,3	4,1	5,5

5637 p26	22.04.2011	2748		WGA1	83,7	98,8		83,7	40,6	38,3	61,5
		1236		WGA2	73,7	84,6		73,7	35,2	32,5	57,3
		1240		WGA3	84,4	94,1		84,4	43,3	37,1	59,0
		2727		PNA1	2,9	3,8		2,9	1,4	1,5	3,3
		2522		PNA2	1,4	1,8		1,4	0,6	0,8	1,5
		2545		PNA3	0,4	0,5		0,4	0,3	0,3	0,7
		1622		LCA1	19,7	23,5		19,7	9,6	8,5	18,7
		951		LCA2	17,6	20,8		17,6	8,7	8,6	18,3
		1922		LCA3	19,0	22,2		19,0	9,7	8,9	17,6
		1591		UEA1	11,2	14,1		11,2	5,3	4,5	8,8
		1374		UEA2	9,2	11,2		9,2	4,6	3,9	7,1
		1898		UEA3	9,3	10,6		9,3	4,3	4,0	6,7

T24 p10	11.08.2011	> 5000	5000/29s	WGA1	119,8	117,5		119,8	77,8	48,1	145,8
		> 5000	5000/27s	WGA2	121,2	125,4		121,2	71,3	44,4	132,1
		4923		WGA3	115,1	119,1		115,1	70,5	45,6	127,8
		> 5000	5000/8,6s	PNA1	0,7	1,1		0,7	0,6	0,9	2,5
		> 5000	5000/14,4s	PNA2	0,3	0,3		0,3	x	x	x
		> 5000	5000/16,9s	PNA3	0,3	0,3		0,3	0,3	0,3	1,4
		4137	5000/25,4s	LCA1	16,8	16,4		16,8	7,1	4,7	16,3
		3514		LCA2	17,3	17		17,3	7,4	4,9	12,6
		> 5000		LCA3	16,7	16,9		16,7	7,9	5,0	13,1
		> 5000	5000/19,4s	UEA1	15,5	15,2		15,5	5,3	2,5	22,4
		> 5000	5000/15,9s	UEA2	15,9	15,3		15,9	5,4	2,5	4,7
		> 5000	5000/16,9s	UEA3	16,6	15,3		16,6	5,0	2,6	5,4

T24 p22	10.10.2011	4771		WGA1	140,6	142,2		140,6	49,4	39,3	59,7
		4856		WGA2	154,2	151,7		154,2	56,2	42,4	77,5
		4487		WGA3	151,0	151,9		151,0	63,9	49,1	71,2
		> 5000		PNA1	0,6	0,8		0,6	0,3	0,4	0,6
		> 5000		PNA2	0,3	0,3		0,3	0,2	0,3	0,5
		> 5000		PNA3	0,3	0,2		0,3	0,2	0,3	0,6
		2978		STL1	84,0	82,9		84,0	38,2	25,4	36,3
		2422		STL2	83,0	83,5		83,0	45,0	33,9	40,1
		1469		STL3	85,1	89,6		85,1	38,2	34,9	43,9
		2072		LCA1	15,9	18,4		15,9	7,7	6,6	16,6
		3464		LCA2	15,3	17,1		15,3	7,0	6,7	15,1
		3860		LCA3	15,6	17,1		15,6	7,2	6,5	15,5
		> 5000		UEA1	20,6	23,2		20,6	5,4	4,5	7,2
		> 5000		UEA2	21,6	23,4		21,6	5,3	4,5	7,3
		4997		UEA3	21,2	24,1		21,2	5,8	5,0	7,5
		> 5000		DBA	0,1	0,2		0,1	0,1	0,1	0,2
		> 5000		DBA	0,1	0,2		0,1	0,1	0,1	0,2
				DBA	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1	0,2

647V p6	20.09.2011	4050		WGA1	45,2	46,6		45,2	19,6	16,2	36,2
		4653		WGA2	49,0	50,5		49,0	19,1	16,4	34,3
		4525		WGA3	46,3	46,9		46,3	19,7	17,0	35,9
		> 5000		PNA1	6,6	8,3		6,6	5,7	6,5	14,2
		3547		PNA2	8,4	9,9		8,4	8,1	9,0	17,3
		> 5000		PNA3	8,7	10,2		8,7	7,9	8,3	16,0
		477		LCA1	34,8	38,6		34,8	12,4	10,0	24,0
		853		LCA2	33,1	33,8		33,1	10,6	8,4	21,1
		245		LCA3	34,8	36,8		34,8	13,0	12,1	30,0
		1566		UEA1	84,8	72,1		84,8	38,4	31,9	43,4
		565		UEA2	84,2	75,2		84,2	44,0	42,6	53,2
		545		UEA3	81,9	118,9		81,9	51,1	41,6	66,2

