

Aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. habil. Steffen Hauptmann)



# **Expressionsmuster zuckerbindender Proteine der Schleimhaut in Adenomen und Karzinomen (einschließlich ihrer Metastasen) des Kolons**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**urn:nbn:de:gbv:3-000006174**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006174>]

von Philipp Martin Grün

geboren am 18.01.1971

in Würzburg

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. F.W. Rath

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Rath
2. PD Dr. med. Keyszer
3. PD Dr. med. Becker (Halle-Dessau)

Eröffnung: 03.06.2003

Verteidigung: 11.12.2003

## Referat und bibliographische Beschreibung

Das spezifische Vorkommen endogener Lektine in der Dickdarmschleimhaut, aber auch an Polypen, Karzinomen und Metastasen wurde in der Vergangenheit nachgewiesen. Anhand glykohistochemischer Methoden an formalinfixierten Präparaten wurde der Weg der malignen Transformation (Adenom-Dysplasie-Karzinom-Sequenz) unter Einsatz von Neoglykoproteinen nachvollzogen.

Insbesondere schwierige diagnostische Fragestellungen am Übergang von benignen zu malignen Läsionen im Darm sind für den Pathologen von besonderem Interesse (z.B. Invasion/ Pseudoinvasion). Grenzfälle der histopathologischen Diagnostik wurden untersucht und Vergleiche zwischen Primärtumor und Metastase angestellt.

Spezifische Bindungen von Neoglykoproteinen in den verschiedenen untersuchten Entitäten konnten nachgewiesen werden. Die Ausprägung der Oberflächenglykoproteine, die in dem Bindungsmuster der genutzten Neoglykoproteine widergespiegelt wird, stellen einen Ausdruck der Zellaktivität und -differenzierung dar. Bei starker Bindungsheterogenität müssen verschiedene Funktionszustände der markierten Zellen (Änderung der Glykokalix) aber auch zunehmende Entdifferenzierung im Verlauf der malignen Transformation diskutiert werden.

Besonders intensiv imponierten bei Adenomen Anfärbung für glc-Nac und man, bei Karzinomen für  $\alpha$ -gal-Nac.

Die verwendeten Neoglykoproteine können bisher nicht zur näheren Spezifizierung der Adenom-Dysplasie-Sequenz in der pathologischen Routinediagnostik oder zur besseren Einschätzung von Karzinomen beitragen, da eine zu große interindividuelle und intraindividuelle Heterogenität vorliegt.

Komplexere Zuckerstrukturen als Schlüssel zum besseren Verständnis der Zellfunktion und -interaktion sollten Gegenstand weitere Forschungen auf dem Weg künftiger Diagnostik und Therapie des Kolonkarzinoms und dessen Metastasen sein.

Grün, Philipp: Expressionsmuster zuckerbindender Proteine der Schleimhaut in Adenomen und Karzinomen (einschließlich ihrer Metastasen) des Kolons. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 58 Seiten, 2003

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>3</b>
<b>3. Allgemeine Voraussetzungen:</b> Neoglykoproteine und ihre Bedeutung als Marker endogener zuckerbindender Proteine (Lektine)	<b>4</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>7</b>
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>11</b>
5.1 Die normale Dickdarmschleimhaut	11
5.2 Der hyperplastische Polyp	11
5.3 Das Adenom	15
5.4 Das Karzinom	20
5.5 Metastasen	22
5.6 Zusammenfassung	26
<b>6. Diskussion</b>	<b>28</b>
<b>7. Zusammenfassung und Schlussfolgerung</b>	<b>39</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>41</b>
<b>9. Anlagen</b>	<b>57</b>
<b>10. Thesen</b>	<b>58</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Streptavidin-Biotin-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
$\alpha$ -gal	$\alpha$ -N-Acetylgalaktosamin-BSA
$\beta$ -gal	$\beta$ -N-Acetylgalaktosamin-BSA
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
DS	Dickdarmschleimhaut
E.-Nr.:	Eingangsnummer
evtl.	eventuell
fuc	Fucose-BSA
glc	N-acetylglucosamin-BSA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
hyperpl.	hyperplastisch
lac	Laktose-BSA
malt	Maltose-BSA
man	Mannose-BSA
NGP	Neoglykoprotein
NK-(Zellen)	natural killer
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PNA	Peanut Agglutinin
Tab.	Tabelle
TF-Antigen	Thomsen-Friedenreich-Antigen
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation

## 1. Einleitung

Das Kolonkarzinom, seine Entstehung und mögliche Therapie beschäftigen die Medizin schon allein durch seine weite Verbreitung und Häufigkeit. Es ist der zweithäufigste Krebs der Frauen, der dritthäufigste maligne Tumor bei den Männern, (15.9% respektive 14.6% der Gesamtneuerkrankungen: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 1999). Bei den durch Krebs verursachten Sterbefällen liegt der Dickdarmkrebs bei beiden Geschlechtern sogar an zweiter Stelle.

In prognostischer Sicht ist bis heute die möglichst frühzeitige Entdeckung einer zum Karzinom führenden Läsion sehr wichtig, da die chirurgische Intervention zur Zeit im Vordergrund steht. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, schon in der frühen Krebsdiagnostik benigne von malignen Tumoren zu unterscheiden, um eine adäquate Therapie einleiten zu können. Von großem Interesse ist hierbei der Übergang von Polyp/Adenom zum Karzinom, da das Langzeitüberleben stark von der Invasionstiefe und der Metastasierung eines malignen Tumors abhängt, die in frühen Stadien der Karzinogenese per Definitionem noch nicht vorkommt. Ulrich et al. (1982) empfehlen daher in einer Studie die lokale Exzision stark dysplastischer Areale der Dickdarmschleimhaut, um große chirurgische Eingriffe und deren Risiken für den Patienten zu mindern. Die Größe kolorektaler Polypen und das Vorkommen hochgradiger Dysplasie dienen bis heute als wichtige diagnostische Parameter für die Wahrscheinlichkeit einer karzinomatösen Entartung (Mc Donald et al. 1999; Rosch 1997). Da die Adenom-Karzinom-Sequenz sehr langsam verläuft, ist die Erforschung weiterer Parameter z.B. zur Erkennung eines geänderten Zell-zu-Zell Verhaltens eine wichtige Aufgabe zur Verbesserung von Diagnostik, Therapie und letztlich zur Verlängerung der Überlebenszeit. Sichere, diagnostische und prädikative Marker, wie es sie beispielsweise für das Mammakarzinom gibt (z.B. Hormonrezeptoren), sind für das Kolonkarzinom derzeit in der Routinediagnostik noch nicht verfügbar (Fey 2000).

In der onkologischen Forschung bemüht man sich auch um monoklonale Antikörper, die selektiv Tumorzellen schädigen. Ein Beispiel ist der Antikörper 17-1A, der gegen membranständiges Glykoprotein gerichtet ist (Riethmüller et al. 1998).

Ein anderer Ansatz ist die Immuntherapie mit Tumorzell- Vakzinen (Hanna et al. 2001; Vermorken 2000).

Ein kleiner Schritt in diese Richtung könnten hierbei auch die Neoglykoproteine sein, die synthetisch hergestellte Konjugate sind und als Liganden an der Zelloberfläche (Glykokalix) fungieren. An die Glykokalix ist die Spezifität der Zelle gebunden, sie sorgt dafür, dass sich gleichartige Zellen erkennen (Junqueira und Carneiro 1996). Da Zellen mit Änderung ihrer Aktivitätsparameter auch eine jeweils spezifische Oberflächenstruktur endogener Lektine präsentieren, die auch für die Zell- Interaktionen von Bedeutung ist, könnte eine Typisierung entsprechender Oberflächenstrukturen für die künftige pathologische Diagnostik ein weiteres Hilfsmittel sein, um Zellen im Verlauf der Kanzerisierung zu charakterisieren. Besonders Grenzfälle der Diagnostik, bei denen die sichere Entscheidung von großer Wichtigkeit für den Patienten, den behandelnden Arzt wie auch für den Pathologen ist, könnten durch diesen Forschungsansatz erleichtert werden.

Gerade in den für Prognose und Therapie entscheidenden Stadien der Adenom-Karzinom-Sequenz wären Hilfsmittel in der Dysplasiediagnostik wünschenswert. Im Falle gesicherter Pseudoinvasion könnte dem Patienten aufwendige und oft die Lebensqualität einschränkende Chirurgie erspart bleiben.

Auf dem Gebiet der Lungenkarzinomforschung haben Kayser et al. (1989 a, 1989 b, 1991 a, 1991 b, 1994, 1998, 2001) in den letzten Jahren viel mit sogenannten Neoglykoproteinen (synthetische Zucker-BSA-Konjugate) als Gegenstücke zu den in der Tumorforschung schon bekannten Lektinen geforscht und sind zu wesentlichen Ergebnissen gekommen. Die Neoglykoproteine konnten z.B. zur Differenzierung von Bronchialkarzinomen angewendet werden (Gabijs 1990; Kayser et al. 1989 a).

## 2. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Wertigkeit der synthetischen Neoglykoproteine in der pathologisch-histologischen Routinediagnostik untersucht werden. Es wurden nicht neoplastische Kolonschleimhaut, hyperplastische und adenomatöse Polypen im Vergleich zu neoplastischen Veränderungen bis hin zum Karzinom und dessen Metastasen untersucht.

Das Auffinden spezifischer Bindungsmuster der verschiedenen Entitäten war hierbei ein Ziel, wobei folgende Unterscheidungsmöglichkeiten gesucht wurden:

neoplastisch  $\Leftrightarrow$  nicht neoplastisch

benigne  $\Leftrightarrow$  maligne

Primärtumor  $\Leftrightarrow$  Metastase

Da auf dem Wege der Karzinogenese die verschiedenen Dysplasiegrade durchschritten werden, soll durch den Versuch einer besseren Abgrenzung selbiger auch eine bessere Einschätzung des malignen Potentials einer Läsion ermöglicht werden.

Um Hinweise und Aufschlüsse über die Mechanismen der Organotropie der Metastasierung zu erlangen, wurde auch Wert auf die Auswertung von Kolonkarzinommetastasen im Vergleich zu den Primärtumoren gelegt. Wichtig hierbei ist auch die Frage nach dem Erhalt der für den Tumor spezifischen Oberflächenstrukturen endogener, zuckerbindender Proteine, um bei der Suche nach einem unbekanntem Primärtumor evtl. mehr Informationen über dessen Sitz zu erhalten.

Diese Informationen könnten ein zusätzlicher Aspekt für die Prognose der Erkrankung des Patienten sein.

### 3. Allgemeine Voraussetzungen

Neoglykoproteine und ihre Bedeutung als Marker endogener, zuckerbindender Proteine (Lektine).

Die spezifische Interaktion zwischen Proteinen und Karbohydraten zellulärer Glykokonjugate ermöglicht die Steuerung wichtiger interzellulärer Erkennungs- und Signalprozesse. Dieses spezifische Zucker-Erkennen ist die Voraussetzung für das Haften von Lektinen, lektintragenden Zellen (Rosettenbildung) oder Bakterien (Adhäsion) und anderen biologischen Partikeln (Schwämme) sowie für die Agglutinations-(Erythrozyten) und Präzipitationsphänomene (Glykokonjugate) verschiedenster Art (Uhlenbruck et al. 1986). Lektine, hergeleitet von dem lateinischen Wort „legere“ = auswählen, sind zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nicht immunen Ursprungs, die Zellen agglutinieren und/ oder Glykokonjugate präzipitieren (Alroy et al. 1988 b). Sie wurden von Stillmark (1888) entdeckt, der über Erythrozytenagglutination durch Zugabe eines Extraktes aus *Ricinus Communis* berichtete. Seither wurden zahlreiche Lektine unterschiedlichsten Ursprungs (Pflanzen, Bakterien, Pilzen, wirbellosen Tieren und Wirbeltieren) identifiziert, gereinigt und charakterisiert (Alroy et al. 1988 a). Es gibt drei Gruppen von Lektinen, die in lösliche, membranintegrierte und sekundär erworbene Membranzell-Lektine eingeteilt werden (Uhlenbruck et al. 1986). Geprägt wurde die Bezeichnung dieser Stoffgruppe als Lektine durch Boyd (1954). Lektine als von der Natur synthetisierte und selektionierte Stoffe können isoliert, manipuliert und als Werkzeug eingesetzt (histochemische Sonden) werden. Es handelt sich dabei um ein duales Konzept, das große Ähnlichkeit mit dem Schlüssel-Schloß-Prinzip der Enzymologie hat und in der Interaktion eines membranständigen Lektins mit dem kovalenten Zucker an einer anderen Zelle besteht, ohne dass jedoch hierbei die kovalenten Bindungen des Glykokonjugates alteriert werden. Diese Interaktion stellt die molekularbiologische Grundlage so elementarer Funktionen wie Zelladhäsion, Zell-Zell-Interaktion und Zellerkennung dar (Vierbuchen 1987). Siehe auch Abb. 1 zum Aufbau der Zellmembran.

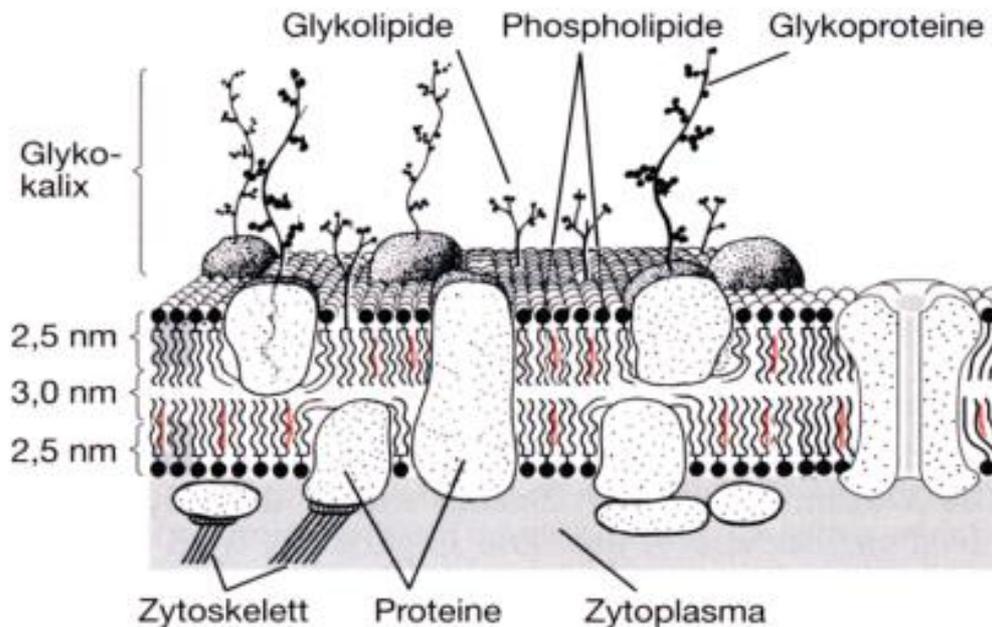


Abb. 1: Schema Fluid-Mosaic-Modell (nach Schiebler 1995)

Maligne Transformation und Tumorausbreitung können mit bestimmten Veränderungen der Struktur des Kohlenhydratanteils zellulärer Glykokonjugate einhergehen. Neben ihrem Wert als mögliche Differenzierungsmarker in der Histopathologie besitzen Zucker und zuckerbindende Proteine funktionelle Bedeutung bei Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen. Hierbei fungieren endogene Lektine als physiologische Rezeptoren\* (Alhadeff 1989; Gabius et al. 1992). Die Anzahl und Art der Bindungsstellen für einen bestimmten Zucker kann dabei korreliert sein mit dem Differenzierungsgrad oder dem metastatischen Verhalten der Zellen (Kayser et al. 1991 a; Lotan und Raz 1988 a, 1988 b; Raz et al. 1987). Raz und Lotan (1987) fanden in flusszytometrischen Untersuchungen eine verstärkte Oberflächenlektinexpression bei Zellen mit erhöhtem Metastasierungspotential. Unter Verwendung von monoklonalen Antilektin-Antikörpern konnte im Tierversuch die Metastasierung vermindert werden. Neoglykoproteine wurden als spezielle Liganden dieser endogenen, zuckerbindenden Strukturen (Lektine) synthetisiert, um an verschiedenen Organen, Tumoren und deren Metastasen über die Bindungsmuster Rückschlüsse auf Zellaktivität und eventuell Zellabstammung zu ziehen, z.B.

\* Rezeptor wird in dieser Arbeit als Bindungsstelle gebraucht, nicht wie im pharmakologischen Sinne

bei Lungentumoren und deren Metastasen (Gabius und Kayser 1989; Kayser et al. 1989 a; Kayser et al. 1991 a), an Makrophagen (Bardosi et al. 1989) dem Urothel (Gabius et al. 1992), Kolon (Gabius et al. 1991), Ovar (Feyler 1998), Pankreas (Walper 1999), und der Lymphogranulomatose (Nelius 1995) sowie an Zellen experimental erzeugter Weichgewebstumoren (Herling 1998; Knolle et al. 1993 a).

Diese Neoglykokonjugate können Oberflächenrezeptoren kenntlich machen, die weder durch Fixation verändert, noch durch endogene Liganden geblockt werden (Gabius et al. 1993).

Ein möglicher Nutzen der Lektine und Neoglykoproteine liegt nicht nur auf Seiten der besseren Diagnostik, sondern auch auf Seiten der Therapie (Gabius und Gabius 1994). Es kamen und kommen verschiedenste, gegenwärtig zumeist experimentelle Ansätze zur Anwendung. In Form von Mistellektin konnten sowohl immunologische Effekte als auch antitumorale/antimetastatische Resultate erhoben werden. Es wurde ebenfalls eine Erhöhung der Zahl der NK (natural killer) -Zellen und ihrer in vitro Aktivität gemessen. Dosisabhängig kam es zur Steigerung der Zahl der zu den NK-Zellen in Beziehung stehenden „large granular lymphocytes“. Auch ein Drug-Targeting wurde in Zusammenhang mit Neoglykoproteinen probiert (Gabius 1990). Bei Zytostatika konnte durch Kopplung an Neoglykoproteine eine mehr als zehnfache Toxizitätssteigerung an kultivierten Tumorzellen erreicht werden (Gabius et al. 1987). Durch Kopplung dieser zuckerbindenden Strukturen an gegen HIV wirksame Medikamente kommt es zu Steigerung der Wirkung gegen das HI-Virus (Molema und Meijer 1994). Lektine konnten experimentell eine Metastasierung von Tumorzellen durch Blockade der Oberflächenkonjugate verhindern (Beuth et al. 1988; Uhlenbruck et al. 1986).

#### 4. Material und Methoden

In die Untersuchungen wurden 37 Fälle des Instituts für Pathologische Anatomie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg aus den Jahren 1991 bis 1996 einbezogen (s. Anlage I). Dabei handelte es sich um 2 hyperplastische Polypen, 15 Adenome, 13 Karzinome des Kolons, 6 Lymphknotenmetastasen sowie eine Leber- und eine Mamma-Metastase kolorektaler Karzinome.

Die Präparate waren routinemäßig in 4% igem Formalin fixiert und in Paraffin (Schmelzpunkt 56°C) eingebettet worden.

Die Fälle wurden aus den Eingangsbüchern des Pathologischen Instituts herausgesucht, anhand von zum Teil neu angefertigten HE-Schnitten auf ihre Verwendbarkeit im Rahmen der Arbeit untersucht. Es sollten nur wenige Risse und Spalten im Präparat selbst und nach Möglichkeit neben pathologisch verändertem auch gesundes Gewebe im Schnitt enthalten sein. Es wurde darauf geachtet, dass das Areal der Hauptdiagnose nicht zu klein war. In die Auswertung der Präparate wurden nicht nur die Hauptdiagnose, sondern alle in die Wertung kommenden Kriterien einbezogen (nicht pathologisch und pathologisch verändertes Gewebe sowie enthaltene Dysplasiegrade). Aus diesem Grund erhöhte sich die Anzahl der bewerteten Fälle relativ und gleichzeitig wurden, da in einem Schnitt überall die gleichen Inkubationsbedingungen herrschten, interindividuelle Bindungsunterschiede ausgeschlossen. Der Klassifizierung der histologischen Befunde lagen die Empfehlungen der WHO zugrunde.

