

**Aus der Medizinischen Klinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Einsele**

**Zelladhäsionsmodifikation durch
doppelt glykosylierte humane Lysozymmutanten**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**vorgelegt von
Dorothee Möller
aus Marbach**

Würzburg, Januar 2007

Referent: Prof. Dr. W. Scheppach

Koreferent: Priv. -Doz. Dr. B. Illert

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2007

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Glykoproteine	1
1.2	Poly-N-Acetyllaktosamine	1
1.3	Lewis Antigen	3
1.4	Alpha 1,3-Fukosyltransferasen	4
1.5	Sialylierte Lewis x- Substanz als Ligand für E-Selektin	5
1.6	Diapedese von Entzündungs- und Metastasenzellen	7
1.7	Klinische Bedeutung	8
1.8	Lysozym	10
1.9	Glykosyliertes Lysozym	11
1.10	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Chemikalien	14
2.1.3	Antikörper	15
2.1.4	Bakterien	15
2.1.5	Medien für Bakterien	16
2.1.6	Eukaryontische Zelllinien	16
2.1.7	Fertigmaterial	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Transformation	17
2.2.2	Ermittlung der Transformationseffizienz	17
2.2.3	Bakterienanzucht	17
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA	18
2.2.5	Photometrische DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	19
2.2.6	Kultivierung von CHO-Zellen	20
2.2.7	Lipofektion von Zellen	20
2.2.8	Immunaффinitätschromatographie	21
2.2.9	Ultrafiltration	23
2.2.10	Lysozymtest nach Osserman und Lawlor, 1966	23
2.2.11	Adhäsionsassay	24

2.2.12	ELISA	25
2.2.13	Western Blot	26
3.	Ergebnisse	29
3.1	Lysozymbestimmung aus dem Überstandsmedium nach Transfektion	29
3.2	Immunaффinitätschromatographie und Ultrafiltration	29
3.3	Adhäsionsassay	31
3.3.1	TNF α und die Adhäsion von U937 Zellen an HUVEC Zellen	31
3.3.2	Adhäsionsassay mit Lysozymmutanten aus Überstandsmedium	32
3.3.3	Adhäsionsassay nach Immunaффinitätschromatographie	33
3.3.4	Adhäsionsassay mit hLysII/IV transfizierten Kolonkarzinomzellen	35
3.4	Western blot von hLysII/IV und sLe ^x	37
4.	Diskussion	38
4.1	Überexpression und Aufreinigung von hLysII/IV in CHO-FucTIII-VII-Zellen	38
4.2	Adhäsionsversuche mit hLysII/IV-FucTIII-VII	39
4.3	Fucosyltransferase VI und die Bildung von sialyl-Lewis ^x (sLe ^x)	40
4.4	Fucosyltransferasen III, IV, V, VII und die Bildung von sLe ^x	42
4.5	Rekombinante hLysII/IV-Mutanten aus Kolonkarzinomzellen	43
4.6	Möglichkeiten der E-Selektin Blockade	45
4.7	E-Selektin-Blockade durch hLysII/IV-FUCTVI	48
4.8	Ausblick	49
5.	Zusammenfassung	51
6.	Literaturverzeichnis	52
7.	Anhang	59
7.1	Abkürzungsverzeichnis	59
7.2	Abbildungsverzeichnis	60
7.3	Tabellenverzeichnis	61
	Lebenslauf	
	Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Glykoproteine

Glykoproteine sind Eiweiße mit kovalent gebundenen Kohlenhydratresten. Der Kohlenhydratanteil kann aus vielen verschiedenen Bausteinen aufgebaut sein, unter anderem aus Glukosamin, Galaktose, Mannose, Sialinsäure und Fukose. An der Synthese der Zuckerketten sind spezifische Glykosyltransferasen beteiligt, deren Vorkommen stark zwischen verschiedenen Zellarten variiert (Varki et al., 1999). Es entsteht eine komplexe Vielfalt der Glykoproteinen, die multiple funktionelle Eigenschaften ermöglichen. Sie sind zum Beispiel für die Erkennungs- und Signalwandlungsfunktionen der Zellmembranen von entscheidender Bedeutung z.B. ABO-Blutgruppensubstanzen (Fukuda et al., 1984).

Der Zucker kann auf zwei Arten an das Peptid gebunden sein. Bei der O-glykosidischen Bindung wird der Zucker an die Hydroxygruppe von Serin oder Threonin geknüpft. Die N-glykosidische Zuckerbindung erfolgt an die freie Aminogruppe von Asparagin am Aminosäuremotiv Asn-x-Ser/Thr statt, wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt, mit Ausnahme von Prolin und Asparaginsäure. Glykoproteine mit N-glykosidisch gebundenen Zuckerresten werden als N-Glykane bezeichnet.

1.2 Poly-N-Acetyllaktosamine

Allen N-Glykanen ist eine Pentasaccharid-Grundstruktur gemein, sie besteht aus zwei Molekülen N-Acetyl-D-glukosamin und drei Molekülen D-Mannose.