647Vp8	13.10.2011	262		WGA1	67,0	62,5	67,0	18,4	20,2	47,2
		544		WGA2	65,0	70,4	65,0	19,8	19,8	43,3
		251		WGA3	70,3	73,6	70,3	18,9	17,9	38,7
		3860		PNA1	1,7	3,6	1,7	1,7	2,3	6,1
		3968		PNA2	1,9	2,5	1,9	2,1	2,5	6,3
		3783		PNA3	2,6	3,2	2,6	2,5	3,0	7,1
		151		STL	67,5	78,7	67,5	31,5	37,5	50,5
		535		STL	65,9	64,8	65,9	41,8	33,7	41,1
		642		STL	x	89,1	x	48,5	43,7	50,6
		622		LCA	32,8	35,1	32,8	15,4	15,0	28,9
		837		LCA	36,5	23,6	36,5	11,8	12,3	25,4
		619		LCA	32,0	33,4	32,0	13,8	14,8	26,5
		1005		UEA	109,6	111,7	109,6	42,8	44,7	55,1
		791		UEA	127,3	130,5	127,3	47,8	57,2	71,6
		525		UEA	124,8	112,2	124,8	52,1	62,1	60,4
		2013		DBA	0,3	1,4	0,3	0,2	0,2	0,4
		3119		DBA	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,0
		478		DBA	x	0,1	x	0,1	x	0,2
647Vp8	14.10.2011	3043		WGA1	48,3	54,9	48,3	19,1	15,2	29,9
		3059		WGA2	56,2	60,2	56,2	18,9	15,7	33,4
		3428		WGA3	55,0	57,3	55,0	19,3	17,1	30,7
		> 5000	x	PNA1	3,2	5	3,2	3,8	4,5	9,3
		> 5000	5000/30s	PNA2	3,2	4,3	3,2	3,7	4,3	9,2
		> 5000	5000/27s	PNA3	3,4	4	3,4	3,7	4,2	8,7
		564		STL	96,4	101,2	96,4	62,6	61,4	78,1
		1263		STL	94,2	108,5	94,2	60,5	55,9	79,1
		919		STL	87,3	106,3	87,3	56,1	52,1	64,6
		1238		LCA	27,6	32	27,6	11,5	10,7	16,8
		2016		LCA	29,5	32,6	29,5	11,9	10,5	16,9
		2355		LCA	28,7	31,5	28,7	10,1	10,0	16,4
		2055		UEA	94,4	115,1	94,4	62,8	58,2	72,4
		1071		UEA	100,7	108	100,7	68,6	62,7	78,6
		1587		UEA	106,2	125,3	106,2	77,0	68,6	86,9
		2017		DBA	0,4	1,2	0,4	0,3	0,2	x
		1936		DBA	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2
				DBA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4
RT112p6	13.10.2011	1165		WGA1	68,0	73	68,0	27,2	29,8	56,0
		1770		WGA2	74,4	74,9	74,4	27,9	25,5	54,4
		1693		WGA3	72,4	98,9	72,4	27,7	26,5	52,1
		> 5000	5000/27s	PNA1	0,5	0,8	0,5	x	0,2	0,7
		> 5000	5000/21s	PNA2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
		> 5000	5000/15s	PNA3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
		676		STL	12,8	12,8	12,8	5,4	5,5	9,6
		718		STL	16,1	16,1	16,1	5,8	5,6	10,2
		413		STL	17,5	18,1	17,5	6,0	6,3	10,8
		1485		LCA	12,0	14,9	12,0	5,6	5,1	10,5
		1864		LCA	13,4	14,8	13,4	5,2	5,5	11,6
		2366		LCA	13,8	16	13,8	5,6	5,5	10,7
		> 5000	5000/11s	UEA	2,4	2,6	2,4	0,6	0,6	1,2
		5357	5000/28s	UEA	2,8	3,2	2,8	0,7	0,6	1,3
		x		UEA	2,5	2,8	2,5	0,6	0,6	1,2
		> 5000	5000/19s	DBA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
		> 5000	5000/22s	DBA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		> 5000	5000/14s	DBA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