Nach Auswahl der histologischen Fälle erfolgte die erneute Aufarbeitung der archivierten Blöcke, so dass pro Block 10 neue Schnitte (ca. 2-4 µm dick) mit dem Mikrotom angefertigt und zur verbesserten Haftung des Präparates am Objektträger mit Natriumsilikat aufgezogen wurden.

Anschließend erfolgte die Markierung der endogenen Lektine glykohistochemisch mit jeweils 7 synthetischen Neoglykoproteinen\* (siehe Tab.1). Nach ausreichender Inkubationszeit der Neoglykoproteine erfolgte die Visualisierung spezifischer Lektinbindung durch eine histochemische Nachweisreaktion.

---

\*Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Gabius für die freundliche Zurverfügungstellung der Neoglykoproteine.

Als Detektionssystem wurde ein Streptavidin-Biotin-Komplex verwendet, zur Farbentwicklung Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und das Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC).

Um die spezifische Bindung sicherzustellen wurde eine Leerprobe ohne Neoglykoprotein mitgeführt.

Abschließend wurden die Präparatereihen nach in der Literatur üblichen Auswertungskriterien beurteilt.

Der genaue Ablauf mit allen verwendeten Materialien, Inkubationszeiten und Auswertungskriterien wird auf den folgenden Seiten in einer Übersicht wiedergegeben.

Übersicht der histochemischen Methodik:

Von den Blöcken wurden 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Natriumsilikat auf Objektträger aufgezogen und dann zum Antrocknen über Nacht bei 45° Celsius im Brutschrank belassen wurden.

Die Entparaffinierung erfolgte durch	3x Xylol	10 min
	2x Alkohol (100%)	5 min
	1x Alkohol ( 96%)	10 min

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte eine 10 minütige Inkubation in 3%iger Wasserstoffperoxid-Methanollösung gefolgt von der partiellen Rehydratation in absteigender Alkoholreihe für je 5 min. bis zu einer 0,15M phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2-7,4), in der die Präparate für 3 min. verblieben.

Die weiteren Schritte erfolgten in der feuchten Kammer:

- Blockierung mit Rinderserumalbumin (BSA)  
(0,03g BSA in 30 ml PBS) 15 min
- Abgießen der BSA-Lösung und Inkubation mit  
den Neoglykoproteinen aus der 1:10 verdünnten Stammlösung  
(1mg je Zucker in 2ml BSA, 1mg gelöst in 1ml PBS) 90 min
- 2x Abspülen der Schnitte in PBS je 5 min
- Auftragen der ABC-Lösung (Streptavidin-Biotin-Komplex)

(Vectastain ,Firma Vectors)	60 min
-2x Abspülen der Schnitte in PBS	je 5 min
-Inkubation mit AEC (von Maxi Tags über die Firma Quartett)	30 min
-2x Abspülen mit Leitungswasser	je 3 min
-Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer	1 min

Abschließend wurden die Schnitte mit Gelatine eingedeckt.

Folgende Neoglykoproteine kamen zum Einsatz (Tabelle 1)

<u>Abkürzung</u>	<u>Neoglykoprotein</u>	<u>Bindungsspezifität</u>
Glc	N-Acetylglucosamin-BSA	N-acetylierte Zucker
$\alpha$ -gal	$\alpha$ -N-Acetylgalaktosamin-BSA	N-acetylierte Zucker
$\beta$ -gal	$\beta$ -N-Acetylgalaktosamin-BSA	N-acetylierte Zucker
Fuc	Fucose-BSA	$\alpha$ -Fukosid
Mal	Maltose-BSA	A-Glykosid
Man	Mannose-BSA	A-Mannosid
Lac	Laktose-BSA	Galaktosid

Tab. 1: Neoglykoproteine und deren Karbohydratbindungsspezifität. Die biotinylierten Neoglykoproteine wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. H.J. Gabius, München zur Verfügung gestellt.

Durch Verwendung von Vergleichsschnitten, die nur mit der Streptavidin-Biotin-Komplex-Lösung und dem Chromogen-Gemisch behandelt waren, sollte überprüft werden, ob unspezifische Bindungsstellen vorliegen.

Zur Lokalisation der endogenen zuckerbindenden Proteine mit Hilfe der Neoglykoproteine (synthetische Zucker-BSA-Verbindungen) wurde die Avidin-Biotin-Enzymkomplex Methode (ABC) ausgewählt (Abb.2). Diese Technik beruht auf der starken Affinität von Avidin/Streptavidin für Biotin. Die vier Bindungsstellen des Avidins für Biotin werden aufgrund der molekularen Konfiguration meist nicht voll besetzt.

Die Neoglykoproteine wurden biotinyliert, so dass sich der Avidin-Biotin-Komplex spezifisch an den Neoglykoproteinen binden konnte.

Die Biotinaffinität des Avidins und der chemisch milde Biotinylierungsprozeß verschaffen der Methode eine sehr hohe Sensitivität im Vergleich zu anderen histochemischen Techniken (Bardosi et al. 1988; Boenisch 1989 b; Bourne 1989; Kayser et al. 1991 a).

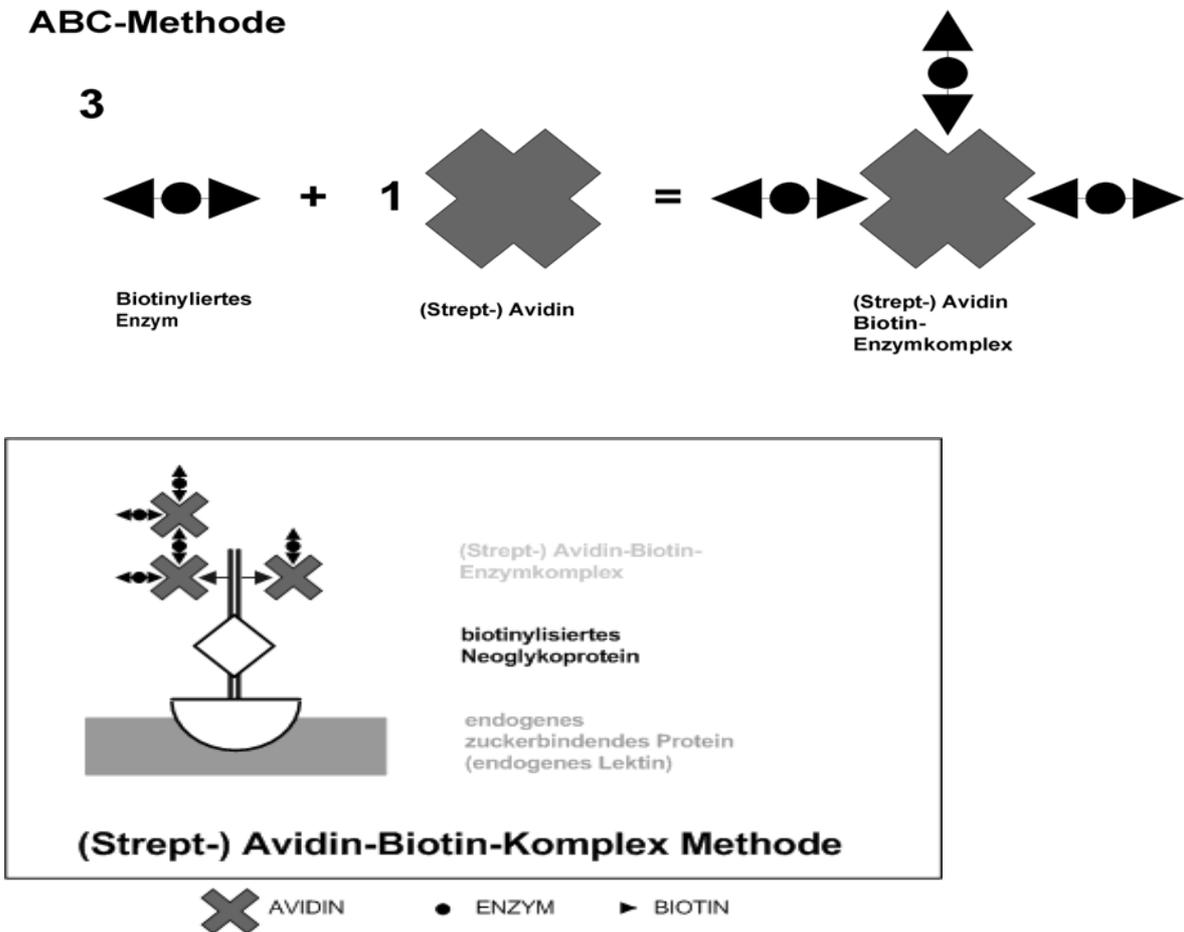


Abb.2: ABC-Komplex und (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex

Die Auswertung des Bindungsmusters der Neoglykoproteine erfolgte anhand der Intensität der Farbreaktion an Epithel und Stroma nach folgenden Kriterien:

- (-) negativ
- (+) schwache Bindung
- (++) mittelstarke Bindung
- (+++) starke Bindung

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Die normale Dickdarmschleimhaut**

Zur Auswertung kamen die Bereiche normaler Dickdarmschleimhaut aller ausgewerteter Präparate. Das Bild war geprägt von hochprismatischem Epithel mit basalen Zellkernen und klarem Zytoplasma. Becherzellen waren reichlich zu finden.

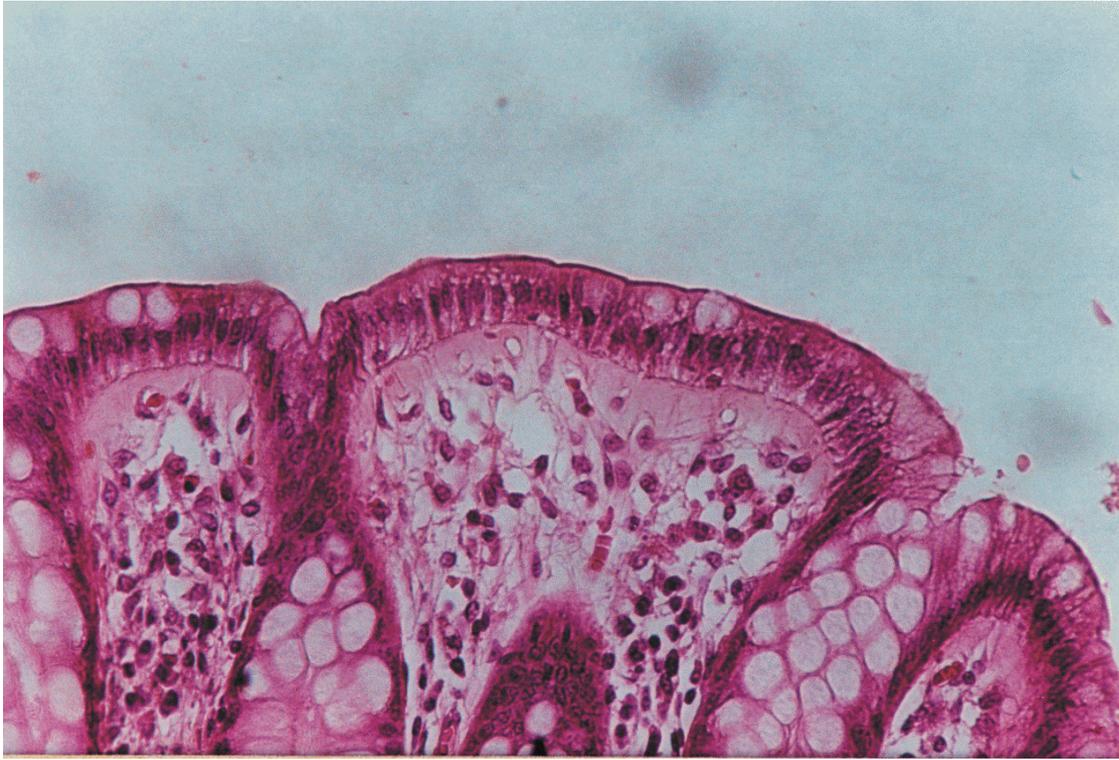
Die Neoglykoproteine zeigten ein heterogenes Expressionsmuster mit diffuser, zytoplasmatischer Färbung. Die oft nur schwache bis mäßige Positivität und die basal liegenden Zellkerne erweckten dann den Eindruck einer vorwiegend luminalen Anfärbung und imponierte als ein stärker positiver, apikaler Saum. Zellkerne und Schleim waren in jedem Falle negativ für Bindung der Glykokonjugate. Gelegentlich fand sich eine mäßige Bindung an der epithelialen Basalmembran (Abb. 4). Man zeigte hierbei in mehr als 2/3 der Fälle schwache und mäßige Bindung,  $\alpha$ -gal und fuc waren ebenfalls selten negativ und zeigten im Vergleich zu  $\beta$ -gal, lac und mal häufiger positive und auch stärker positive Bindung. Im Vergleich der darüber abgebildete HE-Schnitt (Abb.3).

### **5.2 Der hyperplastische Polyp**

Die ausgewerteten hyperplastischen Polypen zeigten die Merkmale wie verlängerte und verbreiterte Drüsenschläuche bei sonst erhaltenem Kolonschleimhautmuster mit typischer sägeblattartigem Drüsenaufbau.

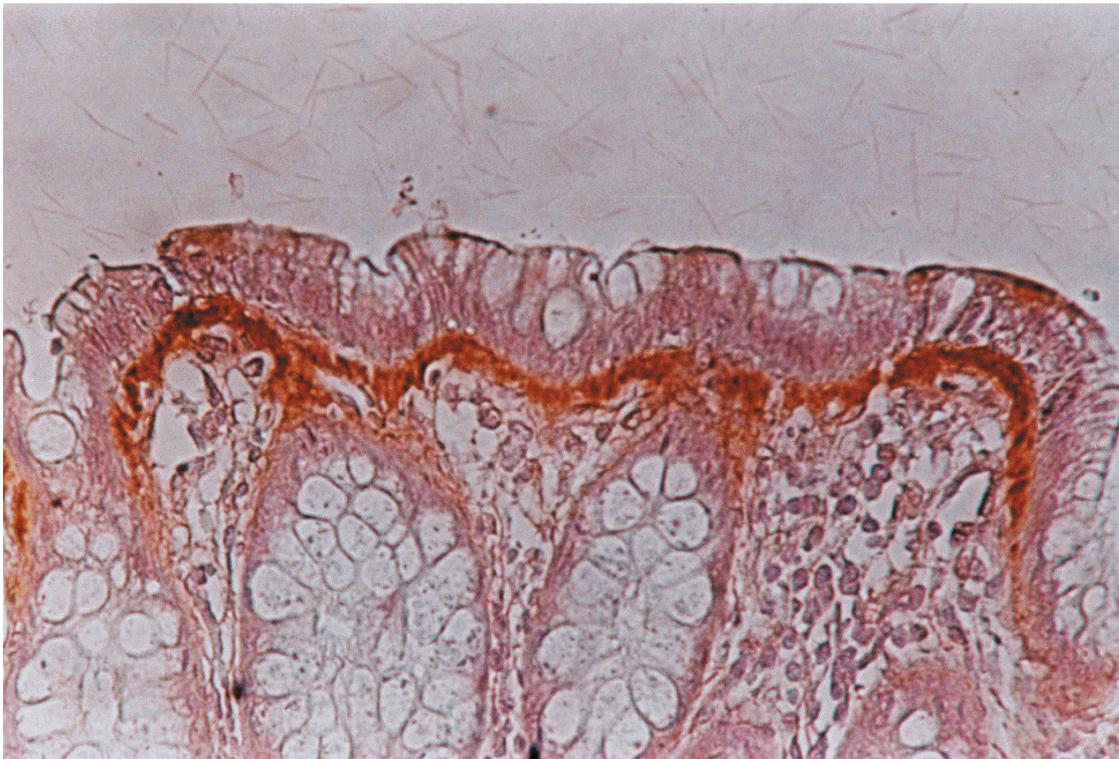
Die Bindungsfähigkeit für die zur Anwendung gebrachten Glykokonjugate war sehr häufig mäßig und gelegentlich stark positiv ausgeprägt darstellbar. Die Färbung stellte sich diffus zytoplasmatisch dar, doch kamen auch hier saumartig luminale Bindungen der verwendeten Zucker vor (Abb. 6,8). Zum Teil waren keine Markierung oder nur eine sehr schwache Anfärbung (z.B.: lac,  $\alpha$ -gal, mal) zu sehen. Eine Bindungspräferenz für ein spezifisches Neoglykoprotein ließ sich nicht feststellen. Glc, man und fuc waren in jedem Falle positiv, Schleim und Zellkerne immer negativ. Im HE-Schnitt erkennt man die Drüsenschläuche mit proliferiertem Epithel (Abb. 5,7)

## Normale Dickdarmschleimhaut



*Abb. 3: Normale Kolonmukosa*

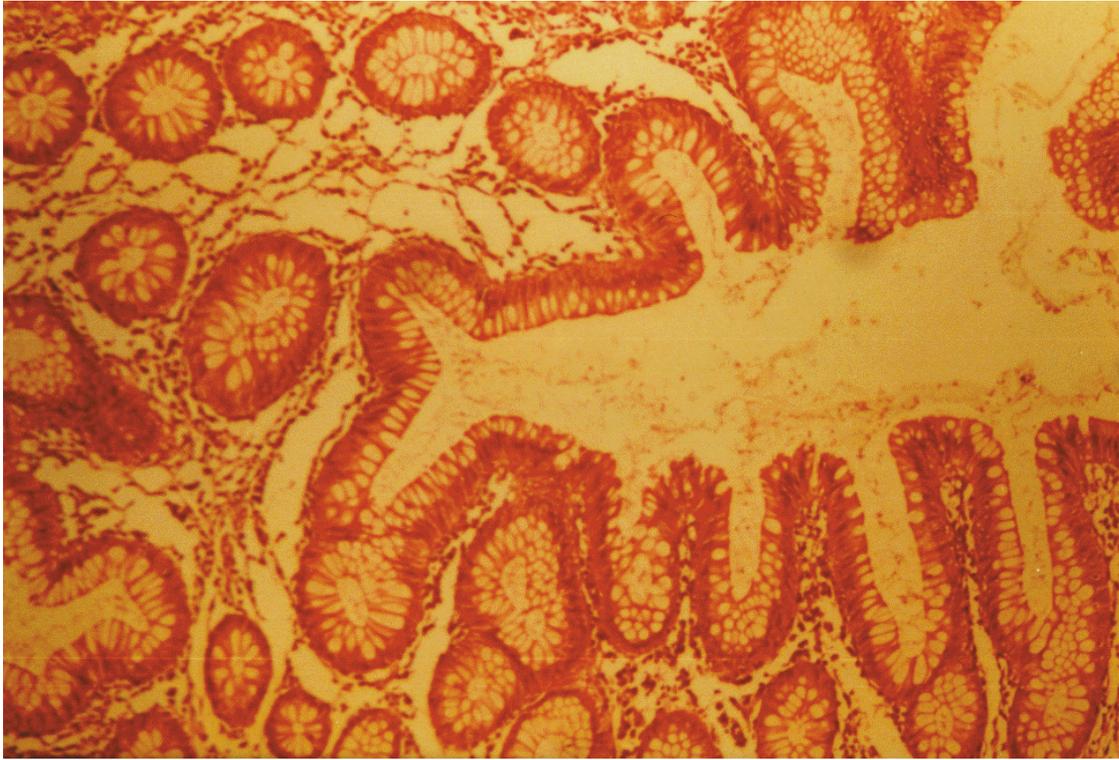
*Färbung: HE, Vergrößerung 400x, E.-Nr.: 8/96 lj*



*Abb. 4: Normale Kolonmukosa*

*Färbung: man, Vergrößerung 400x, E.-Nr.:8/96 lj  
mäßige bis starke Bindung an der epithelialen Basalmembran*