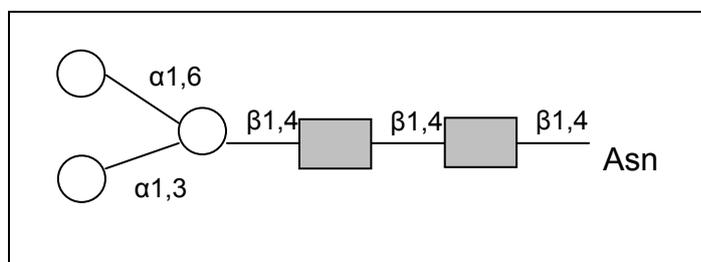
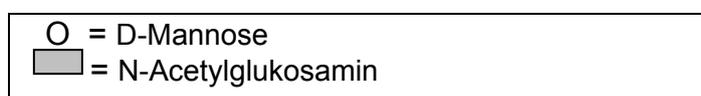


Abbildung 1: N-Glykangrundstruktur



Es gibt drei verschiedene N-Glykan-Typen, den mannosereichen Typ, den komplexen Typ und den hybriden Typ. Sie unterscheiden sich an den weiteren Zuckermolekülen, die an die Grundstruktur gebunden sind. Beim komplexen Typ sind die beiden Mannose-Reste mit N-Acetylglukosamin-Resten verknüpft. Ein N-Acetyllaktosaminrest besteht aus GlcNAc und Galaktose, die β 1-4 glykosidisch verknüpft werden. Besitzt eine Seitenkette der komplexen N-Glykane mehr als eine N-Acetylglukosamin-Einheit, dann werden sie als Poly-N-Acetyllaktosamine bezeichnet oder kurz Poly-laktosamine genannt.

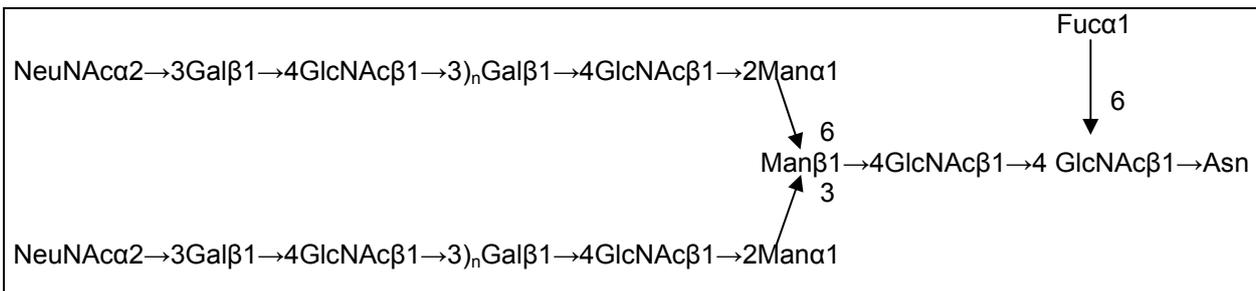


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines bifurkierenden Poly-N-Acetylglukosamins. Abkürzungen: Asn= Asparagin, Fuc= Fucose, Gal= Galaktose, GlcNAc= N-Acetylglukosamin, Man= Mannose, NeuNac= N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure), n= Anzahl der Laktosamin-Einheiten. (Verändert aus Molecular Glycobiology, Hrsg. Fukuda und Hindsgaul, 1994)

In kernhaltigen Zellen findet man Poly-laktosamine hauptsächlich auf den lysosomalen Membranproteinen lamp-1 und lamp-2 (Carlson et al., 1988). Durch die langen Zuckerreste wird die Stabilität der Lysosomen-Membran erhöht, so dass der Proteinanteil vor proteolytischen Verdau geschützt ist (Lee et al., 1990). Lamp-Proteine kommen auch in Endosomen und in der Zellmembran vor (Saito et al., 1992). Im Erythrozyten befinden sich die Laktosamine auf zellmembrangebundenen Glykoproteinen und sind Träger der Blutgruppenantigene ABH und Ii (Fukuda et al., 1984).

Eine Verlängerung der Seitenkette durch weitere N-Acetylglukosamine geschieht im Golgi Apparat durch die Aktivität der „i“- β 1,3-N-Acetylglukosaminyltransferase und Galaktosyltransferase. Durch Bindung einer Sialinsäure oder Sulfatierung einer endständigen Galaktose wird die Verlängerung gestoppt (Fukuda und Hindsgaul, 1994).

Man unterscheidet weiterhin verzweigte und lineare Poly-laktosamine. Die verzweigten Poly-laktosamine werden an terminalen Galaktose-Resten durch die α -1,2- Fucosyltransferase fukosyliert und bilden eine Vorstufe für die Blutgruppen-

Antigene A und B. Die linearen Poly-laktosamin-Strukturen werden an N-Acetylglucosamin-Resten durch die α -1,3-Fukosyltransferase fukosyliert und bilden die Lewis x Antigene. Die Lewis Antigene spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und Metastasierungsvorgängen.

Die Länge der Poly-laktosamine korreliert mit der Verweildauer des Proteins im Golgi-Apparat (Wang et al, 1991). Wahrscheinlich gibt es einen Zusammenhang mit dem Vorkommen der „i“- β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase und der Länge der Zuckerkette. In den bisher untersuchten Zellen wurden kurze Poly-laktosaminketten bei geringem Vorhandensein von „i“- β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase festgestellt, Galaktosyltransferase war hingegen im Überschuss verfügbar (Lee et al, 1990). Auch die räumliche Anordnung in der Tertiärstruktur scheint eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Poly-laktosaminen zu spielen (Fukuda und Hindsgaul, 1994).