RT112p6	14.10.2011	5000	5000/18s	WGA1	x	x	x	x	x	x
		1952		WGA2	59,8	66,6	59,8	26,7	20,8	44,5
		3210		WGA3	64,5	70,7	64,5	29,4	23,2	46,2
		> 5000	5000/15s	PNA1	x	x	x	x	x	x
		> 5000	5000/10s	PNA2	1,0	1,3	1,0	0,5	0,4	1,4
		> 5000	5000/9s	PNA3	0,5	0,4	0,5	0,2	0,2	1,4
		3601		STL	10,4	11,6	10,4	4,9	4,5	8,4
		4366		STL	9,6	11,3	9,6	4,5	4,3	7,6
		4067		STL	11,3	13,3	11,3	5,7	5,2	9,1
		4544		LCA	9,4	12,6	9,4	4,6	4,0	8,9
		5357	5000/28s	LCA	9,3	11,6	9,3	4,3	3,7	8,3
		332		LCA	9,7	12,5	9,7	x	4,1	8,9
		> 5000	5000/12s	UEA	1,3	1,9	1,3	0,5	0,6	1,3
		> 5000	5000/15s	UEA	1,3	1,8	1,3	0,4	0,4	0,9
		> 5000	5000/15s	UEA	1,5	2	1,5	0,5	0,4	0,9
		> 5000	5000/12s	DBA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
		> 5000	5000/9s	DBA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		> 5000	5000/14s	DBA	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
HT 1376	28.11.2011	2972		WGA1	37,8	37,9	37,8	18,1	16,3	19,0
		3691		WGA2	36,9	39,6	36,9	20,3	17,2	20,6
		3955		WGA3	37,7	39,8	37,7	20,2	19,1	22,1
		> 5000	5000/25s	PNA1	8,8	9,7	8,8	5,6	5,9	8,4
		> 5000	5000/20s	PNA2	3,0	3,7	3,0	2,8	3,4	5,4
		> 5000	5000/23s	PNA3	3,1	3,5	3,1	2,9	3,6	5,2
		2903		STL	20,3	21,3	20,3	11,4	12,4	12,5
		3611		STL	19,8	20,3	19,8	11,5	12,4	12,8
		3363		STL	19,6	21,2	19,6	12,8	12,6	13,4
		3319		LCA	21,3	23	21,3	10,5	10,9	13,5
		2571		LCA	18,4	21	18,4	9,7	11,3	10,9
		2303		LCA	19,2	22,2	19,2	x	11,7	11,7
		3318		UEA	1,7	2	1,7	0,8	0,9	1,0
		> 5000	5000/25s	UEA	1,9	2,1	1,9	0,9	1,0	1,1
		> 5000	5000/25s	UEA	2,0	2,1	2,0	0,9	1,0	1,0
		> 5000	5000/24s	DBA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
		4959		DBA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
		3427		DBA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
HT 1376	30.11.2011	4572		WGA1	38,8	41,3	38,8	14,1	13,9	25,4
		> 5000	5000/28s	WGA2	37,3	40,1	37,3	15,3	14,3	25,6
		> 5000	5000/23s	WGA3	37,0	39,2	37,0	16,2	15,0	24,9
		> 5000	5000/20s	PNA1	3,3	4,4	3,3	3,0	3,5	23,4
		> 5000	5000/30s	PNA2	3,4	4,3	3,4	3,3	3,7	6,7
		> 5000	5000/22s	PNA3	3,4	4,1	3,4	3,2	3,6	5,9
		4601		STL	19,2	20,7	19,2	9,6	8,9	13,3
		3439		STL	18,8	19,2	18,8	10,4	9,5	13,5
		3363		STL	19,4	20,3	19,4	10,3	9,1	14,5
		3760		LCA	18,6	20,7	18,6	9,4	8,9	14,7
		> 5000	5000/27s	LCA	22,6	24,5	22,6	10,2	9,4	16,1
		> 5000	5000/27s	LCA	21,8	23,9	21,8	10,3	9,2	15,0
		> 5000	5000/23s	UEA	2,4	2,7	2,4	1,0	0,9	1,6
		> 5000	5000/22s	UEA	2,6	2,7	2,6	1,1	1,0	1,6
		> 5000	5000/20s	UEA	2,4	2,4	2,4	1,0	0,8	1,3
		> 5000	5000/23s	DBA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
		> 5000	5000/22s	DBA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
		> 5000	5000/20s	DBA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