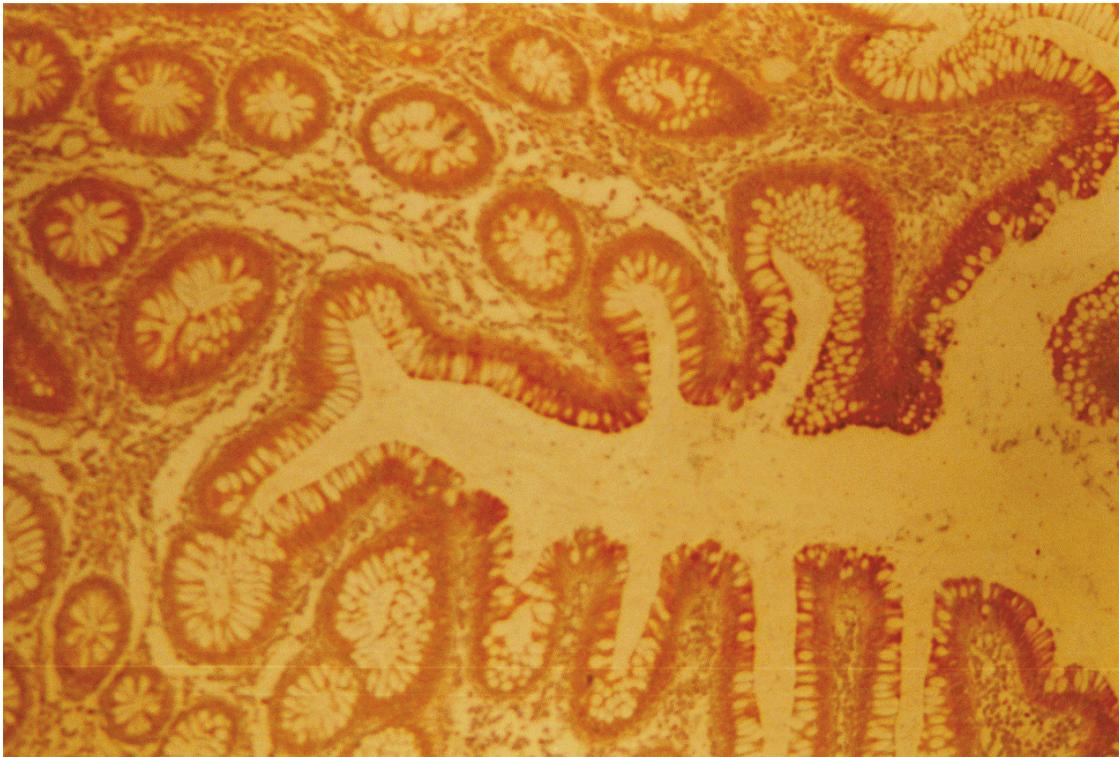
## Hyperplastischer Polyp



*Abb.5: Hyperplastischer Polyp*

*Färbung: HE, Vergrößerung: 125x, E.-Nr.: 14544/95 VII*

*Sägezahnartige Düsenkonfiguration*

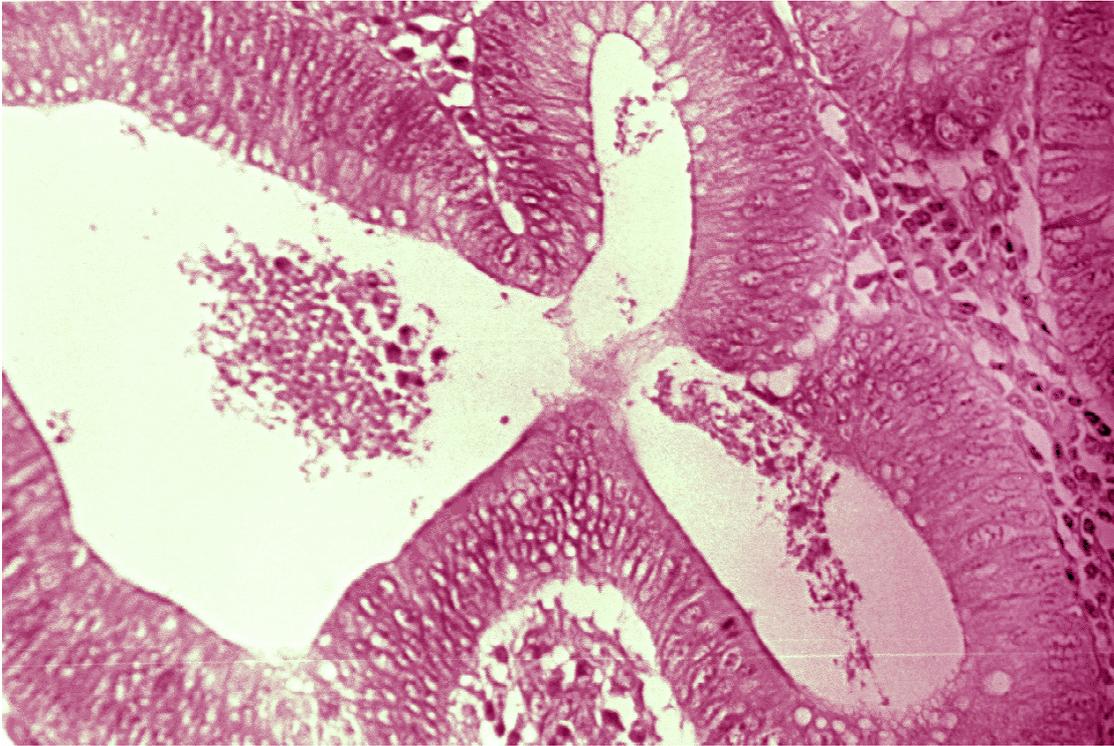


*Abb. 6: Hyperplastischer Polyp*

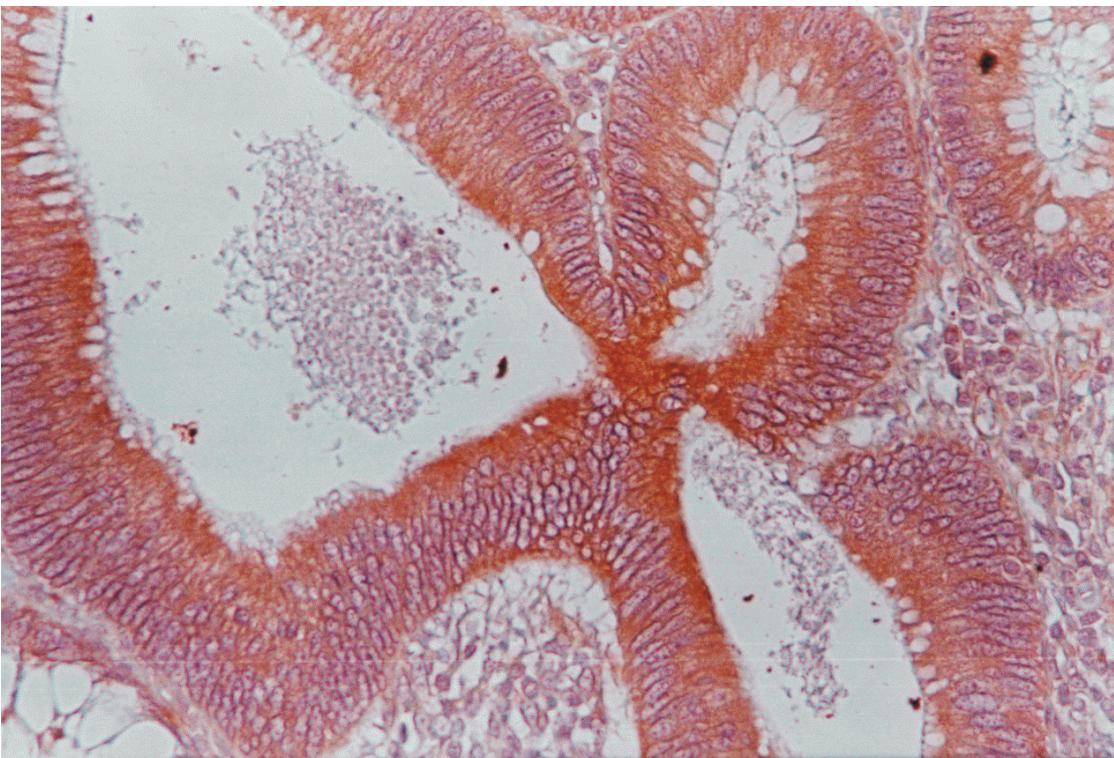
*Färbung: lac, Vergrößerung: 125x, E.-Nr.: 14544/95 VII*

*Sägezahnartige Düsenkonfiguration*

*Mäßig starke, diffus zytoplasmatische Markierung, Schleim der Becherzellen ausgespart*



*Abb.7: Hyperplastischer Polyp  
Färbung: HE, Vergrößerung: 400x, E.-Nr.: 14544/95 VII  
Verzweigte Drüsenschläuche mit proliferiertem Epithel*



*Abb. 8: Hyperplastischer Polyp  
Färbung: lac, Vergrößerung: 400x, E.-Nr.: 14544/95 VII  
Verzweigte Drüsenschläuche mit proliferiertem Epithel*

### 5.3 Das Adenom

Das neoplastische Epithel der untersuchten Adenome zeigte unterschiedliche Differenzierungsgrade. Je nach Dysplasiegrad (Dysplasie I-III) zeigten sich unterschiedliche zelluläre Atypien, Schichtungsstörungen und Verminderung bis Verlust der Schleimbildung. Es kommt zu gewundenen, gedrängten und verzweigten Drüsenschläuchen. Die untersuchten Präparate wiesen schwach bis mäßige, aber auch hochgradige Dysplasie auf.

Bei der schwachen Dysplasie imponierten die Zellkerne dunkler und größer als in der normalen Kolonschleimhaut, es kam vermehrt zu Mitosen (Abb. 9). Betrachtete man die mittelgradige Dysplasie, so erkannte man die gedrängten und verzweigten Drüsenschläuche und Schichtungsstörungen im Aufbau der Mukosa (Abb. 11).

Die hochgradige Dysplasie trat durch ein pleomorphes Erscheinungsbild der Zellkerne und verschobene Kern/Plasma Relation in Erscheinung. Es fanden sich vermehrt atypische Mitosen, prominente Nucleoli sowie ein gestörtes Schleimhautrelief (Abb. 15)

Bei der schwach bis mäßigen Dysplasie variierten die Ergebnisse in der Ausprägung der Färbeintensität von negativ bis stellenweise stark positiv. lac, man, fuc sowie glc zeigten die hierbei häufigsten und stärksten Markierungen. Das Färbemuster hierbei war diffus (Abb. 10,12).

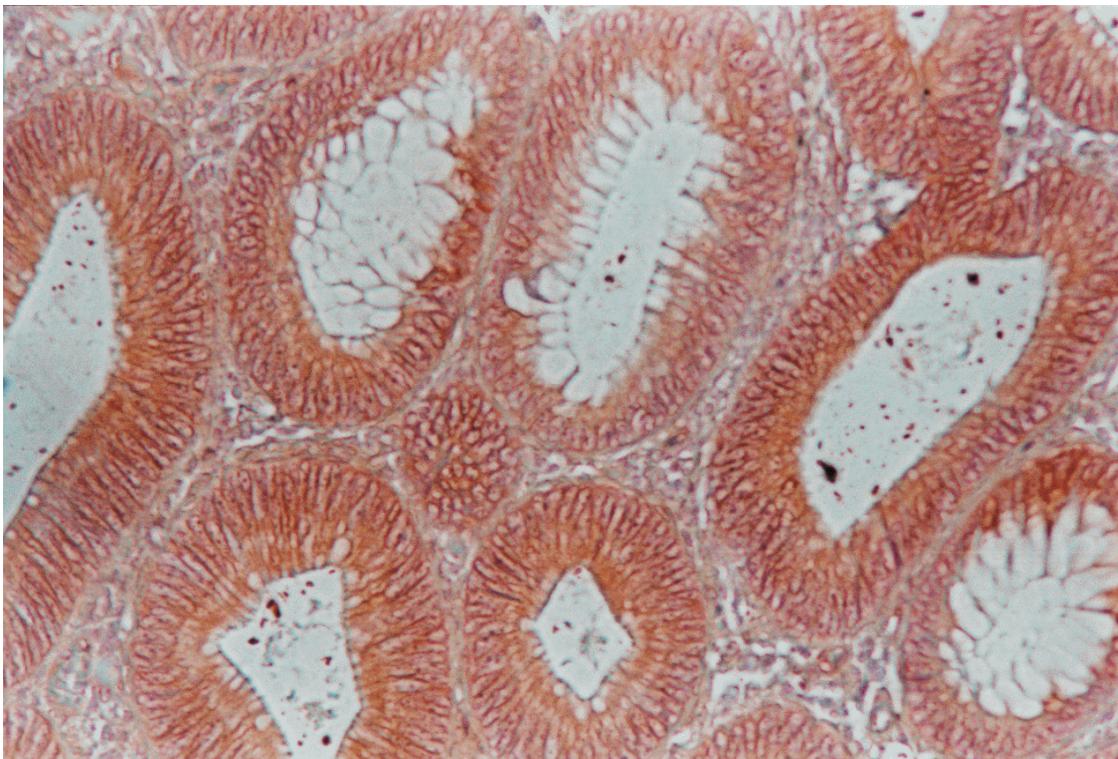
Die hochgradige Dysplasie wies auch ein schwankendes Muster in der Ausprägung der Markierung mit den verwendeten Neoglykoproteinen, das von negativ bis mäßig positiv reichte. Am stärksten positiv banden hierbei lac,  $\alpha$ -gal und man. Durch die immer schlechtere Kern/Plasma Relation zeigte sich eine diffuse, häufig verstärkt luminale Markierung der neoplastischen Zellen (Abb. 16).

Bei Drüsenschläuchen unterhalb der Lamina Muscularis Mucosa (Abb. 13) im Rahmen der Untersuchung Invasion/Pseudoinvasion fand sich ein wechselndes Bild der Neoglykoproteinbindung, in Abbildung 14 fehlt die Bindung für man bei den Drüsenschläuchen unterhalb der Lamina Muscularis Mucosa, wohingegen sie oberhalb der Lamina Muscularis Mucosa mäßig bis stark positiv ist.

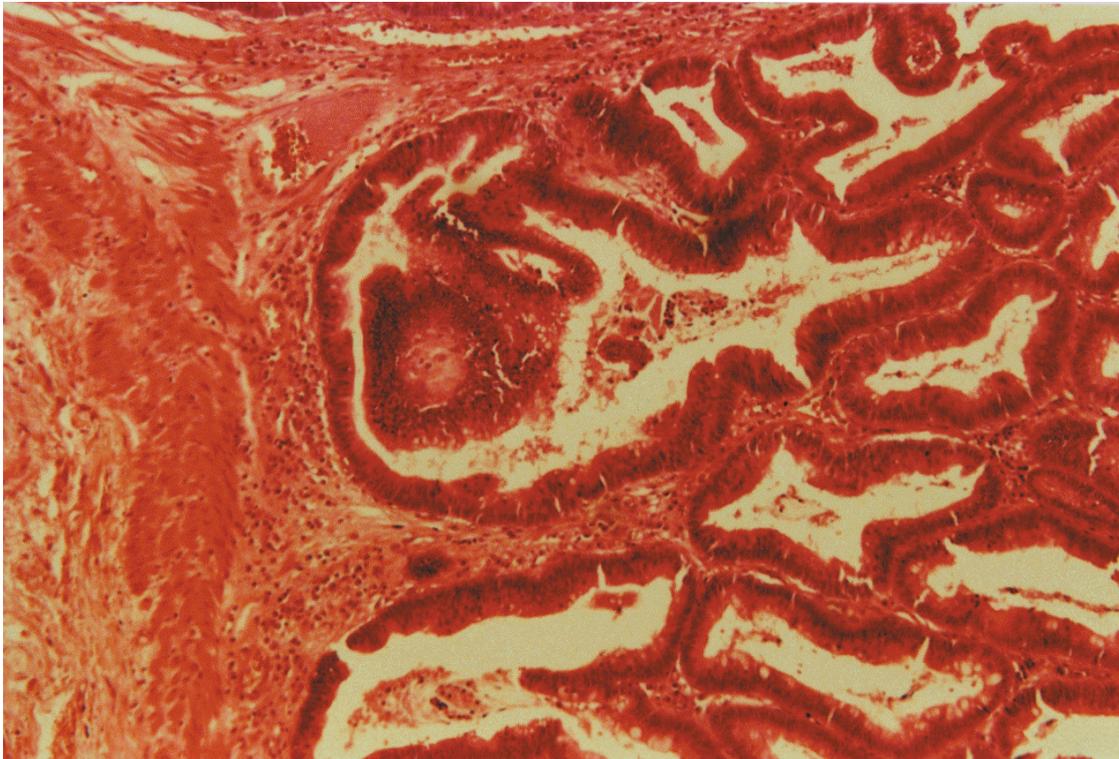
## Adenome



*Abb. 9: Adenom mit geringer Dysplasie  
Färbung: HE, Vergrößerung: 400x, E.-Nr.: 325/96  
Kern-Plasmaverhältnis gering gestört, Zellkerne gedrängt*



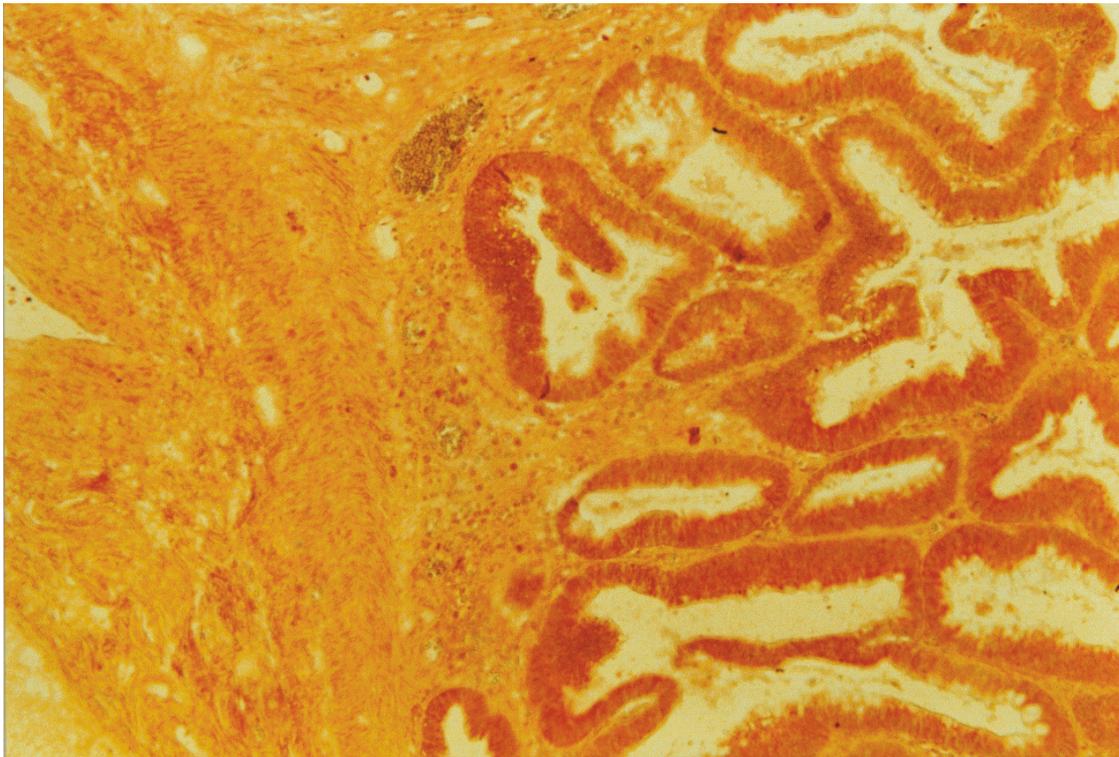
*Abb. 10: Adenom mit geringer Dysplasie  
Färbung:  $\alpha$ -gal, Vergrößerung: 400x, E.-Nr.: 325/96  
Kern-Plasmaverhältnis gering gestört, Zellkerne gedrängt*