1.3 Lewis Antigen

Die Synthese von Lewis Antigen wird durch eine Reihe von Glykosylierungsreaktionen katalysiert, eine α 1,3-Fukosyltransferase kontrolliert die letzte Reaktion. Durch Fukosylierung der endständigen Laktosamineinheit entsteht das Trisaccharid Le^x ($Gal\beta$ 1-4($Fuc\alpha$ 1-3) $GlcNAc$). Findet vor der Fukosylierung die Bindung einer Sialinsäure an den terminalen Galaktose-Rest statt, entsteht das Tetrasaccharid sLe^x , es hat folgende Molekülstruktur $NeuAc\alpha$ 2-3 $Gal\beta$ 1-4($Fuc\alpha$ 1-3) $GlcNAc$.

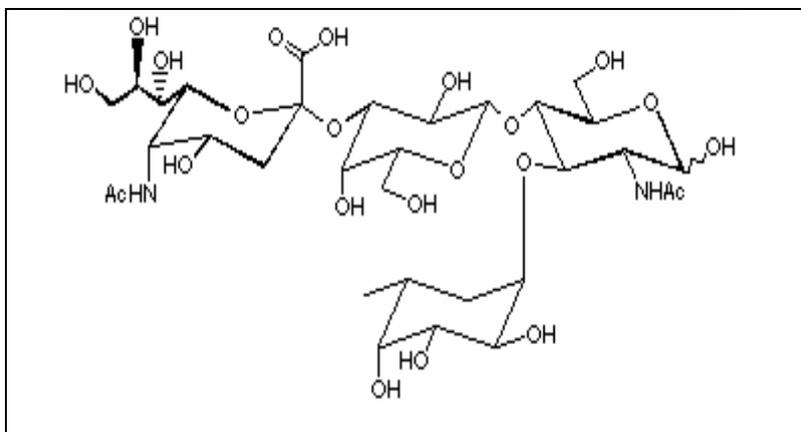


Abbildung 3: Darstellung von sLe^x

Le^x und sialyl- Le^x werden auf Karzinomzellen, Endothelzellen und Zellen der leukozytären Reihe (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) gebildet. Das Stereoisomer sLe^a , bei dem die Positionen für die Bindung von Fukose und Galaktose vertauscht sind, wurde auf Karzinomzellen von Kolon, Pankreas und Magen festgestellt (Falk et al., 1983). Geringe Mengen von sLe^a scheinen sich physiologischerweise auf normalen Epithelzellen zu befinden (Atkinson et al., 1982). Le^x , sLe^x und sLe^a sind in der Lage an Rezeptoren aus der Selektin Familie zu binden (Varki et al., 1994).

1.4 Alpha 1,3-Fukosyltransferasen

Fukosyltransferasen sind wahrscheinlich residente Membranproteine, die im Golgi Apparat lokalisiert sind. Sie katalysieren die Übertragung von Fukose der GDP-Fukose auf N-Acetylglukosamin über eine α -1,3 Bindung. Bisher sind neun verschiedene α 1,3 Fukosyltransferasen bekannt (FucT I-IX).

Die Fukosyltransferasen unterscheiden sich in verschiedenen Merkmalen, unter anderem anhand der Akzeptoren, auf die sie die Fukose übertragen und des Expressionsortes.

Fukosyltransferase VII zeigt Aktivität gegenüber α 2,3 sialylierten Strukturen, es kann sLe^x generieren, nicht aber Le^x , das Enzym wird in Leukozyten exprimiert (Sasaki et al., 1994). Bei FucT IV konnte nur eine schwache Aktivität gegenüber α 2,3 sialylierten Oligosacchariden nachgewiesen werden. Expressionsort der Fukosyltransferase IV sind hauptsächlich myeloide Zellen und das Gehirn (Mollicone et al., 1990). Für FucT III, V und VI konnte eine Aktivität gegenüber α 2,3 sialylierten Strukturen und nicht-sialylierten Typ 2 Oligosacchariden gezeigt werden (Weston et al., 1992). Es besteht eine hoher Grad an Homogenität zwischen diesen drei Enzymen. Sie sind in enger Nachbarschaft auf Chromosom 19 angeordnet (Nishihara et al., 1993). FucT VI wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, die lösliche Form dieses Enzyms wurde im Blutplasma nachgewiesen (Mollicone et al., 1990). Das FucT III- Gen zeigt sich in Gallenblase und Niere. Das Ursprungsgewebe der FucT V ist unbekannt.

Bisher ist unklar, welche der Fukosyltransferasen für die Generierung des E-Selektin-Liganden sLe^x verantwortlich ist. Eine Korrelation einer bestimmten Fukosyltransferase mit der Expression von sLe^x konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde die Beteiligung der Fukosyltransferasen III-VII bei der Bildung von sLex untersucht, da für diese FucT stabil transfizierte CHO-Zelllinien existieren.