129 T p2	31.03.2011	466	WGA1	73,8	77,1	73,8	42,6	38,4	74,6
		496	WGA2	121,4	122,8	121,4	69,6	63,1	94,3
		498	WGA3	131,1	135,1	131,1	79,4	74,4	112,0
		625	PNA1	1,5	1,9	1,5	0,9	2,6	7,0
		622	PNA2	3,4	3,6	3,4	1,4	1,6	7,0
		836	PNA3	0,8	1,4	0,8	0,4	0,5	2,8
		383	LCA1	31,0	34,3	31,0	14,2	17,1	
		274	LCA2	31,4	32	31,4	13,3	14,6	26,1
		507	LCA3	33,0	38,6	33,0	18,3	18,7	27,1
		243	UEA1	29,1	35,1	29,1	14,7	14,6	29,9
		319	UEA2	29,2	28,4	29,2	14,9	14,3	20,9
		460	UEA3	28,8	33,4	28,8	14,7	14,6	17,2
130Tp2	23.03.2011	288	WGA1	106,0	92,8	106,0	82,4	93,6	94,4
		175	WGA2	106,5	126,9	106,5	94,2	79,9	97,9
		215	WGA3	105,3	129,4	105,3	77,5	71,0	95,5
		296	WGA4	118,6	161,7	118,6	83,3	80,1	102,2
130Tp3	04.04.2011	633	WGA1	56,8	183,3	x	85,3	64,0	93,4
		118	WGA2	169,3	135,2	169,3	76,3	54,7	47,0
		44	WGA3	130,6	157,8	130,6	86,5	x	x
		127	PNA1	13,6	3,1	13,6	1,4	2,9	4,9
		116	PNA2	7,4	2,5	7,4	1,0	1,2	2,1
		79	PNA3	1,1	1,4	1,1	0,5	1,2	x
		88	LCA1	55,6	113,9	55,6	27,0	37,9	24,8
		103	LCA2	47,1	81,1	47,1	30,1	42,3	41,9
		138	LCA3	64,3	70,8	64,3	x	27,2	40,9
		84	UEA1	3,0	5,5	3,0	1,4	1,5	3,9
		138	UEA2	7,4	6,6	7,4	3,8	2,0	3,6
		104	UEA3	6,3	6,8	6,3	3,8	2,1	2,0
135Tp3	04.04.2011	440	WGA1	131,5	153,3	131,5	x	x	123,1
		320	WGA2	132,0	140,7	132,0	77,4	75,9	115,0
		552	WGA3	115,4	138,7	x	70,8	77,5	107,7
		726	PNA1	2,3	2,7	2,3	1,3	1,9	2,6
		684	PNA2	4,3	2,3	4,3	1,4	1,6	1,7
		499	PNA3	1,9	2	1,9	0,5	2,7	1,7
		327	LCA1	53,8	52,7	53,8	38,7	44,4	49,8
		434	LCA2	72,3	70,5	72,3	45,4	44,2	58,8
		653	LCA3	59,5	70,8	59,5	33,8	x	52,4
		484	UEA1	5,0	6,2	5,0	2,4	2,7	3,2
		246	UEA2	5,8	5,3	5,8	2,5	3,1	3,5
		259	UEA3	9,2	9,4	x	5,5	4,6	5,0
136Tp1	28.03.2011	319	WGA1	176,1	179	176,1	111,0	110,4	154,9
		367	WGA2	158,4	169	158,4	122,2	96,2	150,6
		226	WGA3	178,9	166,5	178,9	122,9	104,7	105,8
		503	PNA1	x	x	x	x	x	x
		415	PNA2	2,4	2,9	2,4	2,0	2,3	2,8
		443	PNA3	2,6	3,2	2,6	0,9	3,1	2,9
		230	LCA1	59,7	69,2	59,7	47,3	55,1	64,8
		195	LCA2	63,6	87,9	63,6	53,8	44,6	66,6
		200	LCA3	60,5	58,8	60,5	31,4	36,3	63,6
		220	UEA1	21,8	21,8	21,8	13,2	14,6	16,8
		148	UEA2	26,3	27,8	26,3	17,5	19,9	21,8
		168	UEA3	26,8	25,4	26,8	13,8	14,4	17,7

135 G	23.03.2011	130	WGA1	109,6	117,8	109,6	74,1	69,2	86,6
		130	WGA2	107,5	x	107,5	68,0	61,3	79,6
		135	WGA3	116,0	112,7	116,0	77,5	71,4	90,7
		1029	PNA1	0,2	1,4	0,2	0,2	1,5	0,7
		1590	PNA2	3,2	3,6	3,2	2,1	2,5	3,4
		2481	PNA3	0,3	6,1	0,3	3,9	3,2	4,8
		778	LCA1	23,2	27,6	23,2	14,8	15,5	23,8
		2165	LCA2	24,3	27,8	24,3	13,6	14,4	23,5
		742	LCA3	0,2	33,4	0,2	16,3	18,1	23,0
		1718	UEA1	9,4	12,1	9,4	4,6	4,1	4,8
		1605	UEA2	8,2	9,2	8,2	3,8	5,3	6,3
		30	UEA3	13,8	14	13,8	7,1	7,9	8,5
135Gp1	28.03.2011	135	WGA1	157,8	165,3	157,8	87,4	71,0	109,6
		315	WGA2	152,7		152,7	95,3	76,8	100,9
		374	WGA3	147,4	159,1	147,4	91,7	68,2	117,0
		821	PNA1	6,3	7,1	6,3	6,1	8,0	11,6
		311	PNA2	x	x	x	x	x	x
		582	PNA3	0,9	1,7	0,9	1,5	0,9	1,4
		337	LCA1	41,0	46	41,0	23,7	23,2	39,2
		585	LCA2	39,7	48,2	39,7	26,2	27,4	40,4
		550	LCA3	43,5	48	43,5	21,5	18,4	29,7
		390	UEA1	15,7	19,4	15,7	7,6	7,1	12,9
		262	UEA2	10,7	13,8	10,7	4,6	6,0	9,1
		359	UEA3	11,3	14,2	11,3	5,2	6,6	10,0
137Gp2	31.03.2011	312	WGA1	154,5	161,3	161,3	112,2	107,1	128,9
		283	WGA2	153,5	162,2	162,2	111,0	100,4	134,3
		586	WGA3	139,6	142	142,0	88,0	76,7	117,7
		594	PNA1	0,6	1,5	1,5	0,5	1,8	3,2
		738	PNA2	3,6	4,2	4,2	4,6	5,3	7,6
		691	PNA3	1,5	1	1,0	0,7	0,7	3,0
		260	LCA1	43,1	41,3	41,3	24,5	23,4	35,2
		272	LCA2	45,4	47,7	47,7	30,1	27,7	43,3
		200	LCA3	45,6	55,8	55,8	28,7	29,4	41,5
		274	UEA1	21,7	22,9	22,9	8,1	10,4	15,2
		258	UEA2	21,1	22,3	22,3	9,3	9,1	14,2
		222	UEA3	15,5	18,5	18,5	10,1	94,7	10,8
137 Gp3	14.04.2011	122	WGA1	114,9	119,7	114,9	55,9	44,6	157,9
		238	WGA2	x	x	x	x	x	x
		195	WGA3	134,2	110,9	134,2	92,8	101,2	104,9
		146	PNA1	1,1	1,4	1,1	1,5	6,2	19,2
		232	PNA2	0,9	1	0,9	0,7	1,3	1,7
		215	PNA3	0,9	1	0,9	1,8	1,2	6,3
		246	LCA1	46,1	46,3	46,1	27,9	31,5	60,0
		128	LCA2	67,1	57	67,1	31,6	39,8	34,5
		181	LCA3	42,7	54,6	42,7	20,7	31,2	37,1
		232	UEA1	15,7	10,4	15,7	4,3	4,4	4,1
		296	UEA2	10,3	7,3	10,3	3,7	3,7	5,6
		167	UEA3	10,5	13,5	10,5	5,6	6,9	4,4