*Abb. 11: Adenom mit mäßiggradiger Dysplasie*

*Färbung: HE, Vergrößerung: 100x, E.-Nr.: 8/96 Ib*

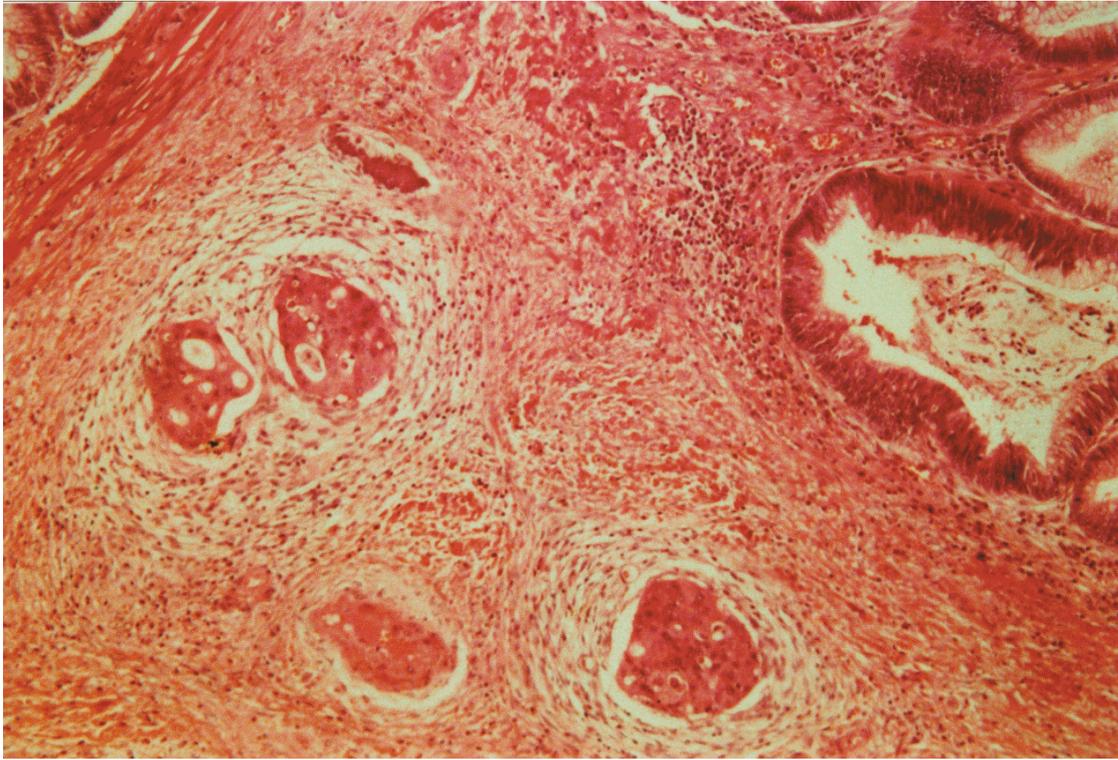
*Gewundene und verzweigte Drüsenschläuche mit deutlicher Schichtungsstörung*



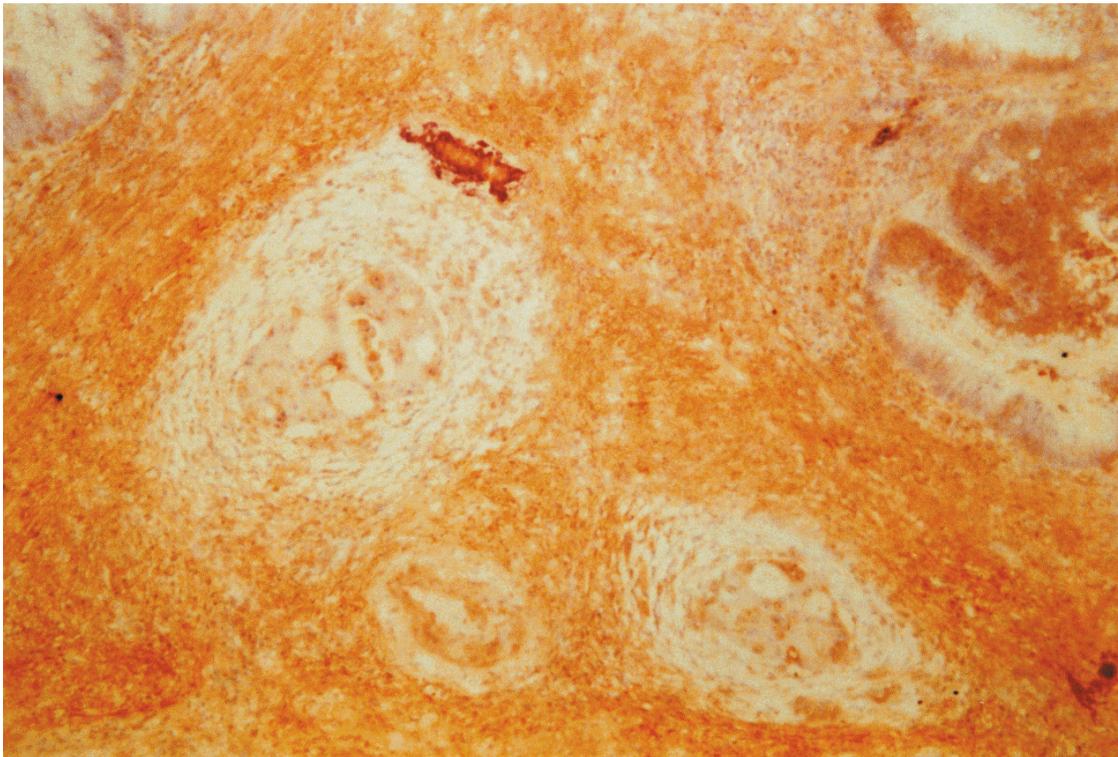
*Abb. 12: Adenom mit mäßiggradiger Dysplasie*

*Färbung: man, Vergrößerung: 100x, E.-Nr.: 8/96 Ib*

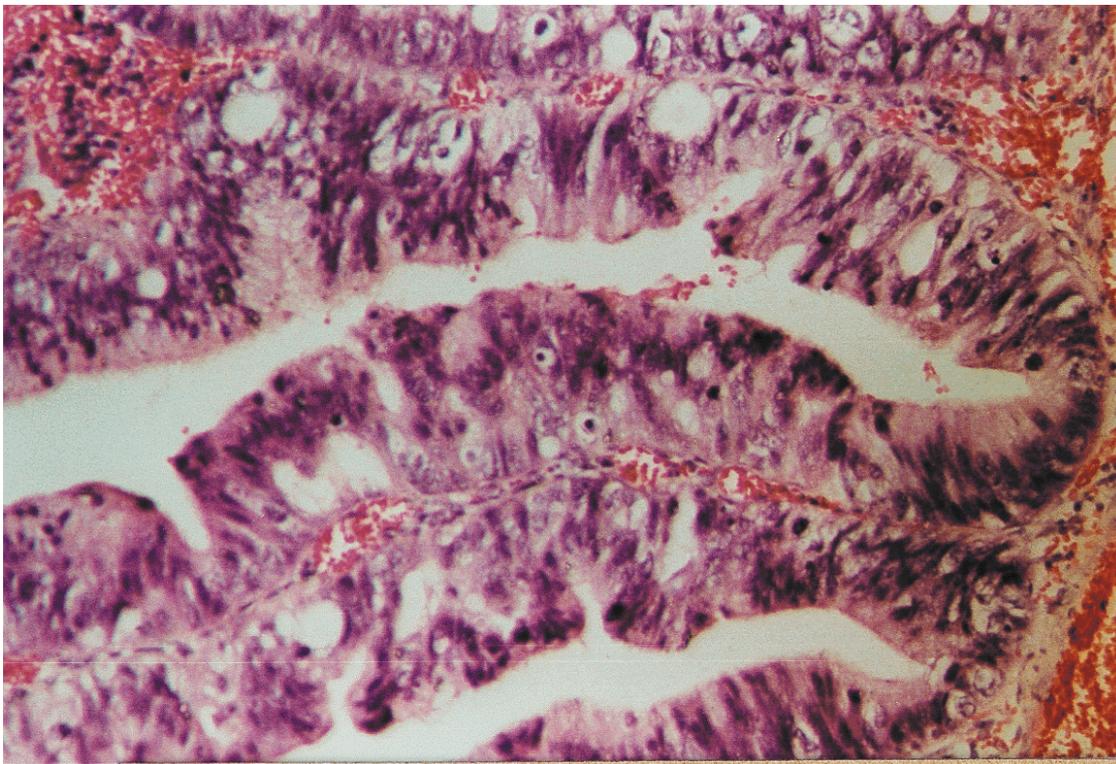
*Gewundene und verzweigte Drüsenschläuche, diffuse, mäßig bis stark positive Markierung*



*Abb. 13: Drüsen­schläuche unterhalb der Lamina Muscularis Mucosa  
Färbung: HE, Vergrößerung 100x, E.-Nr.: 8/96 Ib*



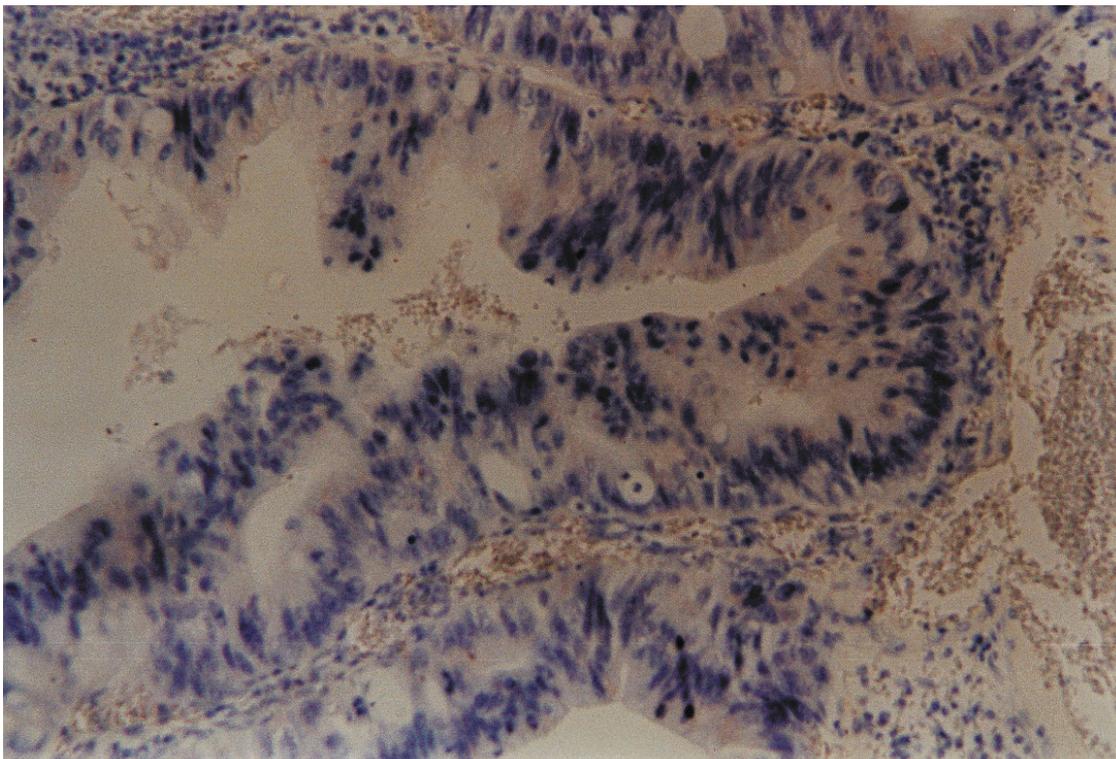
*Abb. 14: Drüsen­schläuche unterhalb der Lamina Muscularis Mucosa  
Färbung: man, Vergrößerung 100x, E.-Nr.: 8/96 Ib  
keine Markierung der submukosal gelegen Drüsen bei sonst mäßig bis starker Färbung*



*Abb. 15: Adenom mit hochgradiger Dysplasie*

*Färbung: HE, Vergrößerung: 250x, E.-Nr.: 17503/91*

*Kernpleomorphie, atypischen Mitosen und Störung des regulären Schleimhautreliefs*



*Abb. 16: Adenom mit hochgradiger Dysplasie*

*Färbung: man, Vergrößerung: 250x, E.-Nr.: 17503/91*

*Kernpleomorphie, atypischen Mitosen und Störung des regulären Schleimhautreliefs,  
nur sehr wenige schwache Bindungsstellen (man). Starke Kern(gegen)färbung*

## 5.4 Das Karzinom

Die Kolonkarzinome dieser Arbeit reichten von hoch differenziert bis niedrig differenziert. Meistens waren sie vom tubulären oder tubulo-villösen Typ mit mäßig bis hochgradiger Atypie, verringerter Kern/Plasma Relation, atypischen Mitosen und prominenten Nucleoli. Doch kamen auch ein verschleimendes sowie ein anaplastisches Karzinom zur Auswertung, welches anaplastisch mittelgroßzellige Formationen mit bizarren Tumorroriesenzellen aufwies.

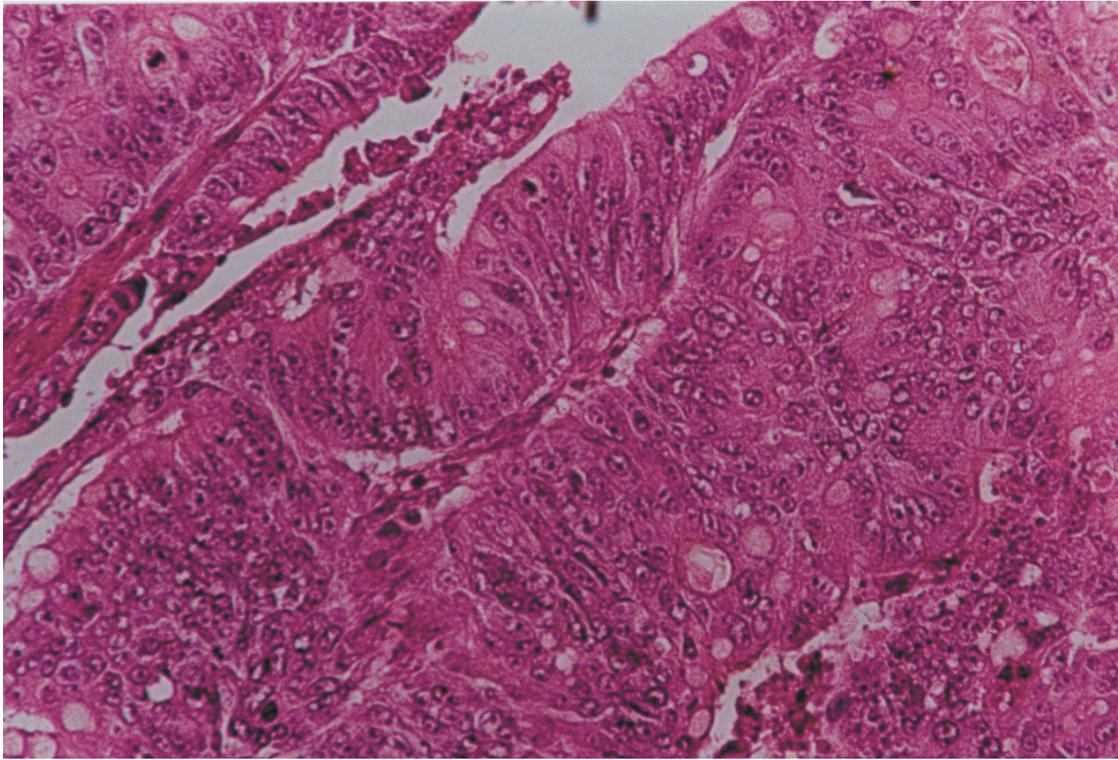
Auf Abbildung 17 erkennt man ein hoch differenziertes Adenokarzinom vom tubulo-villösen Typ. Gut zu erkennen die eng an eng stehenden polymorphen Zellkerne mit nur wenig Stromaanteil.

In den meisten Fällen ließ sich keine oder nur eine schwach bis mäßig positive Bindungsfähigkeit feststellen. Zu einer stark positiven Anfärbung kam es nur in einem Fall bei dem Neoglykoprotein  $\alpha$ -gal. Mäßig positiv waren bei der Auswertung glc, man und fuc. Das Muster der Neoglykoproteinbindung zeigte eine diffus zytoplasmatische Ausprägung. Zellkerne und Schleim waren negativ für die Bindung der Glykokonjugate.

Abbildung 18 zeigt eine mäßig starke Markierung mit  $\alpha$ -gal. Das Bindungsmuster ist diffus zytoplasmatisch, die Zellkerne, Schleim und Stroma tragen keine Markierung des Neoglykoproteins.

Bei der Auswertung des Stromas zeigte sich ebenfalls ein heterogenes Bild der Bindungen der NGP, das geprägt war von einer hohen Zahl negativer Fälle und einer fast gleich verteilten Häufigkeit an schwach positiven Fällen bei lac,  $\alpha$ -gal, man und mal. Etwas weniger häufig waren Bindungen bei  $\beta$ -gal, glc sowie fuc zu beobachten. Mäßig positiv imponierten lac,  $\alpha$ -gal und man. Stark positive Fälle kamen nicht vor.

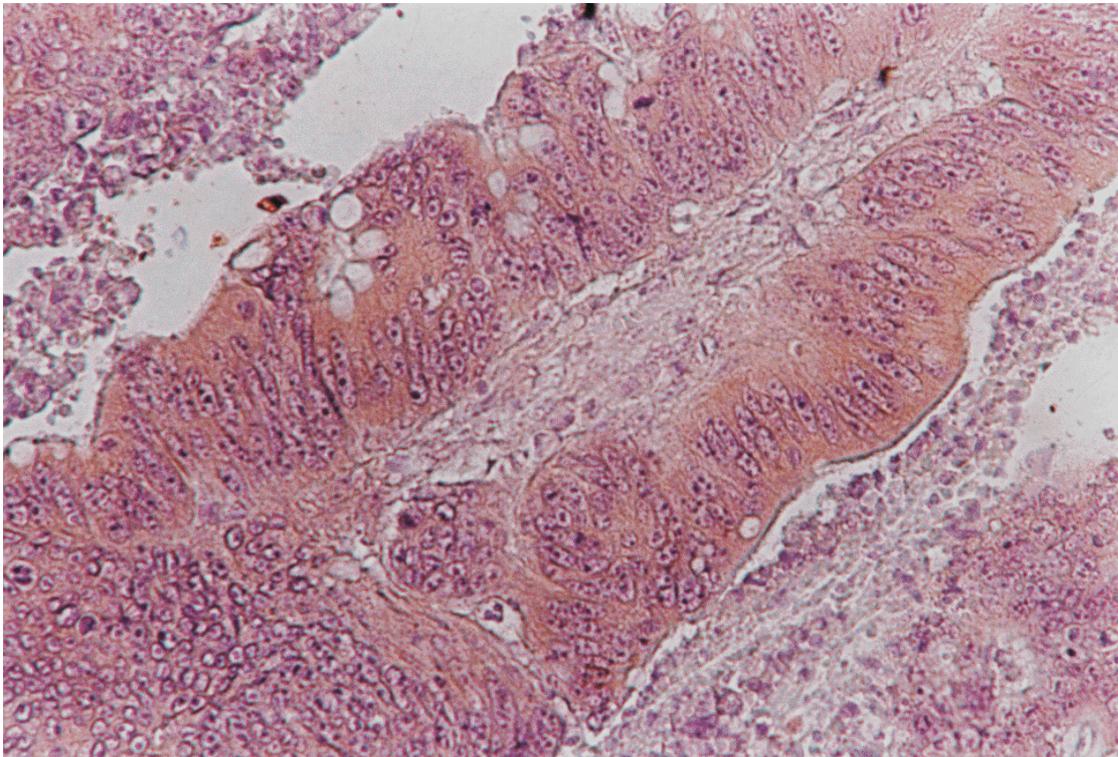
## Karzinome



*Abb. 17: Adenokarzinom*

*Färbung: HE, Vergrößerung: 400x, E.-Nr.: 167/96 I a*

*Atypische Mitosen, prominente Nucleoli*



*Abb. 18: Adenokarzinom*

*Färbung:  $\alpha$ -gal, Vergrößerung: 400x, E.-Nr.: 167/96 I a*

*Atypische Mitosen, prominente Nucleoli, mäßiggradige, diffuse Bindung*

## 5.5 Metastasen

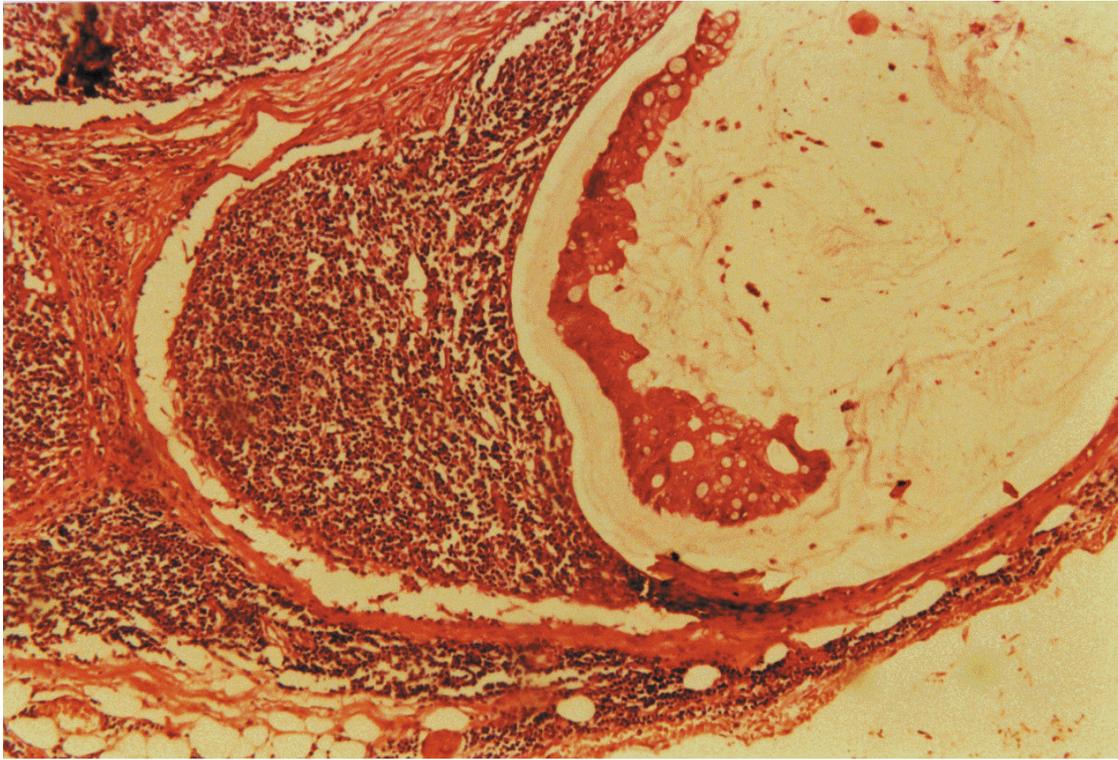
Bei den Metastasen handelte es sich sowohl um lymphogene als auch um hämatogene in Leber und Mamma. Der Grad der Infiltration dieser Metastasen reichte von einigen Zellenestern in Lymphknoten bis zur fast völligen Destruktion der typischen Lymphknotenstruktur (Abb.19). Die Differenzierung war verschieden ausgeprägt, es kam zu Bildung von Drüsenschläuchen aber auch schlechter differenzierten Formationen mit strangartigen oder soliden Arealen (Abb. 21,23).