Anhand genauer Strukturanalysen wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Es zeigt sich eine Verwandtschaft zwischen FucT III, FucT V und FucT VI. Diese drei Fukosyltransferasen sind in Nähe auf dem Chromosom 19p13.3 lokalisiert. Sie haben zu 90% identische Gensequenzen (Nishihara et al., 1993). Auch FucT IV und VII zeigen Ähnlichkeiten, sie stammen aber von einem anderen Gen Cluster ab. Dadurch lassen sich möglicherweise auch die Ähnlichkeiten in der Substratspezifität erklären (Kimura et al., 1997). Das Fukosyltransferase IV Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert, das FucT VII Gen auf Chromosom 9.

1.5 Sialylierte Lewis x- Substanz als Ligand für E-Selektin

Die wichtige Rolle der Lewis Substanz bei Entzündungs- und Metastasierungsvorgängen lässt sich damit erklären, dass die Lewis Antigene spezifische Liganden der Zelladhäsionsmoleküle aus der Selektin-Familie sind. Durch diese Interaktionen ist die Adhäsion von Leukozyten/ Tumorzellen an das Blutgefäßendothel möglich.

Studien der Selektine an Tiermodellen haben deren Wichtigkeit bei Entzündungsvorgängen, Immunantworten, der Hämostase und bei der Wundheilung gezeigt. Es wurde aber auch durch verschiedene Studien belegt, dass Selektine bei Arteriosklerose, Thrombosen, Arthritis und Metastasierungsvorgängen einen wichtigen Beitrag leisten (Ehrhardt et al., 2003).

Zur großen Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle gehören die Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), Integrine, Cadherine, Adressine und Selektine. Es gibt drei Mitglieder der Selektin-Familie, sie werden nach dem Ort ihrer Expression bezeichnet; es gehören dazu: E (endotheliales)-Selektin (ELAM-1), L (Leukozyten)-Selektin und P (Plättchen)-Selektin. Es sind Kalzium- abhängige transmembranäre Glykoproteine mit einer ähnlichen Molekülarchitektur. Sie besitzen am N-terminalen Ende eine Kohlenhydrat-erkennende Domäne, die sialylierte, fukosylierte und sulfatierte Laktosamin-Einheiten bindet. Alle drei Selektine liegen eng benachbart in einem Gencluster auf Chromosom 1 (Watson et al., 1990). Als erster E-Selektin Ligand wurde sialyliertes Lewis x erkannt, es ist unter dem Namen

sLe^x bekannt. Alle Selektine sind in der Lage sLe^x und dessen Derivate zu binden (Bavilacqua et al., 1993, Foxall et al., 1992).

P-Selektin wird außer auf Thrombozyten auf Endothelzellen exprimiert. P-Selektin wird innerhalb von Minuten aus den α -Granula der Thrombozyten und aus Weibel-Palade Granula der Endothelzellen zur Zelloberfläche verlagert (Boufanti et al., 1989). Auch dies geschieht erst nach Stimulation der Zellen durch Entzündungsmediatoren wie Thrombin und Histamin (Vestweber et al., 1999; Sugama et al., 1992). IL-4, IL-13 und Oncostatin M erhöhen die P-Selektin mRNA Synthese und Protein Produktion in humanen Endothelzellen (Yao et al., 1996), während TNF alpha, IL-1 und LPS nicht dazu führen (Pan et al., 1995).

L-Selektin wird auf Monozyten, Neutrophilen und einigen Lymphozyten kontinuierlich exprimiert und nach Aktivierung dieser Zellen an die Zelloberfläche gebracht. Vor allem native T-Lymphozyten bilden eine große Menge L-Selektin. Es bindet an den GlyCAM-1 Rezeptor, der sich auf HEV-Endothel aller sekundären lymphatischen Gewebe (z.B. periphere Lymphknoten, Peyer'sche Plaques) befindet. Auf dem GlyCAM-1 Rezeptor konnte sulfatiertes Le^x nachgewiesen werden (Hemmerich et al., 1994). Auf diese Weise können die Lymphozyten die Blutbahn an Stellen mit hoch endothelialen Zellen verlassen und in lymphatisches Gewebe eintreten. Dieser Vorgang wird auch als Lymphozyten „homing“ bezeichnet. GlyCAM-1 Rezeptoren befinden sich außerdem auf Endothelzellen, so dass L-Selektin tragende Lymphozyten auch dort adhären können.

E-Selektin ist ein Glykoprotein, welches transient von Endothelzellen als Antwort auf einen Entzündungsreiz gebildet wird. Es wird ausschließlich nach Aktivierung der Endothelzellen mit Zytokinen (IL-1, TNF, LPS) de novo synthetisiert und auf der luminalen Zelloberfläche exprimiert. Die maximale Expression erfolgt nach vier Stunden und klingt innerhalb von 24 Stunden wieder ab (Bavilacqua et al., 1987). Danach wird E-Selektin langsam internalisiert und den Lysosomen zum Abbau zugeführt (Subramanian et al., 1993). E-Selektin hat ein relatives Molekulargewicht von ungefähr 64 kDa. Es spielt eine Rolle in der Leukozyten- Endothel Interaktion während Entzündungsvorgängen, bei Metastasierung und man findet es auf Endothelzellen über arteriosklerotisch veränderten Läsionen.