140G	14.04.2011	1666		WGA1	117,7	119,2		117,7	70,4	63,7	90,5
		570		WGA2	96,7	107,5		96,7	60,7	60,1	82,2
		x		WGA3	x	x		x	x	x	x
		x		PNA1	x	x		x	x	x	x
		x		PNA2	x	x		x	x	x	x
		x		PNA3	x	x		x	x	x	x
		517		LCA1	36,8	39,4		36,8	25,3	20,2	41,5
		873		LCA2	28,4	31,4		28,4	18,3	17,5	25,6
		x		LCA3	x	x		x	x	x	x
		48,4		UEA1	48,4	52,4		48,4	30,4	26,4	38,9
		45,8		UEA2	45,8	46,6		45,8	30,1	25,0	38,6
		x		UEA3	x	x		x	x	x	x

140Gp1	19.04.2011	689		WGA1	112,4	112,8		112,4	63,9	44,2	71,9
		656		WGA2	119,0	119,6		119,0	66,0	48,9	66,5
		506		WGA3	122,8	135,6		122,8	70,9	53,9	81,7
		734		PNA1	29,0	32,7		29,0	14,8	11,2	25,8
		894		PNA2	9,6	10,3		9,6	5,1	4,7	8,9
		809		PNA3	0,9	1,1		0,9	0,8	0,8	1,7
		443		LCA1	37,9	45,5		37,9	25,9	21,1	39,3
		644		LCA2	39,3	42,1		39,3	25,1	23,5	37,5
		664		LCA3	42,6	47,4		42,6	30,5	27,0	41,9
		583		UEA1	44,9	51,8		44,9	28,0	23,5	34,9
		424		UEA2	47,8	53,9		47,8	31,8	30,8	41,0
		362		UEA3	55,8	55,2		55,8	35,2	32,8	46,4

Zelltyp/ Passage	Datum	Events/ 30sec	Lektine	Vergleichsprobe			Proben				
				4°C	4°C	4°C	4°C	37°C	37°C	37°C	+Mon
				0min	60min	80min	0min	30min	90min	120min	+30min
T24p10	03.08.2011	987	WGA1	100,2	100,8	94,4	123,4	54,6	37,9	35,7	45,8
		1664	WGA2	99,3	90,9	90,6	107,0	50,5	37,5	35,0	x
		2182	WGA3	102,3	94,1	101,2	116,5	55,5	42,2	39,2	45,8
		2215	PNA1	1,2	1,2	1,4	0,9	0,5	0,5	0,5	0,8
		2376	PNA2	1,3	1,1	1,0	0,9	0,3	0,2	0,3	0,3
		2284	PNA3	1,1	1	0,9	0,9	0,2	0,2	0,2	0,3
		504	STL	69,4	67,2	66,4	62,9	37,3	31,4	26,2	23,6
		883	STL	67,3	64,3	59,1	68,7	39,4	32,5	30,0	30,4
		671	STL	61,2	51,6	51,1	69,1	42,8	34,5	30,5	27,6
		2144	LCA	19,7	18,3	17,4	24,0	7,2	6,1	5,8	9,4
		2993	LCA	19,1	17,3	16,5	22,2	6,6	5,0	4,5	7,9
		2638	LCA	20,7	19,4	18,5	19,8	6,2	5,3	4,9	8,2
		2389	UEA	14,6	13,5	12,9	14,0	3,7	3,3	3,0	3,7
		2016	UEA	14,4	13,4	12,2	14,1	3,2	2,7	2,5	3,1
		2559	UEA	15,2	13,3	13,2	12,6	3,1	2,7	2,3	3,2
		2355	DBA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		2296	DBA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		2349	DBA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		2356	PBS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		2318	PBS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