Auffallend war, dass das Bindungsmuster der hämatogenen Metastasen im Gegensatz zu den häufig negativen Lymphknotenmetastasen eine durchweg schwach bis mäßige positive Färbung mit den Neoglykoproteinen aufwies. Hierbei waren in den beiden untersuchten Fällen lac,  $\alpha$ -gal und man mäßig und in einem Fall bei  $\alpha$ -gal sogar stark positiv (Abb. 22, 24).

Die lymphogenen Metastasen zeigten ein negatives bis schwach positives Bild der Anfärbung.  $\alpha$ -gal und man imponierten auch hierbei als stärkste Liganden (Abb. 20).

Das Stroma erwies sich als meist negativ und zeigte allenfalls schwach positive Markierungen. Nur bei einer hämatogenen Metastasen zeigten  $\alpha$ -gal und man eine schwache Bindung. Bei den Lymphknotenmetastasen zeigte sich ein ähnliches Bild mit häufig negativem Befund, gelegentlich zeigten sich Bindungsstellen für  $\alpha$ -gal,  $\beta$ -gal, glc und mal schwach positiv.

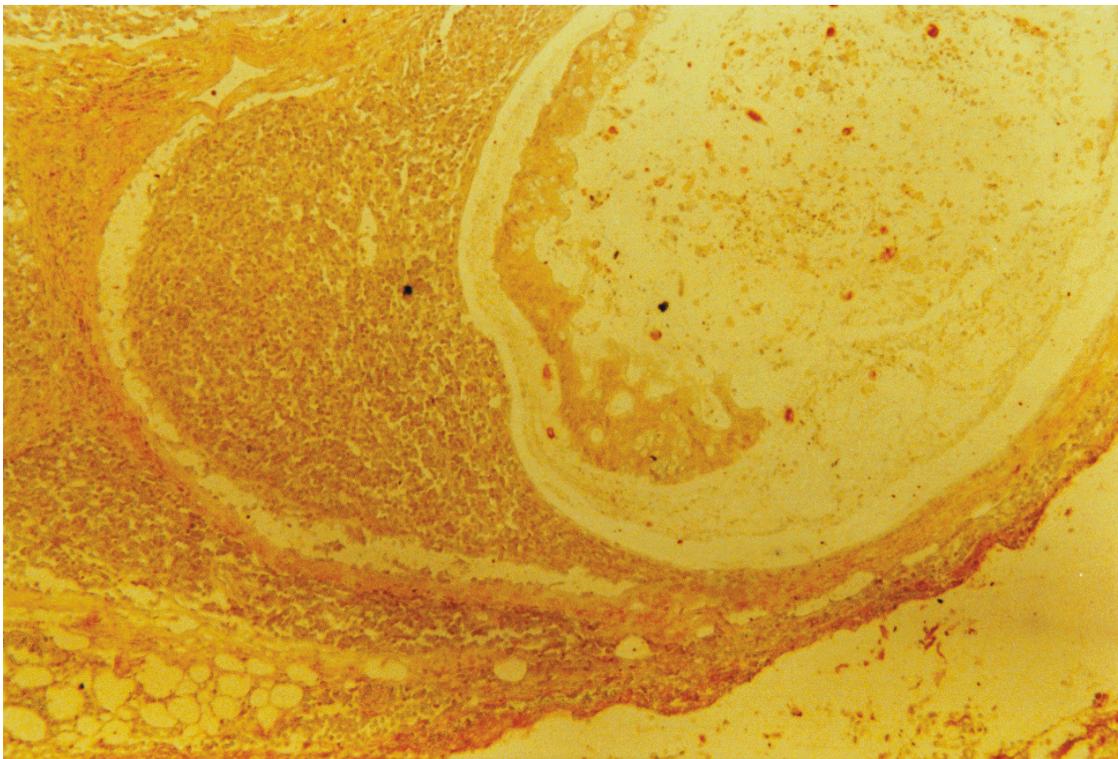
## Lymphogene Metastase



*Abb. 19: Lymphknotenmetastase*

*Färbung: HE, Vergrößerung 100x, E.-Nr.: 455/96 VI*

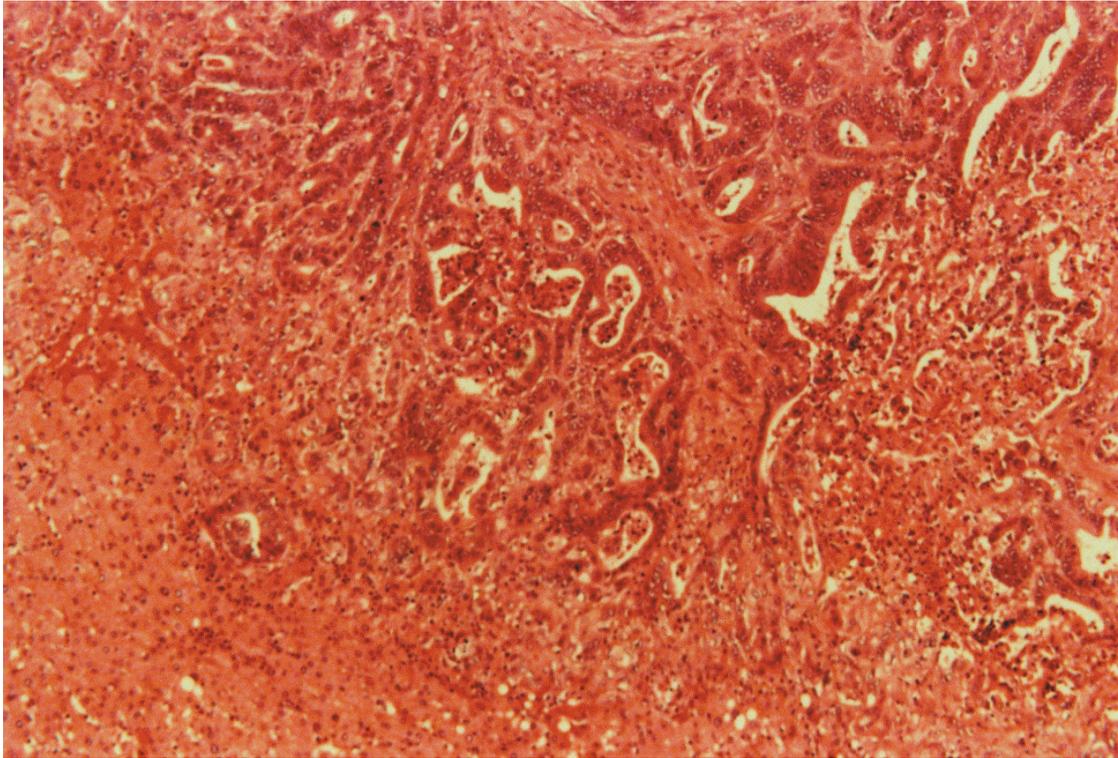
*Atypische Drüsenschläuche innerhalb des lymphatischen Gewebes*



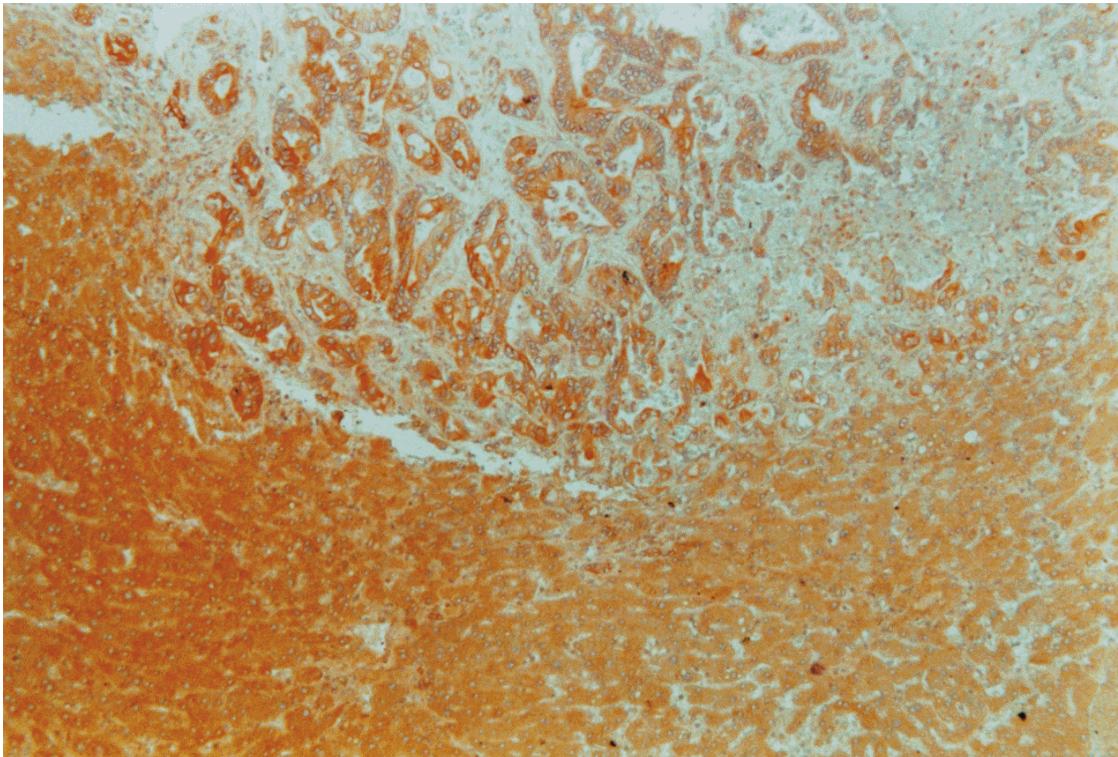
*Abb. 20: Lymphknotenmetastase*

*Färbung: man, Vergrößerung 100x, E.-Nr.: 455/96 VI*

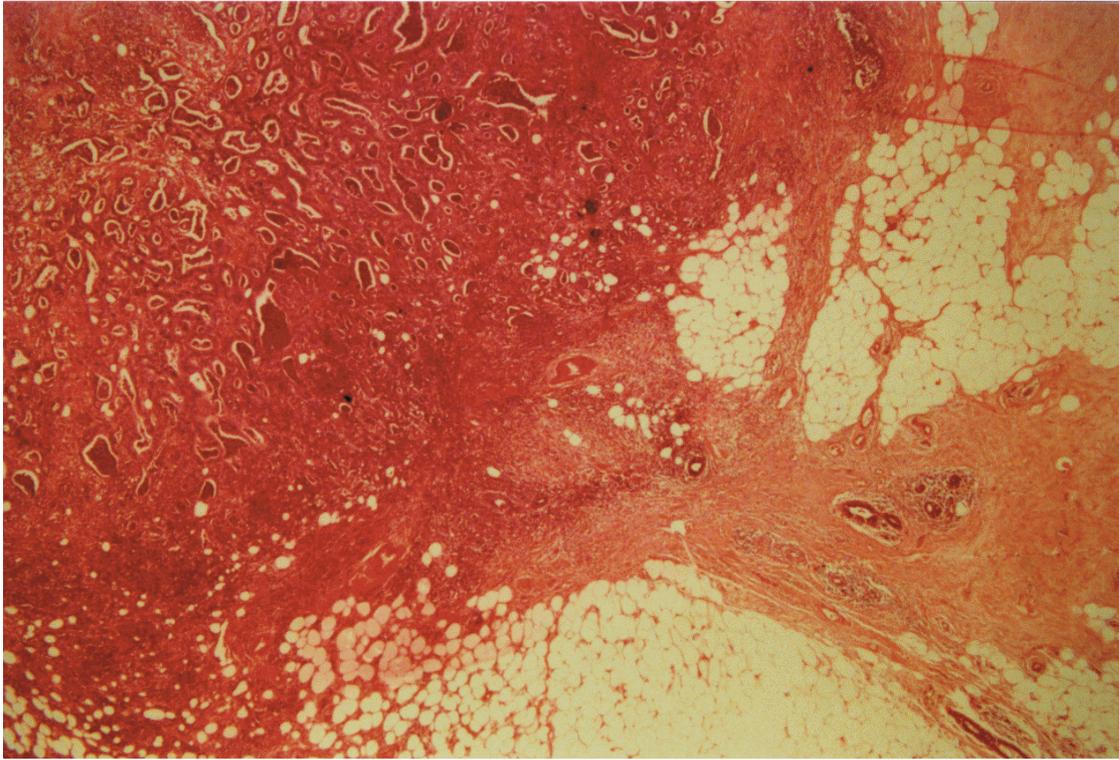
*keine Markierung der Drüsenschläuche innerhalb des lymphatischen Gewebes*



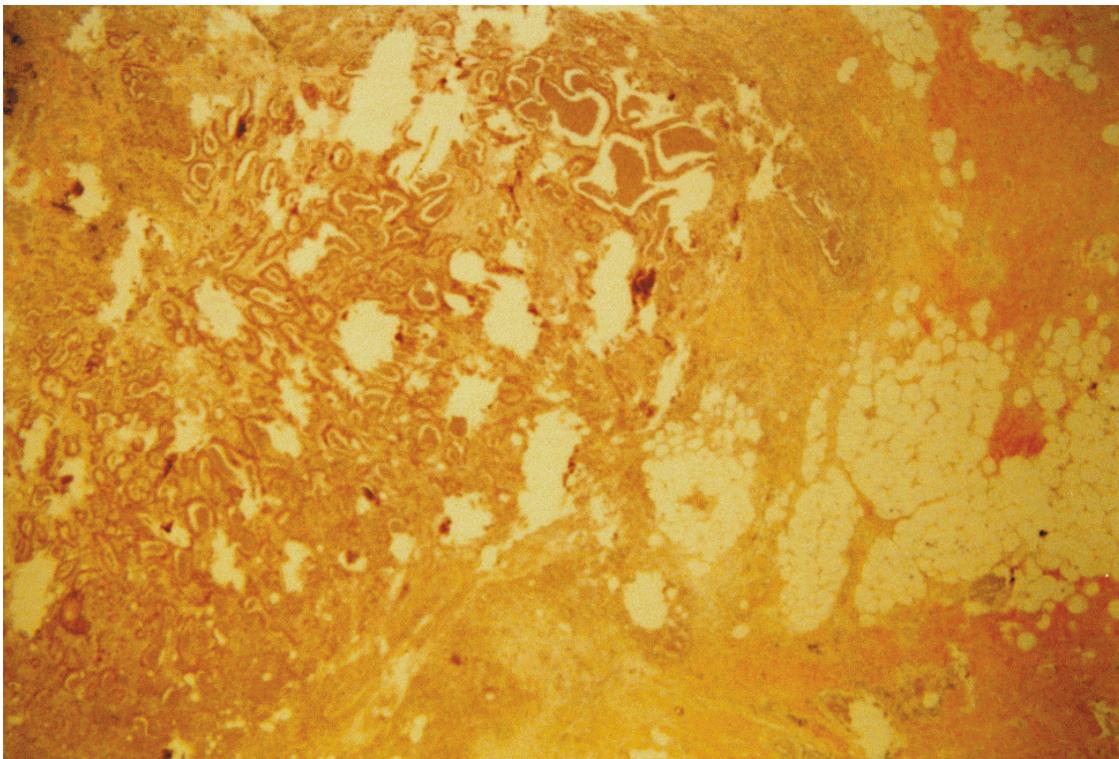
*Abb. 21: Lebermetastase  
Färbung HE, Vergrößerung 100x, E.-Nr.: 4030/96  
Drüsenschläuche innerhalb des Lebergewebes*



*Abb. 22: Lebermetastase  
Färbung man, Vergrößerung 100x, E.-Nr.: 4030/96  
Atypische Drüsenschläuche innerhalb des Lebergewebes mit mäßig ausgeprägter Bindung*



*Abb. 23: Metastase in der weiblichen Brustdrüse  
Färbung HE, Vergrößerung 25x, E.-Nr.: 901/96  
Formationen des Adenokarzinomes innerhalb des Mammagewebes*



*Abb. 24: Mammametastase  
Färbung lac, Vergrößerung 25x, E.-Nr.: 901/96  
Mäßig starke Rezeptorexpression in der Adenokarzinommetastase der Mamma*

## 5.6 Zusammenfassung der Befunde

In der normalen Dickdarmschleimhaut ergab sich bei starker Variabilität der ausgewerteten Präparate die stärkste Expression für Bindungsstellen von  $\alpha$ -gal (-/+++). Lac,  $\beta$ -gal, glc, fuc und mal, zeigten eine mäßige Bindungsaffinität (-/++). Nur man zeigte lediglich eine geringe Bindungshäufigkeit an normale Mukosa.

Bei hyperplastischen Polypen war die Bindungsfähigkeit für glc und man im Vergleich zur normalen Schleimhaut verstärkt (+/+++). Die Expression der Bindungspartner für lac, mal, fuc war ähnlich (mäßig stark) wohingegen sich  $\beta$ -gal leicht verstärkt an hyperplastische Schleimhaut band (-/+++). Bei den in dieser Arbeit ausgewerteten histologischen Schnitten stellte sich der Schleim in den Becherzellen immer negativ für die verwendeten Neoglykoproteinen dar.

Anhand dieser Ergebnisse scheint tendenziell eine Bindungszunahme für glc und man im ersten Schritt der Adenom-Karzinom-Sequenz vorzuliegen bei gleichzeitiger leicht stärkerer Bindung von  $\beta$ -gal (s. Tab.2).

Betrachtet man nun das Kolonkarzinom und dessen Metastasen, so zeigt sich bei beschriebener Bindungsvariabilität einzig bei  $\alpha$ -gal eine bis stark positive Markierung, die übrigen Zuckerkonjugate binden nur schwach bis mäßig stark.

Es fand sich oft große Bindungsunterschiede schon in einem histologischen Schnitt.

Im Vergleich zu den lymphogenen Metastasen, die sich häufig negativ in der Färbung darstellten, war die Bindungsintensität bei den hämatogenen Metastasen stärker positiv.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab.2) sind die Ergebnisse noch einmal in einer Übersicht zusammengefasst.

Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse:

	lac	$\alpha$ -gal	$\beta$ -gal	glc	man	fuc	mal
Normale DS	-/++	-/+++	-/++	-/++	-/+	-/++	-/++
Hyperpl. Polyp	-/++	-/++	-/+++	+/>+++	+/>+++	+/>++	-/++
Adenom Dysplasie geringe/mäßig - gradige	-/++	-/++	-/+	-/+++	-/+++	-/++	-/++
hochgradige	-/+	-/++	-/+	-/+	-/++	-/+	-/+
Adenokarzinom	-/+	-/+++	-/+	-/++	-/++	-/++	-/+
Stroma	-/++	-/++	-/+	-/+	-/++	-/+	-/+
Metastasen gesamt	-/++	-/+++	-/+	-/++	-/++	-/++	-/++
Lymphogen	-/+	-/+++	-/+	-/++	-/++	-/+	-/++
Stroma	-	-/+	-/+	-/+	-	-	-/+
Hämatogen	+/++	+/+++	+/+	+/++	+/+++	+/+++	+/+
Stroma	-	-/+	-	-	-/+	-	-

Tab.2: Darstellung der Neoglykoproteine nach Intensität ( Zusammenfassung)

Man erkennt in der Zusammenstellung die stark ausgeprägte Heterogenität bei der Bindung der verwendeten Neoglykoproteine.

## 6. Diskussion

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse nach Auswertung der Literatur zu zuckerbindenden Proteinen an verschiedenen menschlichen aber auch tierischen Organen sollten im Rahmen dieser Arbeit an histologischen, formalinfixierten, humanen Präparaten neue Erkenntnisse im Bereich der Kanzerogenese und der Metastasierung des Kolonkarzinoms gewonnen werden.

Durch die Anwendung von Neoglykoproteinen konnte bisher im Bereich der Lunge ein unterschiedliches Bindungsmuster zwischen groß- und kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden (Gabius 1990, Kayser et al. 1989 a). Feyler (1998) fand Bindungsunterschiede bei muzinösen Ovarialtumoren und konnte so tendenziell zur besseren Differenzierung verschiedener Entitäten beitragen. Die Untersuchung von Pankreaskarzinomen konnte solche Unterschiede jedoch nicht aufzeigen (Walper 1999).

Die konventionelle Lektindiagnostik, die in der Vergangenheit intensiv am Intestinum beschrieben wurde, hatte Zuckerstrukturen und deren Veränderung im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz im Dickdarm nachgewiesen (Boland 1988; Brinck et al. 1998; Fucci et al. 1993; Hsu und Raine 1982; Kellokumpu et al. 1986; Ohannesian et al. 1994, 1995; Rhodes et al. 1986; Ryder et al. 1994; Saitoh et al. 1992; Schoepfner et al. 1995; Yuan et al. 1986). Am Dickdarm war eine Untersuchung mit der in dieser Arbeit verwendeten Anzahl von Neoglykoproteinen bisher nicht erfolgt. Die Ergebnisse einer Veröffentlichung von Gabius et al. (1991) und Brinck et al. (1998) mit einem Teil der in dieser Arbeit verwendeten Neoglykoproteine waren vielversprechend. Aus diesem Grund war die Verwendung zusätzlicher Neoglykoproteine und ein erweitertes Entitätenspektrum am Kolon eine konsequente Fortführung bisheriger Untersuchungen.

Folgende Erwartungen stellten sich daher an die eigenen Untersuchungen:

- Nachweis spezifischer Bindungsstellen für Neoglykoproteine.
- Nachweis unterschiedlicher Bindungsmuster im Verlauf der Adenom-Karzinom- Sequenz.
- Nachweis einer spezifischen Markierung von Tumorzellen.
- Differenzierung zwischen hochgradiger Dysplasie und Karzinom

- Differenzierung zwischen Invasion und Pseudoinvasion.
- Unterscheidung von Primärtumor und Metastase.

Die Untersuchung dieser Aspekte sollten zumindest ansatzweise ein weiterer Mosaikstein zum besseren Verständnis der Adenom-Karzinom-Sequenz und vielleicht ein Hilfsmittel in der histopathologischen Routinediagnostik sein.

Nach Auswertung der angefertigten histologischen Schnittpräparate zeigte sich, dass sich die gestellten Erwartungen nicht erfüllten.

So konnte zwar die spezifische Bindung der verwendeten zuckerbindenden Proteine nachgewiesen werden, in den Präparaten fand sich jedoch ein zumeist heterogenes Bild der Färbungsintensität schon innerhalb eines Schnittes. Dies weist auf die unterschiedliche Zuckerexpression der Zelloberflächen und damit auf verschiedene Aktivitätszustände der Zellen hin.

Im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz traten Unterschiede in der Bindung der verschiedenen Neoglykoproteine auf. Es fand sich jedoch kein einheitliches Muster, z.B. in Form der exzessiven Bindung eines oder mehrerer Bindungspartner, für einen Schritt der Kanzerogenese. Die Expression der Zucker an den Zellen zeigte sich auch in den verschiedenen Stadien der Adenom-Dysplasie-Karzinom-Sequenz sehr heterogen, sodass nur tendenzielle Unterschiede erkennbar waren.

Der Nachweis einer spezifischen Markierung von Tumorzellen gelang nicht. Bei starker Bindungsheterogenität sowohl bei hochgradiger Dysplasie als auch bei Karzinomen ließ sich einzig aufgrund der Färbungsintensität respektive der Bindungsspezifität keine Aussage zur Differenzierung der beiden Phänotypen treffen. Eine sichere Unterscheidung von Invasion und Pseudoinvasion ließ sich somit nicht aufzeigen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei dem Vergleich von Primärtumor und Metastase, sodass sich auch hier kein einheitliches Bindungsmuster fand (Tab.2).

Diese Ergebnisse müssen jedoch auch unter dem möglichen Einfluss von Fehlerquellen gesehen werden, die im Verlauf noch näher dargelegt werden. Bis zur Durchführung dieser Arbeit waren nur wenige Untersuchungen mit ähnlichem Versuchsaufbau durchgeführt worden. Gabius et al. (1991) verwendeten ausgewählte Neoglykoproteine an Adenokarzinomen des

Dickdarmes und deren Metastasen. Brinck et al. (1998) verglichen normale, entzündliche und adenomatöse Dickdarmschleimhaut.

Andere Forschungsgruppen setzten Antikörper zum histologischen, flusszytometrischen oder elektrophoretischen Glykoproteinnachweis ein. Tiermodelle oder Verwendung von Lektinen waren andere Ansätze.

In diesem Zusammenhang müssen die gewonnenen Ergebnisse als originär diskutiert werden und können nur mit ähnlichen Untersuchungen und deren Ergebnissen verglichen werden. Hierbei können die gleiche Untersuchungsmethode (histologisch), der Nachweis des gleichen Bindungspartners (Glykoprotein) oder Tumoren aus der gleichen Gruppe (Adenokarzinom) zum Vergleich herangezogen werden, um wesentliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede herauszustellen.

Gabius et al. (1991) verglichen das Bindungsmuster von drei Neoglykoproteinen an kolorektalen Karzinomen und deren Metastasen. Hierbei wurden neben Zellkulturen auch histologische Schnitte von Sektionspräparaten verwendet. Folgende Ergebnisse wurden konstatiert:

- Es lagen spezifische Bindungsstellen an aus Zellkulturen gewonnenen Tumorzellen vor.
- Bei den verwendeten Neoglykoproteinen an Zellkulturen wurden nur geringe Unterschiede in der Bindungsintensität gesehen.
- Bei unterschiedlichen Tumoren ergab sich ein heterogenes Bindungsverhalten
- Es ergab sich ein ähnliches Bindungsmuster zwischen Primärtumor und Metastase.

In Übereinstimmung mit den genannten Ergebnissen kann auch in dieser Arbeit der Nachweis spezifischer Bindungspartner für die verwendeten Glykokonjugate sowie ein heterogenes Bindungsmuster hervorgehoben werden.

Für  $\alpha$ -gal ergab sich ebenfalls, bei großer Streubreite, in jeder untersuchten Gruppe der Adenom-Karzinom-Sequenz eine relativ stark positive Anfärbung (s. Tab.2).

Bei gleichzeitiger oft starker Anfärbung von normaler Dickdarmschleimhaut, Adenomen, Karzinomen und deren Metastasen in der eigenen Untersuchung muss von einem regelhaft häufig vorkommenden Bindungspartner für das verwendete Neoglykoprotein ausgegangen werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann deshalb im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Gabius die phänotypische Übereinstimmung zwischen Primärtumor und Metastase nicht ohne weiteres bestätigt werden (Gabius et al. 1991).

Brinck et al. (1998) beobachteten eine Bindungszunahme von  $\beta$ -N-Acetylgalaktosamin-BSA, Fucose-BSA and N-Acetylglucosamin-BSA im Schritt von normaler Dickdarmschleimhaut zum Adenom.

Diese Ergebnisse konnten im Rahmen der eigenen Untersuchung nicht in vollem Umfang bestätigt werden. Es zeigte sich ein tendenzieller Anstieg für glc, fuc war in der Intensität etwa gleich und gal zeigte die stärkste Färbungsintensität am hyperplastischen Polypen, um dann wieder schwächere Bindung am Adenom aufzuweisen (Tab. 2).

Für die Pseudoinvasion gelten als morphologische Kriterien Siderinablagerungen, frische Blutungen, Lückenbildung, Schleimzysten, ein lockeres Stroma sowie ein geringer Dysplasiegrad. Echte Invasion bei karzinomatöser Entartung ist charakterisiert durch einen hohen Atypiegrad, fibröses (desmoidales) Stroma, Gefäßinvasion sowie Unterminierung der normalen Mukosa (Borchard und Augthun 1983).

Fucci et al. (1993) versuchten an Kolonadenomen mit dem Lektin Peanut Agglutinin (PNA) zwischen Invasion und Pseudoinvasion zu unterscheiden. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Adenom und Karzinom finden. Die semiquantitative Auswertung der PNA-Bindung ergab jedoch eine relative Zunahme bei echter Invasion, sodass bei stark positiver Markierung eine maligne Transformation für wahrscheinlicher erachtet wurde. Insgesamt wurde bei starker Heterogenität eine zunehmend stärkere PNA-Bindung im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz gesehen, die sich jedoch nicht als signifikant darstellte.

Die Bindungsheterogenität von Neoglykoproteinen zeigte sich auch im Rahmen der eigenen Arbeit. Schon zwischen Adenomschleimhaut und submukösen Drüsen zeigte sich kein einheitliches Bindungsmuster (s. Abb. 14). Vielleicht lässt sich diese unterschiedliche Markierung mit den

verwendeten Zuckern auf Glykokalixveränderungen zurückführen, die durch mechanische Alteration der Drüsenschläuche bei Verlagerung nach submukös auftraten.

Da die Ergebnisse insgesamt heterogen ausfielen, muss bis auf weiteres in der Routinediagnostik noch auf die morphologischen Veränderungen im HE-Schnitt zurückgegriffen werden, bis ein spezifischer Bindungspartner neoplastische Zellen der Kolonmukosa erkennen lässt und damit die Differenzierung einer echten Invasion von einer Pseudoinvasion gestattet.

Bei der Frage nach Bindungsunterschieden sowohl zwischen normaler Dickdarmschleimhaut und Karzinomen als auch zwischen Karzinom und Metastase müssen auch Unterschiede der Adenokarzinome untereinander berücksichtigt werden. Das Kolonkarzinom kann aufgrund seines histologischen Aufbaus als Adenokarzinom mit anderen, ähnlich strukturierten Entitäten verschiedener Lokalisationen des menschlichen Körpers verglichen werden. Zu nennen sind hierbei zum Beispiel Adenokarzinome des Pankreas, des Bronchialsystems und des Ovars.

Am *exokrinen Pankreas* kommen per definitionem fünf maligne Tumoren vor. Neben dem Adenokarzinom werden in der WHO-Klassifikation Plattenepithelkarzinom, Zystadenokarzinom, Azinuszellkarzinom und undifferenziertes Karzinom aufgeführt (Klöppel et al. 1996).

Bei der Untersuchung von Tumoren des exokrinen Pankreas beschrieb Walper (1999) unter Verwendung derselben Neoglykoproteine an Adenokarzinomen eine relativ starke Anfärbung unter Verwendung von man, mal und glc. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fand sich auch am Dickdarmkarzinom eine mäßig starke Markierung für man und glc, wohingegen mal nur schwach positiv imponierte.

Betrachtet man das Bindungsverhalten an Metastasen von exokrinen Pankreaskarzinomen (Walper 1999), so zeigte sich im Vergleich zum Primärtumor eine ähnliche Affinität für man, mal und glc. Bei gleichbleibender Heterogenität der Bindung ließ sich kein Unterschied zwischen hämatogener und lymphogener Metastasierung aufzeigen.

Bei den eigenen Ergebnissen muss im Vergleich mit Walper (1999) bei den lymphogenen Metastasen auf ein häufiges Fehlen von Bindungsstellen hingewiesen werden. Hämatogene Filiae reichten in der

Neoglykoproteinbindungsintensität von negativ bis stark positiv (Tab. 2). In Übereinstimmung zu den Pankreastumoren und deren Metastasen war auch hier die inter- und intraindividuelle Bindungsheterogenität für alle verwendeten Neoglykoproteine nachweisbar.

Es lassen sich gewisse Übereinstimmungen im Bindungsverhalten der Neoglykoproteine an Adenokarzinomen von Kolon und Pankreas aufzeigen. Bei starker Bindungsheterogenität an den untersuchten Entitäten und relativ geringer Fallzahl müssen diese Ähnlichkeiten im Bindungsverhalten mit Zurückhaltung betrachtet werden.

Die *muzinösen Ovarialtumoren* lassen sich in Ovarialkystom, Borderline Kystom und Zystadenokarzinom unterteilen (Serov et al. 1973).

Feyler (1998) konnte bei den Zystadenokarzinomen, die sich histologisch in einen endozervikalen und intestinalen Subtyp einteilen lassen, tendenzielle Unterschiede im Bindungsmuster bei Lektinen erkennen. Es kam zur vermehrten luminalen respektive basalen Markierung der verwendeten Lektine beim endozervikalen im Gegensatz zur diffusen Markierung beim intestinalen Subtyp. Der Neoglykoproteineinsatz ergab erneut ein sehr heterogenes Erscheinungsbild der Bindung. Es ließ sich beim Endozervikaltyp eine schwache bis mäßige basale Markierung nachweisen, wobei der Intestinaltyp keine Neoglykoproteine band.

Im Gegensatz zu den muzinösen Tumoren, die bei den Neoglykoproteinen eine überwiegend basale Markierung zeigten, wiesen die Präparate der Kolonschleimhaut in der eigenen Arbeit ein vorwiegend diffus zytoplasmatisches Bindungsmuster auf.

Beiden Untersuchungen gemeinsam war die Heterogenität der Neoglykoproteinbindung.

Oberflächenänderungen der Glykokalix der untersuchten Gewebe können als Ursache diskutiert werden.

Kayser et al. (1989 a, 1991 a) konnten mit Hilfe der zuckerbindenden Proteine unterschiedliche Bindungsmuster zwischen *groß- und kleinzelligen Bronchialkarzinomen* aufzeigen. Es zeigte sich, dass Bindungsstellen für die Neoglykoproteine für kleinzellige Karzinome nicht oder nur sehr gering nachweisbar waren. Im Gegensatz zu den kleinzelligen zeigte sich bei den

nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen ein hoher Prozentsatz an gebundenem Glykoprotein. Besonders intensiv war die Markierung für die Zucker Mannose und Fukose. Dieses Bindungsverhalten lies sich an Adenokarzinomen, epidermoidalen und großzelligen Bronchialkarzinomen in annähernd gleicher prozentualer Häufigkeit (ca. 60-80%) nachweisen.

In der eigenen Untersuchung am Kolon waren ebenfalls bis mäßig positive Markierungen für die Neoglykoproteine Fucose-BSA und Maltose-BSA festzustellen. Es ergab sich jedoch in der Intensität der Färbung im Vergleich zu den anderen verwendeten Zuckerstrukturen keine deutliche Bevorzugung einer oder mehrerer Neoglykoproteine.

Bei der Bewertung der Interpretation der Befunde von Kayser et al. (1989 a, 1991 a) muss jedoch der Aspekt berücksichtigt werden, dass die deutliche Unterscheidung im Bindungsverhalten zwischen Bronchialkarzinomen unterschiedlicher Gruppen gezeigt wurde.

Bronchialkarzinome sind von sehr heterogener Differenzierung und nur 40-50% zeigen ein einheitliches histologisches Baumuster (Seifert 1990). Nach der WHO-Klassifikation werden daher noch neben dem Zelltyp und dem histologischen Aufbau zusätzlich Differenzierungsgrade unterschieden.

Die sehr unterschiedlichen Baumuster der Tumoren könnten für das differierende Bindungsmuster der Glykoproteine verantwortlich sein. Interessanterweise wurde jedoch von der Arbeitsgruppe um Kayser ein ähnliches Markierungsverhalten für die übrigen untersuchten Bronchialkarzinome beobachtet.

Es muss somit diskutiert werden, ob die verwendeten Neoglykoproteine in ihrer Struktur spezifisch genug für ein jedes Organsystem/ Zelltyp sind, oder ob eine Vielzahl verschiedener Zellen Oberflächenstrukturen exprimieren, die eine Markierung mit den Neoglykoproteinen erlauben, so jedoch keinen direkten Rückschluss auf die Dignität zulassen.

Ein möglicher Effekt auf die Bindungsfähigkeit der Neoglykoproteine kann auch durch unterschiedliche Funktionszustände der Dickdarmschleimhaut in verschiedenen Abschnitten des Kolons begründet sein. Da im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation im Kolon nicht in die Auswertung mit einging, könnte ein Teil der Variabilität der Bindungsmuster der hier verwendeten Neoglykoproteine mit den Ergebnissen von Gorelik et al. (1982) diskutiert

werden, der entsprechenden Bindungsunterschiede bei Verwendung von Lektinen beobachtet hatte.

Analoge Mechanismen der Expression von Oberflächenstrukturen in der Kolonmukosa von Mensch und Meerschwein lassen sich nicht ausschließen, sind aber bisher durch keinen Autor untersucht worden.

Die Untersuchung vieler Organsysteme mit Neoglykoproteinen hat Hoffnungen geweckt, biologische Vorgänge auf zellulärer Ebene im histologischen Schnittbild besser verstehen und so auch einschätzen zu können. Oft steht hier die Frage der malignen Entartung im Vordergrund. Aber auch der Einsatz von Glykoproteinen als Therapeutikum ist Gegenstand der Forschung.

Bis heute konnte dem Pathologen kein wirkliches Instrument zur alltäglichen Diagnostik in die Hand gegeben werden, die oft schwierigen Entscheidungen sicherer und einfacher als bisher zu treffen.

Die Ergebnisse mit den Neoglykoproteinen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, hat die Nachfrage nach immer spezielleren Zuckerstrukturen hervorgerufen. Eine Fortführung der forschenden Bestrebungen auf dem Gebiet der Glykohistochemie ist daher eine konsequente und folgerichtige Forderung.

Gabius (2001) befasste sich eben mit diesem Thema in seinem Artikel „Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins“.

Kayser et al. (2000, 2002) untersuchten den Zusammenhang von Auftreten einer Erkrankung (z.B. Asbestose, Lungenfibrose von Kolonkarzinomen) und Überlebenszeit der Patienten mit klinischen, glyko- und immunhistochemischen Analysen. Dies ein weiterer Versuch, die zellbiologischen Vorgänge in Bezug zur Klinik eines Patienten zu bringen und so besser zu verstehen.

Ein andere aktueller Ansatz in der Glykoproteinforschung beschäftigt sich mit der Hemmung von Escherichia-Coli-Enterotoxin durch Neoglykoprotein und Anti-Lektin-Antikörpern (Menezes et al. 2002). In der Untersuchung konnte eine bessere Wirksamkeit von Neoglykoproteinen im Vergleich zu Antikörpern gezeigt werden. Ein möglicher Nutzen künftiger medikamentöser

Therapie von Escherichia Coli induzierter Diarrhoe könnte aus weiterer Forschung resultieren.

Neben den schon erwähnten Gesichtspunkten der Ursachen möglicher Unterschiede in der Markierung mit den verwendeten Neoglykoproteinen müssen auch methodische Aspekte und Fehlerquellen betrachtet werden.

Die für diese Arbeit verwendeten Neoglykoproteine sollen endogene Zuckerbindungsstellen sichtbar machen. Wie bei allen wissenschaftlichen Untersuchungen stellt sich jedoch immer die Frage der Zuverlässigkeit einer Methode und der Reproduzierbarkeit der daraus resultierenden Ergebnisse.