Bei verschiedenen Krankheiten konnte ein erhöhtes Vorkommen von E-Selektin nachgewiesen werden.

Bei Patienten mit akutem Herzinfarkt zeigt sich ein initialer transientser Anstieg von löslichem E-Selektin, ebenso wie ein dauerhafter Anstieg löslichen VCAM's (Fassbender et al.,1995). Ebenso wurden erhöhte Werte für lösliches E-Selektin festgestellt bei Kindern mit schwerer Malariaerkrankung (Jakobsen et al.,1995), während Bronchialasthmaattacken (Kobayashi et al.,1994), in der akuten Phase der Kawasaki-Erkrankung (Kim et al.,1994), nach PTCA Behandlung (Kurz et al., 1994), in der akuten Stadium des Guillain-Barré-Syndroms (Oka et al.,1994) und bei M. Basedow Patienten (Wenisch et al.,1995).

1.6 Diapedese von Entzündungs- und Metastasenzellen

Die Migration von Entzündungs- und Tumorzellen aus dem Gefäßsystem in das Zielgewebe ist von der Adhäsion an Endothelzellen abhängig. Diese Adhäsion wird durch spezifische Adhäsionsglykoproteine auf den Oberflächen von Endothelzellen und Entzündungs-/ Tumorzellen vermittelt.

Insgesamt ist der Austritt der Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem in Richtung entzündetem Gewebe ein Phänomen aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Diesen vorausgehend ist die Aktivierung der Endothelzellen durch Zytokine.

Den initialen Schritt der Diapedese stellt die Interaktion von sLe^x mit E-Selektin dar. Zuerst werden die Entzündungszellen wie z.B. Granulozyten oder Lymphozyten chemotaktisch über SDF-1/ CXCL4 oder IL-8/ CXCR2 in das Zielgewebe gelockt. Durch Freisetzung gefäßaktiver Substanzen kommt es zu einer Dilatation der Blutgefäße und zu einer Veränderung der Hämodynamik des Blutes. Die Verlangsamung des Blutflusses drängt die Leukozyten an die Gefäßwand, somit wird ein verbesserter Kontakt von Lymphozyten mit der Endothelwand ermöglicht. Die Stimulation durch Zytokine (TNF α , IL-1) führt zu einer erheblichen Zunahme der E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1- Expression auf Endothelzellen. Durch Stimulation mit Histamin oder Thrombin, die durch die Entzündungsreaktion freigesetzt werden, erhöht sich die P-Selektin Ausbildung auf der Oberfläche der Endothelzellen und Thrombozyten. Dies führt zu einer vermehrten Adhäsion von Neutrophilen an stimulierte Endothelzellen und Blutplättchen. Auch die L-Selektin Ausprägung auf aktivierten T-Lymphozyten wird gesteigert.

Die verstärkte Ausbildung der Selektine erleichtert die Interaktion zwischen Lewis Substanz und Selektinen und es kommt zur Adhäsion von Leukozyten/ Tumorzellen an das Endothel. Die Adhäsion ist aber nicht stabil. Ständig zerbrechen alte Bindungen und neue bilden sich aus, die Kontaktzeit der Leukozyten am Endothel wird somit erhöht. Dieser Effekt wird auch als „rolling“ bezeichnet, er ist der erste Schritt der Diapedese. Das Rollen auf dem Endothel führt zu einer erhöhten Expression der Proteine LFA-1 und Mac-1 auf der Oberfläche der Leukozyten. Diese beiden Glykoproteine gehören zur Integrin-Familie, sie binden an den ICAM-1 Rezeptor auf der Endothelzelle. Durch die Interaktion von LFA-1/ Mac-1 mit ICAM-1 wird eine feste Bindung ermöglicht. Die rollende Bewegung wird gestoppt und die Leukozyten können sich dem Blutfluss entziehen. Sie durchwandern die Blutgefäßwand und gelangen durch IL-8/C5a chemotaktisch angelockt in ihr Zielgewebe (nach Tedder et al.,1995).