5.1.2. Versuche mit Neurominidase

Zelllinie	F-PNA-Konzentration	Neuraminidasekonzentration [U]	MFI [FIU]	Zellzahl
SV HUC.	250,0 pmol/ml	0	8,16	20722
			8,56	16103
			7,65	12953
		0,05	33,9	12042
			34,8	13792
			28,7	17432
		0,1	35,4	12602
			38,7	22543
			32,1	19322
	500,0 pmol/ml	0	4,02	13863
			4,08	17222
			6,3	18482
		0,05	27,6	27372
			27,3	8892
			26,4	13162
		0,1	27,1	14632
			31,1	19042
			32,8	19742

T24	250,0 pmol/ml	0	3,77	26253
			1,4	2181
			1,58	3462
		0,05	65,1	11132
			73,4	21632
			70,7	14282
		0,1	77	16592
			73,7	17992
			62,4	17992
	500,0 pmol/ml	0	4,92	26252
			5,13	27302
			5,21	22612
		0,05	76,8	17852
			75	14772
			71,3	17922
		0,1	80,6	14702
			76,5	4055
			74,5	15822

647V	250,0 pmol/ml	0	7,44	20722
			8,18	16103
			7,9	12953
		0,05	14,3	12042
			12,9	13792
			14,2	17432
		0,1	15,4	12602
			16,3	22543
			15,2	19322
	500,0 pmol/ml	0	12	13863
			10,6	17222
			10,6	18482
		0,05	20,9	27372
			19,8	8892
			18,9	13162
		0,1	21,7	14632
			21,2	19042
			20	19742

RT112	250,0 pmol/ml	0	3,08	30032
			2,82	31852
			2,71	31503
		0,05	42,5	30242
			43,6	3573
			49,9	28982
		0,1	49,6	25,972
			50,1	27232
			43,2	26392
	500,0 pmol/ml	0	4,32	33953
			4,71	32832
			5,21	31992
		0,05	48,7	27162
			51,3	29125
			49,9	28982
		0,1	53,4	22682
			56,1	23452
			55,3	19533

HAT1376	250 pmol/ml	0	19,8	17220
			23,8	15682
			23,7	21142
		0,05	30,2	25413
			36,6	23103
			41,6	27092
		0,1	34,8	27933
			40,9	20232
			44,2	23312
	500 pmol/ml	0	26,6	20512
			26,6	20302
			25,8	16662
		0,05	40,9	20652
			46,1	19533
			35,8	30172
		0,1	44	26603
			41,05	24782
			34,3	35772

Literaturverzeichnis

- [1] Chikara Ohyama, *Glycosylation in bladder cancer*, The Japan Society of Clinical Oncology, 2008
- [2] Claus-Michael Lehr, *Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives*, S19-29, Journal of Controlled Release 65, Elsevier, 2000
- [3] Dr. Wilfried Hoffmann, *Defekte des Blasenepithels – Ursachen und Behandlungsoptionen*, S.12, 1. Auflage, UNI-MED Verlag AG, ISBN9783837413533, 2012
- [4] Lippert, *Lehrbuch Anatomie*, S.373-374, 8. Auflage, Elsevier Urban & Fischer ISBN9783437423659, 2011
- [5] Mutschler, *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*, S439-440, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, ISBN3804716164, 1999
- [6] Dr. Wilfried Hoffmann, *Defekte des Blasenepithels – Ursachen und Behandlungsoptionen*, S.12 & S.13, 1.Auflage, UNI-MED Verlag AG, ISBN9783837413533, 2012
- [7] Werner Buselmaier, *Biologie für Mediziner*, S. 15 & S.16, 13.völlig neu bearbeitete Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN9783662461778, 2015
- [8] Gerald Karp, *Molekulare Zellbiologie*, S. 15, Springer-Verlag GmbH, ISBN9783540238577, 2005
- [9] Margit Pavelka, Jürgen Roth, *Funktionelle Ultrastruktur, Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben*, S.148, SpringerWienNewYork, ISBN103211835636, 2005
- [10] Claus-Michael Lehr, *Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives*, Department of Biopharmaceutical Technology, Saarland University, 1999
- [11] Hartmut Heine, *Lehrbuch der biologischen Medizin: Grundlagen und Extrazelluläre Matrix*, S.49, 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Karl F.Haug Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, ISBN9783830475446, 2014
- [12] Dieter Jocham, Kurt Miller, *Praxis der Urologie in 2 Bänden*, Band II, S.105, 2. Auflage, Journal für Urologie und Urogynäkologie; S.22-23 (3) Ausgabe für Österreich, Thieme Verlag Stuttgart, New York, ISBN9783131434715, 2009
- [13] herausgegeben von Sebastian Wille, Axel Heidenreich, *Atlas der diagnostischen Endourologie*, S.72, Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 978-3-13-143471-5, 2009