Es gibt viele verschiedene Faktoren, die die Bindung an Oberflächenstrukturen beeinflussen und so die Anfärbungsintensität verfälschen können. Man kann diese Gründe der Artefaktbildung in vier große Kategorien einteilen:

- Präzipitate,
- Gewebsartefakte,
- Zellartefakte und
- Spezifische Hintergrundfärbung.

Generell wurde versucht, so weit wie möglich systematische Fehlerquellen, wie z.B. ungleiche Inkubationszeiten, unterschiedlich dicke Gewebsschnitte, faltiges Aufziehen der Präparate auf die Objektträger und ungleichmäßige Verteilung der Reagenzien von vornherein auszuschließen, um möglichst gleiche Bedingungen für alle ausgewerteten histologischen Schnitte zu erreichen. Differenzen in der Bindungsintensität aus diesen Gründen lassen sich jedoch nicht immer ganz ausschließen.

Präzipitate, die durch ihre unregelmäßige Verteilung im Schnitt imponieren, sind meist auf nicht in Reaktion getretene Chromogenpartikel zurückzuführen.

Bei Gewebsartefakten, wie Rissen und Falten kommt es an den Rändern und Falten zu unspezifischen Färbereaktionen, da die Reagenzien zwischen den Zellschichten eingelagert werden.

Aus diesem Grund wurde versucht, durch Natriumsilikat eine verbesserte Haftung des Präparates zum Objektträger zu erreichen, um auch ein Unterlaufen des Schnittes z.B. wegen Falten, zu mindern. Dieses Adhäsiv kann jedoch die Hintergrundreaktivität erhöhen.

Zellartefakte, die durch Quetschungen oder Nekrosen zustande kommen, sind ebenfalls als unspezifisch anzusehen und dürfen nicht in die Wertung mit einbezogen werden.

Die Hintergrundreaktivität ist ein häufiges Problem in der Immun- und Glykohistochemie (Boenisch 1989 a) und kann auf meist hydrophobe Interaktionen, elektrostatische Interaktionen, endogene Enzymaktivitäten sowie Antikörper (natürliche oder kontaminierende) zurück geführt werden.

Hydrophobe und elektrostatische Interaktionen kommen oft in Kombination vor, wobei besonders Bindegewebe (Kollagen, Laminin, Elastin, Proteoglykane u.a.) zu hydrophoben/ Ionen Wechselwirkungen und somit zu Hintergrundreaktionen neigen.

Diese Bindung entspricht nicht der spezifischen Neoglykoprotein (Zucker)–Lektinbindung (Protein). Eine häufig verwendete Methode zur Reduktion einer hydrophobiebedingten Hintergrundfärbung ist die Verwendung einer blockierenden Proteinlösung. Es sollten nur Eiweißmoleküle einer Tierspezies verwendet werden, um unspezifische Reaktionen zu verhindern. In dieser Arbeit kam Rinderserumalbumin (BSA) zur Anwendung.

Endogene Enzymaktivität wie die endogene Peroxidaseaktivität bewirkt die Freisetzung molekularen Sauerstoffs aus Peroxiden und kann so zu einer Verfälschung des Inkubationsergebnisses führen. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken wurden die Schnitte in methanolischem Wasserstoffperoxid (3%) für 10 Minuten inkubiert.

Andere Ursachen artifizieller Farbreaktionen im Sinne einer diffusen Anfärbung sind meist auf physikalische Einflüsse zurückzuführen. Hierzu müssen Austrocknungsprozesse vor der Fixierung, unvollständige Fixierung oder Reste des Einbettungsmediums gerechnet werden. Auch nekrotische Areale färben sich mit allen Reagenzien (Boenisch 1989 a) und dürfen nicht in die Wertung einfließen.

Eine statistisch signifikante Aussage in bezug auf die Auswertung lässt sich aufgrund der geringen Fallzahlen nicht treffen. Zusätzlich handelt es sich bei glykohistochemischen Bindungen ebenso wie bei der Immunhistochemie nicht um stöchiometrische Reaktionen.

Um nicht ausschließbare Begleitreaktionen möglichst in einer kombinierten Analyse ausschließen zu können, wurden Kontrollschnitte bei der Präparatherstellung mitgeführt und parallel ausgewertet.

Auch die physiologische Interaktion endogener Lektine in Form schon bestehender Bindungen, die stark variieren können, wirken sich auf die Bindungsfähigkeit der verwendeten, markierten Neoglykoproteinen aus. Auf diese Weise können die gesuchten Zuckerstrukturen maskiert werden und so der Auswertung entgehen (Gabijs 1988).

Zusammenfassend muss man davon ausgehen, dass sich eine Vielzahl von Faktoren auf die gewonnenen Ergebnisse auswirken können und deshalb in der Auswertung berücksichtigt werden müssen. Die Glykohistochemie an sich ist jedoch eine etablierte Methode, die histologisch schon an vielen anderen Organen erprobt wurde und reproduzierbare Ergebnisse erbrachte. Auch andere Untersuchungsansätze (Antikörper gegen Glykoproteine und Elektrophorese) wiesen wechselnd stark ausgeprägte Unterschiede in der Expression von Glykoproteinen nach.

## 7. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorkommen endogener Lektine in der Dickdarmschleimhaut, Adenomen, Karzinomen und Metastasen ausgewertet und bewiesen. Die verwendeten Neoglykoproteine zeigten in den untersuchten Fällen Bindungsmuster, die nicht eindeutig zur näheren Spezifizierung der Adenom-Dysplasie-Sequenz oder zur besseren Einschätzung von Karzinomen geeignet waren.

Die Ausprägung der Oberflächenglykoproteine, die in dem Bindungsmuster der genutzten Neoglykoproteine widergespiegelt wird, stellen einen Ausdruck der Zellaktivität dar. Interaktion dieser Zuckerstrukturen sollen wichtige Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse wie z.B. die Zellvermehrung steuern.

Die starke Heterogenität, die sich in der Auswertung der Präparate zeigte, lässt auf Prozesse wie Differenzierungsverlust und Expression auch atypischer Oberflächenstrukturen im Rahmen der malignen Transformation schließen.

Erfolge in der Neoglykoproteinforschung wurden schon an verschiedenen anderen Organsystemen erzielt (Feyler 1998; Gabius und Gabius 1990, 1991, 1993; Kayser et al. 1989; Nelius 1995).

Eine genauere Differenzierung der Zelloberflächenstrukturen könnte im Rahmen neuer Untersuchungen weiteren Aufschluss über deren Funktion geben.

Neben diagnostischen sind auch therapeutische Aspekte einer spezifischen Bindung wichtig. Im Rahmen eines lectin-mediated drug targeting bzw. eines neoglycoprotein-mediated drug targeting (Gabius und Kaltner 1994; Gabius et al. 1995; Menezes et al. 2002) könnte man gezielt ein Therapeutikum an bestimmte Zellen koppeln. Andere Versuche in der Tumorforschung streben eine Sensibilisierung des Körpers auf Tumorzellen an, wobei auch die Oberflächenstruktur der Zellen als Schlüssel gilt.

Aus den in dieser Arbeit verwendeten Neoglykoproteinen lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur das Vorhandensein endogener Lektine nachweisen. Eine mögliche Beeinflussung der Zellfunktion durch gezielte Modulation dieser Oberflächenstrukturen muss eventuell mit spezifischeren Zuckerresten getestet werden.

Zum heutigen Zeitpunkt kann diese Methode noch nicht als Standard in der histopathologischen Routinediagnostik am Dickdarm eingesetzt werden.

Diese Arbeit kann auf dem Weg dafür nur ein weiterer kleiner Baustein sein.

Weitere systematische Forschungen zur Struktur und Funktion endogener Lektine müssen folgen, um den wahren Nutzen als diagnostisches oder therapeutisches Hilfsmittel zu belegen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ackerman, Vedder L: Surgical Pathology. 8. Aufl. Mosby-Year Book Inc., St. Louis, 1996, S.729-799
2. Alhadeff JA: Malignant cell glycoproteins and glycolipids. Crit Rev Oncol / Hematol 9 (1989) 37-107
3. Alroy J, Ucci AA, Pereira MEA: Lectins: Histochemical probes for specific carbohydrate residues. In: DeLell's RA (Ed): Advances in Immunohistochemistry. Raven Press, New York, 1988 (a), S. 67-88
4. Alroy J, Ucci AA, Pereira MEA: Lectin histochemistry: An update. In: DeLell's RA (Ed): Advances in immunohistochemistry. Raven Press, New York, 1988 (b), S. 93-131
5. Andre S, Unverzagt C, Kojima S, Dong X, Fink C, Kayser K, Gabius HJ: Neoglycoproteins with the synthetic complex biantennary nonasaccharide or its alpha 2,3/alpha 2,6-sialyated derivates: their preparation, assessment of their ligand properties for purified lectins, for tumor cells in vitro, and in tissue sections, and their biodistribution in tumor-bearing mice. Bioconjug Chem 8 (1997) 845-855
6. Bardosi A, Dimitri T, Gabius HJ: (Neo)glycoproteins as tools in neurooncology. Histochemical patterns of the extent of expression of endogenous carbohydrate-binding. Virchows Arch 56 (1988) 35-43
7. Bardosi A, Dimitri T, Gabius HJ: Are glycoconjugates and their endogenous receptors involved in the fusion of mononuclear macrophages resulting in multinucleate giant cells? Histochemical and electron microscopic determination of endogenous sugar-binding proteins (lectins) in mononuclear macrophages and multinucleate giant cells appearing in granulomatous foreign body reaction. Submicrosc Cytol Pathol 21 (1989) 229-238

8. Barondes SH: Soluble lectins: A new class of extracellular proteins. *Science* 23 (1984) 1259-1264
9. Beuth J, Ko HL, Schirmacher V, Uhlenbruck G, Pulverer G: Inhibition of liver tumor cell colonisation in two animal tumor models by lectin blocking with d-galactose or arabinogalactan. *Clin Expl Metastasis* 6 (1988) 115-120
10. Boenisch T: Hintergrundreaktivität. In Naish S: *Handbuch 2 immunhistochemischer Färbemethoden*. Dako Corporation Carpinteria, Kalifornien, USA, 1989 (a), S. 30-33
11. Boenisch T: Färbemethoden. In Naish S: *Handbuch 2 immunhistochemischer Färbemethoden*. Dako Corporation Carpinteria, Kalifornien, USA, 1989 (b), S. 22-27
12. Boland CR: Lectin histochemistry in colorectal polyps. *Prog Clin Biol Res* 279 (1988) 277-287
13. Bond J H: Interference with the adenoma-carcinoma-sequence. *Eur J Cancer* 31A (1995) 1115-1117
14. Borchard F, Augthun M: Über die sogenannte Pseudoinvasion in kolorektalen Adenomen. *Verh Dtsch Ges Path* 67 (1983) 606
15. Borchard F, Heilmann KL, Hermanek P, Gebbers JO, Heitz PhU, Stolte M, Pfeifer U, Schaefer HE, Wiebecke B, Schlake W: Definition und klinische Bedeutung der Dysplasie im Verdauungstrakt. *Pathologe* 12 (1991) 50-56
16. Bourne J: *Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden*. Dako Corporation, Carpinteria, USA, 1989, S. 7-37
17. Boyd, WC: The lectins. Their present status. In: Neurath H, Baileys K (Eds.): *The Proteins*. Academic Press, New York, 1954, S. 756

18. Bresalier RS, Byrd JC, Wang L, Raz A: Colon cancer mucin: A new ligand for the beta-galactoside-binding protein galectin-3. *Cancer Res* 56 (1996) 4354-4357
19. Brinck U, Korabiowska M, Bosbach R, Gabius HJ: Detection of inflammation- and neoplasia associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. *Acta Anat* 161 (1998) 219-233
20. Cabane F, Gérard-Marchant R, Destaing F: Geschichte des Krebses: In Toellner R: *Illustrierte Geschichte der Medizin*. Andreas & Andreas Verlagsanstalt, Vaduz, 1992, S. 2757-2787
21. Campbell B, Finnie I, Hounsell E, Rhodes J: Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) Antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin. *J Clin Invest* (1995) 571-576
22. Cooper HS, Reuter VE: Peanut lectin – Binding sites in polyps of the colon and rectum. *Lab Invest* 49 (1983) 665-661
23. Damjanov I: Heterogeneity of basement membranes in normal and pathologically altered tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 416 (1990) 185-188.
24. Dippe B, Petrowsky H, Krüger S, Jentzkowsky KV, Schneider M, Lorenz M: Malignitätspotential kolorektaler Polypen – histomorphometrische, histochemische und immunhistochemische Untersuchung zur Dysplasie-Karzinom-Sequenz. *Zentralbl Chir* 120 (1995) 556-563
25. Donner A, Borchard F: Hyperplastische Polypen des Dickdarms: Foveoläre gastrale Metaplasie? *Verh Dtsch Ges Path* 78 (1994) 514
26. Eckert M, Heilmann K, Wiebecke B: Hyperplastische Polypen des Kolons. *Pathologe* 18 (1997) 228-232

27. Eder M: Verdauungstrakt. In: Eder M, Gedik P: Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie. 33. Aufl. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, (usw.), 1990, S. 537-584
28. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE: Epithelial tumours and tumour-like conditions. In: Whitehead R: Gastrointestinal and Oesophageal Pathology. 2. Aufl. Churchill Livingstone, Edinburgh, Hong Kong, London, (usw.), 1995, S. 863-892
29. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A, Lantz P, Rilke F, Listrom M, Stemmermann G: Gastrointestinal Pathology. 2. Aufl. Lippincott – Raven, Philadelphia, New York, 1999, S. 909-1068
30. Fey MF: Die adjuvante medikamentöse Therapie des Kolonkarzinoms. Schweiz Med Wochenschr 130 (2000) 1760-1765
31. Feyler S: Expressionsmuster endogener Lektine und Glykokonjugate in muzinösen Ovarialtumoren. Dissertation Univ., Halle, 1998
32. Fischer J, Klein PJ, Vierbuchen M, Skutta B, Uhlenbruck G, Fischer R: Charakterisation of glycoconjugates of human gastrointestinal mucosa by lectins. J Histochem Cytochem 32 (1984) 681-689
33. Fucci L, Valentini AM, Caruso ML: Can peanut lectin distinguish between pseudo and true invasion in colonic adenomas? Eur J Histochem 37 (1993) 335-343
34. Gabius HJ: Tumorlektinologie: Ein Gebiet im Schnittpunkt von Zuckerchemie, Biochemie, Zellbiologie und Onkologie. Angew Chem 100 (1988) 1321-1330
35. Gabius HJ: Tumorlektinologie – Status und Perspektiven klinischer Anwendung. Naturwissenschaften 77 (1990) 505-514

36. Gabius HJ: Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins. *Anat Histol Embryol* 30 (2001) 3-31
37. Gabius HJ, Bandlow G, Schirmacher V, Nagel GA, Vehmeyer K: Differential expression of endogenous sugar-binding-proteins (lectins) in murine tumor model systems with metastatic capacity. *Int J Cancer* 39 (1987) 643-648
38. Gabius HJ, Ciesiolka T, Kunze E, Vehmeyer K: Detection of metastasis-associated differences for receptors of glycoconjugates (lectins) in histomorphologically unchanged xenotransplants from primary and metastatic lesions of human colon adenocarcinomas. *Clin Exp Metastasis* 7 (1989) 571-584
39. Gabius S, Yamazaki N, Hanewacker W, Gabius HJ: Regulation of distribution, amount and ligand affinity of sugar receptors in human colon carcinoma cells by treatment with sodium butyrate, retinoic acid and phorbol ester. *Anticancer Res* 10 (1990) 1005-1012
40. Gabius HJ, Grote T, Gabius S, Brinck U, Tietze LF: Neoglycoprotein binding to colorectal tumor cells: comparison between primary and secondary lesions. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 419 (1991) 217-222
41. Gabius HJ, Bahn H, Holzhausen HJ, Knolle J, Stiller D: Neoglycoprotein binding to normal urothelium and grade-dependent changes in bladder lesions. *Anticancer Res* 12 (1992) 987-992
42. Gabius HJ, Gabius S, Zemlyanukhina TV, Bovin NV, Brinck U, Danguy A, Joshi SS, Kayser K, Schottelius J, Sinowatz F, et al.: Reverse lectin histochemistry: Design and application of glycoligands for detection of cell and tissue lectins. *Histol Histopathol* 8 (1993) 369-383
43. Gabius HJ, Kayser K, Gabius S: Protein carbohydrate recognition. Foundation and medical application with illustrations of tumor lectin studies. *Naturwissenschaften* 82 (1995) 533-543

44. Gabius HJ, Unverzagt C, Kayser K: Beyond plant lectin histochemistry: Preparation and application of markers to visualize the cellular capacity for protein-carbohydrate recognition. *Biotech Histochem* 73 (1998) 263-277.
45. Gabius HJ, Gabius S: Tumorlektinologie-Status und Perspektiven klinischer Anwendung. *Naturwissenschaften* 77 (1990) 505-514
46. Gabius HJ, Gabius S: *Lectins and cancer*. Springer, Heidelberg, New York, 1991
47. Gabius HJ, Gabius S: *Lectins and glycobiology*. Springer, Heidelberg, New York, 1993
48. Gabius HJ, Gabius S: Wohin führt die naturwissenschaftliche Forschung über Misteltherapie? *Dtsch Ärzteblatt* 91 A (1994) 2320-2328
49. Gabius HJ, Kaltner H: Lectinbezogene Therapieansätze auf dem Weg vom Labor in die Praxis. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 107 (1994) 376-381
50. Gabius HJ, Kayser K: Elucidation of similarities of sugar receptor (lektin) expression of human lung metastases from histogenetically different types of primary tumors. *Anticancer Res* 9 (1989) 1599-1604
51. Gabius HJ, Nagel GA: *Lectins and glykokonjugates in oncology*. 1. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 1988
52. Gorelick FS, Sarras MP Jr, Jamieson JD: Regional differences in lectin binding to colonic epithelium by fluorescent and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 30 (1982) 1097-1108.