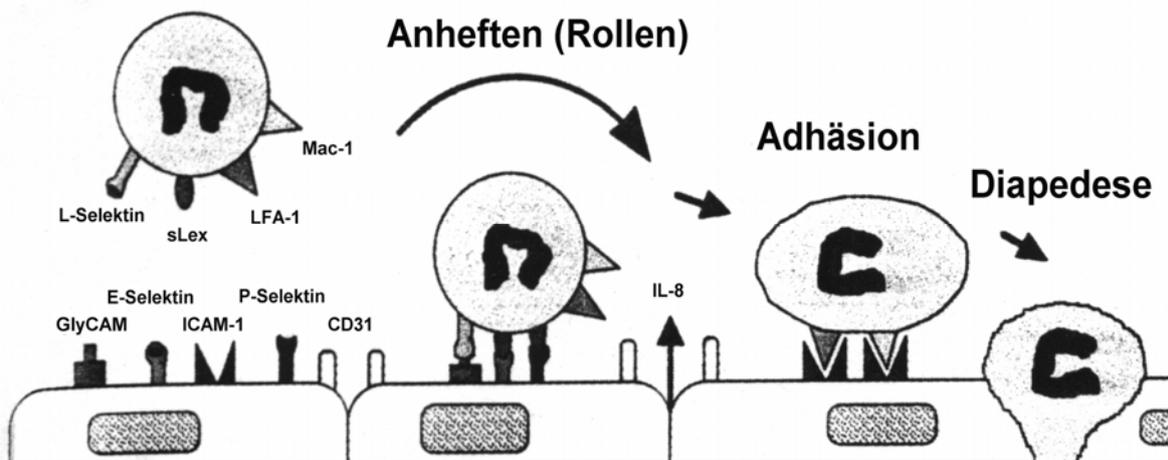


Abbildung 4: Wechselwirkungen zwischen Adhäsionsmolekülen und Endothelzellen führen zur Diapedese

1.7 Klinische Bedeutung

Die besondere Bedeutung der sLe^x- E-Selektin Interaktion besteht in der Einleitung der Diapedese und wurde oben bereits am Beispiel der Entzündungsprozesse dargestellt. Findet sie nicht statt, so kommt es zu einer verminderten Anheftung von Leukozyten an Endothelzellen mit fehlender Migration. Dieses Phänomen wurde bei der Leukozyten Adhäsionsdefizienz Krankheit beobachtet. Zwei Krankheitstypen wurden beschrieben, bei Typ I besteht ein kongenitaler Defekt der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und Mac-1. Bei Typ II besteht ein Defekt der

Fukosyltransferase, so dass sLe^x nicht gebildet werden kann. Symptome beider Erkrankungen sind schwere Infektionen (Etzioni et al., 1992).

Auch die Tatsache, dass durch E-Selektin Antikörper das „rolling“ verhindert werden kann deutet auf die zentrale Rolle hin (Bargatze et al., 1994).

Extravasation findet aber nicht nur bei Entzündungsvorgängen statt, sondern auch bei der hämatogenen Metastasierung. Bei diesem Prozess müssen vom Primärtumor abgelöste Tumorzellen Anschluß an Blutgefäße finden und diese auch wieder verlassen können. Für die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel ist sLe^a/ sLe^x verantwortlich. Tumorzellen mit einer hohen Expression von sLe^x/ sLe^a adhären stark an E-Selektin (Majuri et al., 1992), eine Adhäsionsblockade konnte durch monoklonale sLe^a-Antikörper erreicht werden (Iwai et al., 1993, Sawada et al., 1994). Nakamori stellte 1993 fest, dass eine hohe sLe^x Expression mit einer schlechteren Prognose und kürzeren Überlebenszeit von Patienten mit Kolonkarzinom assoziiert ist. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Lewis Antigens bei kolorektaler Tumorerkrankung und dem Vorkommen von Lebermetastasen wurde von Isozaki et al., 1998 beschrieben. Irimura et al. stellte zusätzlich fest, dass Kolonkarzinomzellen, die eine hohe Anzahl von sLe^x Antigenen auf ihrer Oberfläche exprimieren ein höheres metastatisches Potential haben, als Kolonkarzinomzellen mit einer niedrigen Anzahl von sLe^x. Martin-Satue wies 1998 eine erhöhte Expression der fünf α -1,3-Fukosyltransferase-Gene und ein vermehrtes Vorkommen von Le^x, sLe^x und sLe^a in metastasierenden Adenokarzinomzellen der Lunge nach. Im Vergleich dazu konnte bei nicht metastasierenden Lungen-Ca -Zellen keine Überexpression der FucT-Gene beobachtet werden.

Durch in vitro Versuche wurde allerdings eine inverse Korrelation zwischen basaler sLe^x Expression und der Adhäsion festgestellt. Aus diesen Daten schloss Schuldes, dass schon eine niedrige sLe^x Ausprägung ausreicht, um eine Selektin vermittelte Adhäsion zu garantieren (Schuldes et al., 2003).

Nach Takada (1993) vermittelt sLe^a die Adhäsion von Kolon-, Pankreas- und Magenkarzinomzellen an das Endothel, während sLe^x vor allem an der Bindung von Tumorzellen aus Lunge, Leber und Ovar beteiligt ist.

Bei der Initiierung und Entwicklung der Arteriosklerose spielt die Endothelschädigung eine zentrale Rolle. Sie ruft einen Entzündungsreiz hervor und IL-1 und TNF α werden ausgeschüttet. Dies reguliert die Selektin Expression auf Endothelzellen und

Leukozyten hoch und die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion wird ermöglicht. Nach der Migration wandeln sich die eingewanderten Monozyten in ortständige Makrophagen um, die eine Progression der Läsion bewirken (Lang, 1990).

Die Unterbindung der sLe^x - E-Selektin Adhäsion hat weitgreifende Folgen; sie stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, Entzündungs- vermittelte Krankheiten, Metastasierung und Entwicklung der Arteriosklerose zu kontrollieren. Es bestehen verschiedene Behandlungsideen und mögliche Therapeutika wurden bereits hergestellt: E-Selektin Antikörper (Bargatze et al.,1994), lösliches E-Selektin (Ulich et al.,1994), Selektin-Ig Chimere (Mulligan et al.,1993) und sLe^x. Bisher konnte aber keines tatsächlich als Medikament eingesetzt werden, da große Nachteile zu verzeichnen waren, diese bestanden zum Beispiel in schweren Nebenwirkungen, hohen Kosten, kurze Halbwertszeit in vivo oder Immunogenität.