- [14] Z. Petrovich, L. Baert, L.W. Brady, *Carcinoma of the Bladder – Innovations in Management*, Springer, (Eds.) 2 Natural History of Bladder Carcinoma, ISBN 3540608850, 1997
- [15] Branch RA, Chern HD, Adedoyin A, et al., *The precarcinogen hypothesis for bladder cancer: activities of individual drug metabolizing enzymes as risk factors*, Pharmacogen 5, S97-S102, 1995
- [16] Kaufmann JM, Fam B, Jacobs SC, Gabilondo F, Yalla Y, Kane JP, Rossier AB, *Bladder cancer and squamous metaplasia in spinal cord injury patients*, The Journal of Urology 118: S967-971, 1978
- [17] Lehmann, Retz, Stöckle (Hrsg.), *Blasenkarzinom Neue Perspektiven in der Diagnostik und Behandlung, Kapitel 3: Umweltfaktoren als wesentliche Ursache des Blasenkarzinoms und die Epidemiologie – Ein historischer Überblick*, Springer, S.17-23, ISBN9783540205043, 2004
- [18] Dieter Jocham, Kurt Miller, *Praxis der Urologie in 2 Bänden, Band II, 2. Auflage*, Thieme, S.108, Journal für Urologie und Urogynäkologie, Thieme Verlag Stuttgart, New York, ISBN3131260025, 2003
- [19] M.Scholz, A.Buchner, M.De santis, M.Klimpfinger, *Leitlinie Blasenkarzinom*, Journal für Urologie und Urogynäkologie, 17 (3) Ausgabe für Österreich, S.22-30, 2010
- [20] Dieter Jocham, Kurt Miller, *Praxis der Urologie in 2 Bänden, Band II, S.136, 2. Auflage*, Thieme, Journal für Urologie und Urogynäkologie, Thieme Verlag Stuttgart, New York, ISBN3131260025, 2003
- [21] <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9628642>, 12.5.2016 23:47
- [22] Maximilian Lackner (Editor), *Laser in Chemistry, Influencing Matter*, Volume 2, S.1223, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGAA, ISBN: 9783527319978, 2008
- [23] <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=4237298CA.pdf>
12.05.2016 23:34
- [24] <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=252>, 13.07.2015 01:17
- [25] <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=235>, 13.07.2015 01:20
- [26] <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=247>, 13.07.2015 01:22
- [27] <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=227>, 13.07.2015 01:25

- [28] <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=323>, 13.07.2015 01:27
- [29] <http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=215>, 13.07.2015 01:28
- [30] H.H. Mollenhauer, D.J. Morre, and L.D. Rowe, *Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship of toxicity*, S.225-246, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1031, no. 1, 1990
- [31] Daniel Lowicki, Adam Huczyński, *Structure and Antimicrobial Properties of Monensin A and Its Derivates: Summary of Achievements*, Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Volume 2013, Article ID 742149, 2013
- [32] Michael Wirth, Carsten Kneuer, Claus-Michael Lehr, and Franz Gabor, *Studying cellular binding and uptake of bioadhesive lectins*, Cell Culture Models of Biological Barriers, In vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery, Claus Michael Lehr, Saarland University, Saarbrücken, Germany, Taylor & Francis, London, New York, S.87, ISBN 0415277248, 2002
- [33] Marua Prevato et al., *Expression and Characterization of Recombinant, Tetrameric and Enzymatically Active Influenza Neuraminidase for the Setup of an Enzyme-Linked Lectin-Based Assay*, PLoS One., e0135474, 2015
- [34] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/W11261>, 20.09.2015 18:23
- [35] <http://www.chemie.de/lexikon/DAPI.html>, 20.09.2015 18:29
- [36] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1801?lang=de®ion=AT>, 5.10.2015 23:00
- [37] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l0668?lang=de®ion=AT>, 4.10.2015 15:06
- [38] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/hpa001637?lang=de®ion=AT>, 4.10.2015 15:17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Aufbau der Glykokalyx.....	13
Abbildung 4-1:	MFI (SV HUC) inkl. Standardabweichung	37
Abbildung 4-2:	MFI (SV HUC) inkl. Standardabweichung	37
Abbildung 4-3:	MFI (5637) inkl. Standardabweichung.....	39
Abbildung 4-4:	MFI (5637) inkl. Standardabweichung.....	39
Abbildung 4-5:	MFI (T24) inkl. Standardabweichung.....	41
Abbildung 4-6:	MFI (T24) inkl. Standardabweichung.....	41
Abbildung 4-7:	MFI (647V) inkl. Standardabweichung	43
Abbildung 4-8:	MFI (647V) inkl. Standardabweichung	43
Abbildung 4-9:	MFI (RT112) inkl. Standardabweichung	45
Abbildung 4-10:	MFI (RT122) inkl. Standardabweichung	45
Abbildung 4-11:	MFI (HT1376) inkl. Standardabweichung	47
Abbildung 4-12:	MFI (HT1376) inkl. Standardabweichung	47
Abbildung 4-13:	MFI (129Tp2) inkl. Standardabweichung.....	49
Abbildung 4-14:	MFI (129Tp2) inkl. Standardabweichung.....	49
Abbildung 4-15:	MFI (130Tp2) inkl. Standardabweichung.....	51
Abbildung 4-16:	MFI (130Tp2) inkl. Standardabweichung.....	51
Abbildung 4-17:	MFI (130Tp3) inkl. Standardabweichung.....	53
Abbildung 4-18:	MFI (130Tp3) inkl. Standardabweichung.....	53
Abbildung 4-19:	MFI (135Tp3) inkl. Standardabweichung.....	55
Abbildung 4-20:	MFI (135Tp3) inkl. Standardabweichung.....	55
Abbildung 4-21:	MFI (136Tp1) inkl. Standardabweichung.....	57
Abbildung 4-22:	MFI 136Tp1) inkl. Standardabweichung.....	57
Abbildung 4-23:	MFI (Tp HUC) inkl. Standardabweichung.....	59