53. Hahn SA, Kern SE, Schmiegel WH: Molekularbiologische Veränderungen bei gastrointestinalen Tumoren. Dtsch Ärztebl 92 A (1995) 211-217
54. Hanna Jr. MG, Harris JE, Hoover Jr. HC, Vermorken JB, Pinedo HM, Hanna Michael G: Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise. Vaccine 19 (17-19) 2001 2576-2582
55. Hassid S, Choufani G, Nagy N, Kaltner H, Danguy A, Gabius HJ, Kiss R: Quantitative glycohistochemical characterization of normal nasal mucosa, and of single as opposed to massive nasal polyps. Ann Otol Rhinol Laryngol 108 (1999) 797-805
56. Herling M: Glyko- und immunhistochemische Untersuchungen im chronologischen Längsschnitt Benzpyren – induzierter Sarkome der Ratte. Dissertation Univ., Halle, 1998
57. Hillemann P: Geschichte der Magen-Darm-Heilkunde: In Toellner R: Illustrierte Geschichte der Medizin. Andreas & Andreas Verlagsanstalt, Vaduz, 1992, S. 1784-1831
58. Hsu SM, Raine L: Versality of Biotin-labeled Lectins and Avidin-Biotin-Peroxidase Complex for Localization of Carbohydrate in Tissue Sections. J Histochem Cytochem. 30 (1982) 157-161
59. Irimura T, Matsushita Y, Sutton RC, Carralero D, Ohannesian DW, Cleary KR, Ota DM, Nicolson GL, Lotan R: Increased content of an endogenous lactose-binding lectin in human colorectal carcinoma progressed to metastatic stages. Cancer Res 51 (1991) 387-393.
60. Jaskiewicz K, Lancaster E, Banach L, Karmolinski A: Proliferative activity of normal and neoplastic colonic mucosa in population groups

with high and low risk for colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 18 (1998) 4641-4644

61. Jass JR: Tumors of the small and large intestines (including the anal region). In: Fletcher CDM (Ed): *Diagnostic histopathology of tumors*. Volume 2. Churchill Livingstone, Edinburgh, Hong Kong London usw., 1995, S. 243-274
62. Jass JR, Sobin LH: Histological typing of intestinal tumors. In: World Health Organisation (Hrsg): *International Classification of Tumors*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, „usw.“, 1989
63. Junqueira L, Carneiro J: Zelle. In: Junqueira L, Carneiro J: *Histologie*. 4. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, „usw.“, 1996, S. 41-96
64. Kayser K, Kiefer B, Toomes H, Burkhard HU : Analysis of adenomatous structures in histopathology. *Anal Quant Cytol Histol* 9 (1987) 273-278
65. Kayser K, Heil M, Gabius HJ: Is the profile of binding of a panel of neoglycoproteins useful as a diagnostic marker in human lung cancer? *Path Res Pract* 184 (1989 a) 621-629
66. Kayser K, Gabius HJ, Ciesiolka T, Ebert W, Bach S: Histopathologic evaluation of application of labeled neoglycoproteins in primary bronchus carcinoma. *Hum Pathol* 20 (1989 b) 352-360
67. Kayser K, Gabius HJ, Gabius S: Biotinylierte Liganden in der Rezeptorlokalisierung. *Zentralbl Pathol* 137 (1991 a) 473-478
68. Kayser K, Gabius HJ, Carl S, Bubbenzer J: Alterations in human lung parenchyma after cytostatic therapy. *APMIS* 99 (1991 b) 121-128
69. Kayser K, Bovin NV, Zemlyanukhina TV, Donaldo-Jacinto S, Koopmann J, Gabius HJ: Cell type-dependent alterations of binding of synthetic

blood group antigen-related oligosaccharides in lung cancer. *Glycoconj J* 11 (1994) 339-344

70. Kayser K, Ziehms S, Kayser G, Andre S, Bovin NV, Dong X, Kaltner H, Gabius HJ: Glycohistochemical properties of malignancies of lung and pleura. *Int J Oncol* 12 (1998) 1189-1194
71. Kayser K, Seemann C, Andre S, Kugler C, Becker C, Dong X, Kaltner H, Gabius HJ: Association of concentration of asbestos and asbestos-like fibers with the patient's survival and the binding capacity of lung parenchyma to galectin-1 and natural alpha-galactoside- and alpha-mannoside-binding immunoglobulin G subfractions from human serum. *Pathol Res Pract.* 196 (2000) 81-87
72. Kayser K, Bohm G, Blum S, Beyer M, Zink S, Andre S, Gabius HJ: Glyco- and immunohistochemical refinement of the differential diagnosis between mesothelioma and metastatic carcinoma and survival analysis of patients. *J Pathol* 193 (2001) 175-180
73. Kayser K, Zink S, Andre S, Schuring MP, Hecker E, Klar E, Bovin NV, Kaltner H, Gabius HJ: Primary colorectal carcinomas and their intrapulmonary metastases: clinical, glyco-, immuno- and lectin histochemical, nuclear and syntactic structure analysis with emphasis on correlation with period of occurrence of metastases and survival. *APMIS* 110 (2002) 435-446
74. Kellokumpu IH: Differences in lectin reactivities of cellular glycoconjugates between primary human colorectal carcinomas and their metastases. *Cancer Res* 46 (1986) 4620-4625
75. Klöppel G, Solcia E, Longnecker DS, Capella C, Sobin LH: Histological typing of Tumors of the Exocrine Pancreas. In: WHO, 2. ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996, S. 15-21

76. Knolle J, Grywacz A, Bahn J, Rath FW, Gabius HJ: Muster zuckerspezifischer Bindungsstellen in unterschiedlichen Differenzierungsstufen experimentell erzeugter Kniegelenktumoren der Ratte. In: Reiser M, Heuck A, Münzenberg KJ, Kur B (Eds): Osteologie aktuell VIII. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993 (a), S. 575-578
77. Knolle J, Bahn H, Stiller D, Rath FW, Gabius HJ: Expressionsmuster endogener zuckerbindender Rezeptoren (Endogener Lektine) in osteoklastären Riesenzellen und in Osteoklastomen. In: Pesch HJ, Stöß H, Kummer B: Osteologie aktuell VII, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993 (b), S.592-594
78. Langkilde N, Hastrup J, Olsen S, Wolf H, Orntoft T: Immunhistochemistry and cytochemistry of experimental rat bladder cancer: binding of the lectin pna and wga and of a le<sup>y</sup> mouse monoklonal antibody. J Urol 141 (1989) 981-986
79. Lotan R, Lotan D, Raz A: Inhibition of tumor cell colony formation in culture by a monoklonal antibody to endogenous lectins. Cancer Res 45 (1985) 4349-4353
80. Lotan R, Lotan D, Carralero DM: Modulation of galactoside-binding lectins in tumor cells by differentiation-inducing agents. Cancer Lett 48(2) (1989) 115-122
81. Lotan R, Matsushita Y, Ohannesian D, Carralero D, Ota DM, Cleary KR, Nicolson GL, Irimura T: Lactose-binding lectin expression in human colorectal carcinomas. Relation to tumor progression. Carbohydr Res 213 (1991) 47-57
82. Lotan R, Raz A: Endogenous lectins as mediators of tumor cell adhesion. J Cell Biochem 37 (1988 a) 107-117
83. Lotan R, Raz A: Lectins in cancer cells. Ann N Y Acad Sci 551 (1988 b) 385-398

84. McDonald JM, Moonka R, Bell RH Jr: Pathologic risk factors of occult malignancy in endoscopically unresectable colonic adenomas. *Am J Surg* 177 (1999) 384-387
85. Menezes CA, Amianti J, Harayama HS, Koga PC, Trabulsi LR, Piazza RM: Inhibition of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by neoglycoprotein and anti-lectin antibodies which mimic GM1 receptor. *FEMS Microbiol Lett* 216 (2002) 67-70
86. Molema G, Meijer DKF: Targeting of drugs to various blood cell types using (neo-)glycoproteins, antibodies and other protein carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 14 (1994) 25-50
87. Nelius T: Expressionsmuster zellulärer Lektine in Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen. Dissertation Univ., Halle, 1995
88. Nguyen HN, Walke S, Fritz P, Kreichgauer HP, Baum KD, Bode JC: Lokalisation kolorektaler Polypen und Karzinome in Abhängigkeit von Größe und histologischem Befund. *Dtsch Med Wschr* 116 (1991) 1041-1046
89. Ohlert W: Klinische Pathologie des Magen-Darm-Traktes: Histolog. Diagnose und Differentialdiagnose am gastroenterolog. Biopsiematerial / mit e. Beitrag von A. Boecking. 1. Aufl. Schattauer. Stuttgart, New-York, 1978, S. 438-463
90. Ohannesian DW, Lotan D, Lotan R: Concomitant increases in galectin-1 and its glycoconjugate ligands (carcinoembryonic antigen, lamp-1, and lamp-2) in cultured human colon carcinoma cells by sodium butyrate. *Cancer Res* 54 (1994) 5992-6000
91. Ohannesian DW, Lotan D, Thomas P, Jessup JM, Fukuda M, Gabius HJ, Lotan R: Carcinoembryonic Antigen and Other Glycoconjugates Act

as Ligands for Galectin-3 in Human Carcinoma Cells. *Cancer Res* 55 (1995) 2191-2199

92. Ortmann M, Vierbuchen M: Lektinhistochemie an Niere und Nierentumoren. *Verh. Dtsch Ges Path* 73 (1989) 339-349
93. Otto HF, Remmele W: Kolon und Rektum. In: Remmele W (Hrsg): *Pathologie Bd. 2 Verdauungstrakt*. 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (usw.), 1996, S. 533-676
94. Raz A, Meromsky L, Lotan R: Differential expression of endogenous lectins on the surface of nontumorigenic, tumorigenic and metastatic cells. *Cancer Res* 46 (1986) 3667-3672
95. Raz A, Meromsky L, Zvibel I, Lotan R: Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer* 39 (1987) 353-360
96. Raz A, Lotan R: Endogenous galactoside-binding lectins: A new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 6 (1987) 433-452
97. Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K: Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 16 (1998) 1788–1794.
98. Rhodes JM, Black RR, Savage A: Glycoprotein abnormalities in colonic carcinomata, adenomata, and hyperplastic polyps shown by lectin peroxidase histochemistry. *J Clin Pathol* 39 (1986) 1331-1334
99. Rosch W: Polyps and polyposis - limits of endoscopic therapy. Are we currently overtreating by removing colorectal polyps? *Fortschr Med* 115 (1997) 23-25

100. Roth J, Sata S, Zuber C, Stamm B, Heitz PH: Histochemische Untersuchungen zum Vorkommen des Thomsen-Friedenreich-(T)-Antigens in Tumoren des Dickdarmes und der Niere. Verh Dtsch Ges Path 75 (1991) 235
101. Ryder SD, Smith JA, Rhodes JM: Peanut Lectin: A mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cells. J Natl Cancer Inst 84 (1992) 1410-1416
102. Ryder SD, Parker N, Ecclestone D, Haqqani MT, Rhodes JM: Peanut lectin stimulates proliferation in colonic explants from patients with inflammatory bowel disease and colon polyps. Gastroenterology 106 (1994) 117-124
103. Saitoh O, Wang WC, Lothan R, Fukuda M: Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. J Biol Chem 267 (1992) 5700-5711
104. Schiebler T, Schmidt W, Zilles K: Anatomie. Sechste Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 1995, S.11
105. Schmiegel W, Adler G, Fölsch U, Layer P, Pox C, Sauerbruch T: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung – Vorsorge bei Risikogruppen. Dtsch Ärztebl 97 A (2000 a) 2234- 2240
106. Schmiegel W, Frühmorgen O, Pox C, Zeitz M: Endoskopische Diagnostik und Therapie von Polypen und Karzinomen. Dtsch Ärztebl 97 A (2000 b) 2319-2320
107. Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, Bresalier RS: Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. Cancer 75 (1995) 2818-2826.

108. Seifert G: Atmungsorgane In: Eder M, Gedik P (Hrsg): Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie. 33. Aufl. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, (usw.), 1990, S. 635-698
109. Serov SF, Scully RE, Sobin LH: International histological classification of tumors no. 9, Histological typing of ovarian tumors. In: World Health Organisation (Hrsg): International Classification of Tumors. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, „usw.“, 1973
110. Shamsuddin AM, Tyner GT, Yang GY: Common expression of the tumor marker D-galactose-beta-[1-->3]-N-acetyl-D-galactosamine by different adenocarcinomas: evidence of field effect phenomenon. *Cancer Res* 55 (1995) 149-152.
111. Shamsuddin AM: A simple mucus test for cancer screening. *Anticancer Res* 16 (1996) 2193-2199
112. Steuer MK, Gabius HJ, Bardosi A, Matthias R: Histochemische Identifizierung endogener Lektine durch markierte Neoglykoproteine bei humanen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen. *Laryngo Rhino Otol* 70 (1991) 243-249
113. Stillmark H: Über Rizin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und anderen Euphorbiaceen. Inaug Diss Dorpat (1888)
114. Sundblad AS, Chumbita RL, Zoppi JA: Expression of p53 and bcl-2 in colorectal adenomas and carcinomas. *Medicina* 57 (1997) 662-666
115. Tezuka F, Chiba R, Iwama N, Takahashi T: Development of the human colonic adenocarcinoma from adenoma as a histopathologically continuous process. *Tohoku J Exp Med* 168 (1992) 257-263

116. Uhlenbruck G, Beuth HJ, Oette K, Schotten T, Ko HL, Roszkowski K, Roszkowski W, Lüttiken R, Pulverer G: Lektine und die Organotropie der Metastasierung. *Dtsch med Wschr* 111 (1986) 991-999
117. Ulrich B, Kniemeyer HW, Borchard F, Schacht U: Diagnosis and therapy of colorectal polyps with special reference to adenomas. *Fortschr Med* 100 (1982) 2047-2053
118. Vermorken JB: Adjuvant immunotherapy in colorectal cancer. *Seminars In Oncology* 27 (2000) 66-71
119. Vierbuchen M: Lektin histochemie – ein neues diagnostisches Prinzip in der Pathologie und Biologie. *Verh Dtsch Ges Path* 71 (1987) 482-492
120. Vobecky J, Leduc CP, Devroede G, Madarnas P : The Reliability of Routine Pathologic Diagnosis of Colorectal Adenocarcinoma. *Cancer* 64 (1989) 1261-1265,
121. Walper R: Lektinrezeptoren und Expressionsmuster zellulärer Lektine in Tumoren des exokrinen und endokrinen Pankreas. Dissertation Univ., Halle, 1999
122. Yamashita K, Fukushima K, Sakiyama T, Murata F, Kuroki M, Matsuoka Y: Expression of Sia alpha 2-->6Gal beta 1-->4GlcNAc residues on sugar chains of glycoproteins including carcinoembryonic antigens in human colon adenocarcinoma: applications of *Trichosanthes japonica* agglutinin I for early diagnosis. *Cancer Res* 55 (1995) 1675-1679
123. Yang HB, Hsu PI, Chan SH, Lee JC, Shin JS, Chow NH: Growth kinetics of colorectal adenoma-carcinoma-sequence: an immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Hum Pathol* 27 (1996) 1071-1076

124. Yang HB, Chow NH, Sheu BS, Chan SH, Chien CH, Su IJ: The role of bcl-2 in the progression of the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Anticancer Res* 19 (1999) 727-730
  
125. Yao T, Kouzuki T, Kajiwara M, Matsui N, Oya M, Tsuneyoshi M: 'Serrated' adenoma of the colorectum, with reference to its gastric differentiation and its malignant potential. *J Pathol* 187 (1999) 511-517
  
126. Yuan M, Itzkowitz SH, Boland CR, Kim YD, Tomita JT, Palekar A, Bennington JL, Trump BF, Kim YS Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant, and malignant human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry. *Cancer Res* 46 (1986) 4841-4847

## 9. Anlagen

### Anlage I: Tabelle der histologischen Präparate

Eingangs- Nummer	Histologische Diagnose
Nr.: 12758/95	hyperplastischer Polyp des Kolons
Nr.: 8/96 lj	hyperplastischer Polyp und gestieltes Adenom des Kolons
Nr.: 14544/95 VII	tubuläres Adenom des Kolons mit geringer Dysplasie
Nr.: 17503/91 b	tubulovillöses Adenom des Kolons mit hochgradiger Dysplasie
Nr.: 6931/91	tubuläres Adenom des Kolons
Nr.: 14544/95 VIII	tubuläres Adenom des Kolons
Nr.: 565/96	tubuläres Adenom des Kolons mit mäßiger Dysplasie
Nr.: 23/96 I	tubuläres Adenom des Kolons
Nr.: 325/96	tubuläres Adenom des Kolons
Nr.: 906/96	tubuläres Adenom des Kolons
Nr.: 8/96 lb	tubulovillöses Adenom des Kolons
Nr.: 14502/91	tubulovillöses Adenom des Kolons
Nr.: 8/96 a	tubulovillöses Adenom des Kolons mit mäßiger Kernpleomorphie
Nr.: 23/96 II	tubulovillöses Adenom des Kolons
Nr.: 14544/95 VI	tubulovillöses Adenom des Kolons mit mäßiggradiger Dysplasie
Nr.: 5838/93	tubulovillöses Adenom des Kolons
Nr.: 14498/91	tubulovillöses Adenom des Kolons mit Übergang zum Karzinom
Nr.: 14510/91 Ia	mäßig differenziertes Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 17485/91 I	mäßig differenziertes Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 19552/91 I	tubulovillöses Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 20133/92	gering bis mäßig differenziertes Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 7668/93 I	mäßig differenziertes Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 287/95	mäßig differenziertes tubuläres Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 14544/95 IV	schlecht differenziertes Adenokarzinom mit anaplastischen Formationen
Nr.: 55/96	stark verschleimendes, mäßig differenziertes tubulo-papilläres Adenokarzinom
Nr.: 56/96 Id	mäßig differenziertes Adenokarzinom des Kolons mit mäßiger Desmoplasie
Nr.: 167/96	mäßig differenziertes tubulo-papilläres Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 455/96	hoch differenziertes tubuläres Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 701/96 If	weitgehend undifferenziertes Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 2368/96 I	gering differenziertes Adenokarzinom des Kolons
Nr.: 55/96 II	Lymphknotenmetastase eines Kolonkarzinoms
Nr.: 55/96 If	Lymphknotenmetastase eines Kolonkarzinoms
Nr.: 455/96 VI	Lymphknotenmetastasen eines Kolonkarzinoms (2)
Nr.: 701/96 Ich	Lymphknotenmetastase eines Kolonkarzinoms
Nr.: 2368/96 VI	Lymphknotenmetastase eines Kolonkarzinoms
Nr.: 4030/96 lib	Lebermetastase eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms des Kolon
Nr.: 901/96	Mammametastase eines Kolonkarzinoms

## 10. Thesen

1. Da das Kolonkarzinom eine der häufigsten Krebserkrankungen beiderlei Geschlechtes (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 1999) ist, sollten große Anstrengungen in Erforschung und Therapie dieses Leidens investiert werden.
2. Frühzeitige Diagnostik und Therapie werden bis auf weiteres von entscheidender Bedeutung für die Senkung der Mortalität sein.
3. Der Einsatz von Neoglykoproteinen kann schon heute Karbohydratbindungsstellen selektiv nachweisen.
4. Neoglykoproteine spiegeln Teile der Zellaktivität oder von Zustandsform wider, die in den Bindungsmustern im histopathologischen Schnitt ihren Ausdruck finden.
5. Das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen könnte durch die Glykoproteinstruktur der Zellmembranen beeinflusst werden.
6. Die in dieser Arbeit verwendeten Neoglykoproteine sind für eine verbesserte Routinediagnostik nicht einsetzbar.
7. Verfeinerte Neoglykoproteine könnten als Marker für Karbohydratrezeptoren im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz dienlich und somit von großem Wert für die histopathologische Routinediagnostik sein.
8. Neuere glykohistochemische Methoden könnten in der in der Therapie nicht nur maligner Erkrankungen ein Instrument zur Verkürzung eines Leidens und Verlängerung der Überlebenszeit werden.
9. Die Variabilität der Neoglykoproteinbindung könnte seinen Ausdruck in der Änderung der Lektinexpression im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz finden.

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name: Philipp Grün  
Anschrift: Paulstr. 8, 89231 Neu-Ulm  
Geboren: 18.01.1971 in Würzburg  
Familienstand: ledig  
Konfession: katholisch  
Eltern: Prof. Dr. med. Martin Grün  
Dipl. Soz. Päd. Elke Grün

## Schule

1977 bis 1979 Grundschule in Würzburg  
1979 bis 1982 Grundschule / Gymnasium in Schweinfurt  
1982 bis 1991 Willigis-Gymnasium in Mainz, Abitur im Juni 1991  
1991 bis 1992 Soziales Jahr

## Studium

Okt. '92-Juni '99 Studium der Humanmedizin  
an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg  
Sept. 1994 Physikum  
August 1995 I. Staatsexamen  
März 1998 II. Staatsexamen  
Juni 1999 III. Staatsexamen

## Ausbildung

Jan. 2000 - Juni 2001 Arzt im Praktikum in der Klinik für HNO-Krankheiten, Kopf- und Halschirurgie Plastische Operationen und Kommunikationsstörungen im Katholischen Klinikum gGmbH Koblenz Haus Marienhof

Seit Juli 2001 Assistenzarzt in der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Ulm

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und das benutzte Schrifttum vollständig angegeben habe. Die Herstellung der verwendeten biotinylierten Neoglykoproteine erfolgte ohne meine Mithilfe durch Herrn Professor Dr. rer. nat. H.-J. Gabius, Direktor des Institutes für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian- Universität München. Die histologischen Präparate wurden im immunhistologischen Labor des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg hergestellt.

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass von mir keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind.

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. habil. F.W. Rath für Übernahme und des Promotionsthemas und insbesondere für die wertvollen konzeptionellen Anregungen danken.

Zu großem Dank bin ich Herrn Dr. med. J. Knolle, Chefarzt des Institutes für Pathologie am Klinikum Dessau verpflichtet. Ohne seinen Rat und die fachliche Anleitung, die auch in Zeiten großer örtlicher Distanz problemlos erfolgte, wäre diese Promotion wesentlich erschwert worden.

Für Anregung und positive Kritik danke ich Herrn Dr. rer. nat. Bahn, Herrn Professor Dr. rer. nat. H.-J. Gabius für die Überlassung der Neoglykoproteine.

Frau Bauer, Frau Mußdorf und Frau Schreiber möchte ich für die Herstellung der histologischen Präparate und für die Unterweisung in der Anfertigung danken.

Herzlicher Dank gebührt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich in meinen Gedanken, Wünschen und Plänen immer unterstützt haben.