1.8 Lysozym

Lysozym ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 14,6 kDa. Es besteht aus 130 Aminosäuren mit vier intermolekularen Disulfidbrücken, die dem Protein große Stabilität verleihen.

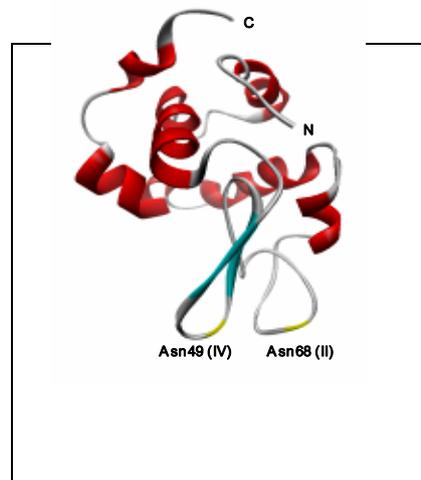


Abbildung 5: Darstellung von Lysozym

Das Protein trägt weder N- noch O-gebundene Oligosacharidketten. 1922 wurde es zufällig von Flemming entdeckt, der seine antibakterielle Wirkung erkannte. Lysozym katalysiert die Hydrolyse der β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglukosamin, welche im Mureinsacculus grampositiver Zellwände vorkommen. Die Zellwand gramnegativer Bakterien ist

durch Lipopolysaccharide und Lipoproteine weitgehend vor Lysozym geschützt. Die antimikrobielle Wirkung von Lysozym als basische Glukosidase ist ein Bestandteil der unspezifischen Körperabwehr. Lysozym wird von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet und kommt unter anderem in der Tränenflüssigkeit und im Nasensekret vor. Auch eine antineoplastische Wirkung von Lysozym wurde festgestellt. 1980 wurde es bereits in Japan zur Behandlung humaner Tumore patentiert (Hiroshi et al., 1980). Die Ursachen für die antineoplastische Aktivität von Lysozym sahen die Autoren vor allem in einer Stimulation des körpereigenen Immunsystems, sowie in einer Alteration der Tumorzelloberfläche. Flemming entdeckte das Gram-positive Bakterium *Micrococcus luteus*, dessen Zellwände heute noch beim Nachweis von Lysozym eingesetzt werden.

1.9 Glykosyliertes Lysozym

Wildtyp-Lysozym ist nicht glykosyliert. Deshalb wurde durch Melcher et al., 1998 in die cDNA-Sequenz durch in-vitro Mutagenese jeweils ein N-Glykosylierungssignal an vier verschiedenen Positionen (hLysI, hLysII, hLysIII, hLysIV) und in verschiedenen Kombinationen (hLysI/IV und hLysII/IV) eingefügt. Im Rahmen der Proteinglykosylierung im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat entstanden überwiegend komplexe Zuckerseitenketten mit einer variablen Anzahl an Laktosaminrepeats. Analysen der Oligosaccharide in den verschiedenen Lysozymmutanten zeigten, dass die Ausprägung und Zahl der N-Acetyllaktosamineinheiten bei doppelt glykosylierten Lysozymmutanten abhängig von der Positionierung der N-Glykosylierungsstellen ist. Liegen sie eng benachbart (hLysII/IV), so ist die Synthese größerer Oligosaccharide effektiver, als wenn sie weiter voneinander entfernt sind (hLysI/IV) (Melcher et al., 1998). Die besondere Konfiguration der Oligosaccharide im LysII/IV an einem oder an beiden Oligosacchariden begünstigt die Bildung einer dritten Antenne durch die N-Acetylglukosaminyltransferase V und die Laktosaminkettenverlängerung an der Stelle IV (Melcher et al., 2000). Allerdings war die Expression der Lysozymmutanten zu schwach und das Vorkommen der doppelt glykosylierten Formen zu gering, um eine Produktion im größeren Maßstab zu ermöglichen. Durch die Konstruktion und den Vergleich verschiedener Plasmidvektoren konnten Elemente gefunden werden, durch die sich die Expression der rekombinanten Glykoproteine stark steigern lässt. Ein neu konstruiertes Plasmid (pMCI/ hLysII/IV) mit einem hybriden Intron im 5'-

untranslatierten Bereich eines CMV-Promotor ermöglichte eine Expressionssteigerung um das 33fache gegenüber dem ursprünglich verwendeten Plasmid pHH/hLysII/IV (SV40-Promotor/ kein Intron) (Melcher et al., 2002). Die überexprimierte Lysozymmutante II/IV wurde durch Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt und die nicht, einfach und doppelt glykosylierten Formen durch Hydroxylapatitsäulenchromatographie voneinander getrennt. Damit konnte gezeigt werden, dass eine effektive Produktion und Reinigung von glykosyliertem Lysozym mit langen Laktosaminketten möglich ist. Aufgrund eines Defizits an Fucosyltransferasen kann das sLe^x Antigen in CHO-Wildtypzellen nicht hergestellt werden. Aus diesem Grund wird im Rahmen der aktuellen Studie hLysII/IV-cDNA in CHO-Zellen transfiziert, die die Fucosyltransferasen III, IV, V, VI und VII stabil exprimieren. Kraus bewies 1999 das Gelingen der Fucosylierung von glykosyliertem Lysozym durch Untersuchungen mit Glykosidasen.