Abbildung 4-24:	MFI (Tp HUC) inkl. Standardabweichung.....	59
Abbildung 4-25:	MFI (135Gp1) inkl. Standardabweichung	61
Abbildung 4-26:	MFI (135Gp1) inkl. Standardabweichung	61
Abbildung 4-27:	MFI (135Gp2) inkl. Standardabweichung	63
Abbildung 4-28:	MFI (135Gp2) inkl. Standardabweichung	63
Abbildung 4-29:	MFI (137Gp2) inkl. Standardabweichung	65
Abbildung 4-30:	MFI (137Gp2) inkl. Standardabweichung	65
Abbildung 4-31:	MFI (137Gp3) inkl. Standardabweichung	67
Abbildung 4-32:	MFI (137Gp3) inkl. Standardabweichung	67
Abbildung 4-33:	MFI (140Gp1) inkl. Standardabweichung	69
Abbildung 4-34:	MFI (140Gp1) inkl. Standardabweichung	69
Abbildung 4-35:	MFI (140Gp2) inkl. Standardabweichung	71
Abbildung 4-36:	MFI (140Gp2) inkl. Standardabweichung	71
Abbildung 4-37:	MFI (Np HUC) inkl. Standardabweichung	73
Abbildung 4-38:	MFI (Np HUC) inkl. Standardabweichung	73
Abbildung 4-39:	Lektinbindungsversuch, Vergleich der Oberflächenadhäsion (MFI) bei 4°C zum Anfangszeitpunkt (0min)	75
Abbildung 4-40-A:	Färbung: SV HUC 4°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün), anti-ZO1-AK (rot), DAPI (blau), mit PBS gewaschen; 40x	80
Abbildung 4-41-A :	Färbung: SV HUC 4°C, f-WGA (grün), anti-Lamp2-AK (rot), DAPI (blau) mit PBS gewaschen; 40x	82
Abbildung 4-42-A:	Färbung: SV HUC 4°C, f-BSA/WGA-Konjugat (grün), anti-Lamp2-AK (rot), DAPI (blau), mit PBS gewaschen; 40x	83
Abbildung 4-43-A:	Färbung: SV HUC 4°C 2h f-BSA/WGA-Konjugat; mit PBS gewaschen; 40x.....	87
Abbildung 4-44-A:	Färbung: SV HUC, 37°C f-BSA/WGA, mit PBS gewaschen; 63x	88
Abbildung 4-45-A:	Zellgröße 647V	89
Abbildung 4-46:	MFI der Zelllinien SV HUC, T24,647V,RT112 und HT1376 nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Neuraminidase und Inkubation mit F-PNA.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Zelllinien Übersicht: Hersteller und Charakterisierung	23
Tabelle 3-2: Lektinbindungsstudie: Messzeitpunkte und Proben temperatur	27
Tabelle 3-3: Neuraminidaseversuch: Menge der zugeführten Neuraminidase (units) und des F-PNA (pmol)	29
Tabelle 4-1: Direktvergleich der MFI der unterschiedlichen Urothelzelltypen zu den Messzeitpunkten (37°C 90min, Monensin, 4°C 0min)	76
Tabelle 4-2: Direktvergleich der MFI der Tumorprimärzelllinien zu den Messzeitpunkten (4°C 0min, 37°C 90min, Monensin)	77
Tabelle 4-3: Direktvergleich der MFI der gesunden Primärzelllinien zu den Messzeitpunkten (4°C 0min, 37°C 90min, Monensin)	78
Tabelle 4-4: Direktvergleich der MFI der Zelllinien nach Vorbehandlung mit Neuraminidase und Inkubation mit F-PNA	92