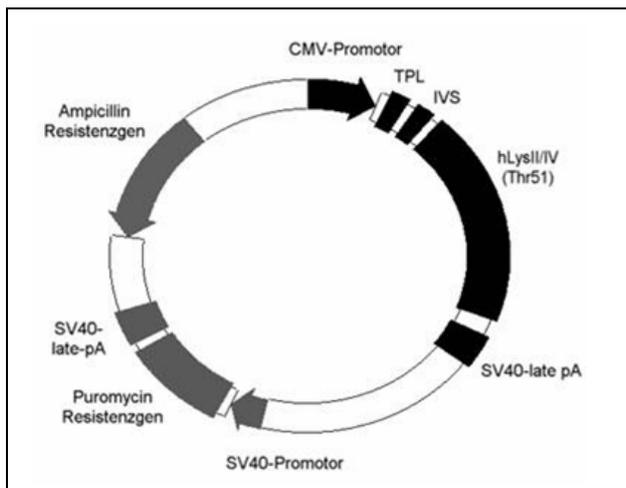


Abbildung 6: pMCI hLysII/IV

1.10 Zielsetzung der Arbeit

In frühen Arbeiten konnte durch in-vitro Mutagenese die doppelt glykosylierte Lysozymmutante hLysII/IV hergestellt werden. Die spezielle Anordnung der Glykosylierungsstellen ermöglichte eine hocheffektive Glykosylierung und die Entstehung von langkettigen Polylaktosaminen. Durch eine Fukosylierung der endständigen Laktosaminwiederholung kann sLe^x-Antigen entstehen, das als Ligand für Selektine bei der Adhäsion und Durchwanderung von Leukozyten bei Entzündungsreaktionen und Metastasenzellen beteiligt ist. In den ursprünglichen CHO-Zellen gibt es allerdings keine Fukosyltransferasen, so dass im Rahmen dieser Doktorarbeit CHO-Zellen, die stabil entweder die Fucosyltransferase III, IV, V, VI und VII exprimieren, mit dem Vektor pMCI/hLysII/IV transient transfiziert werden sollen. Dadurch werden glykosylierte Lysozymmutanten überexprimiert, die zum größten Teil in den Mediumüberstand abgegeben und durch Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt werden sollen. Die isolierten und aufkonzentrierten Lysozymformen (hLysII/IV-FuctIII-VII) werden anschließend mittels eines in-vitro Assays auf eine mögliche Hemmung der Adhäsion von Leukozyten an humane Epithelzellen untersucht und auf das Vorkommen von sLe^x mittels eines Western-Blotes untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Affinitätschromatographiesäule HiTrap 1ml	Amersham Biosciences, Freiburg
Bakterienschüttler Certomat	B. Braun GmbH, Melsungen
CO ₂ Brutschrank "Hera cell"	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader „Tecan Spectra II“	Tecan, Crailsheim
Elektrophoresekammer „mini trans blot“	BioRad, München
Elektrophoresegerät „power pac 200“	BioRad, München
Feinwaage AB 204	Mettler Toledo, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop „Leitz DM IL“	Leica, Wetzlar
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Heizmagnetrührer „Ikamag“	IKA-Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge „Labofuge 400R“	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge „Sorvall RC 5B Plus“	DuPont, Newtown
Rotoren für die Kühlzentrifuge	SS34
Luminescence Spektrometer LS 50 B	Perkin Elmer, Boston, USA
Ph-Meter	InoLab, WTW, Weilheim
Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
UV-Photometer „Ultrospec 3000“	Pharmacia Biotech, Cambridge
Sterilwerkbank „Hera safe“	Heraeus, Hanau
Tischkühlzentrifuge „Biofuge fresco“	Heraeus, Hanau
Vortexer „MS1 Minishaker“	IKA Labortechnik, Staufen
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
30% Acrylamid/Bis	BioRad, München
AgNO ₃ (Silbernitrat)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumazid (Säule)	Merck, Darmstadt
Bacto- Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton	Sigma, Deisenhofen
BCECF and BCPCF	Molecular Probes, INC., Leiden, Niederlande
DMSO (Dimethylsulfoxide)	Sigma, Deisenhofen
EBM (endothelial cell basal medium)	cell systems
ECL Lösung	Amersham Biosciences, Freiburg
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Niederland
Ethanolamin	Sigma, Deisenhofen
FBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Deisenhofen

HCl	Merck, Darmstadt
0,7 Vol, Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Lipofektamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
M 199 (10 mmol/l HEPES)	Life Technologies
Micrococcus luteus	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Opti-MEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PBS-Dulbecos	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Pen-Strep	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Life Technologies
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trypsin –EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
TNF α	Sigma, Deisenhofen
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
0,1% Triton- x100	Roche, Mannheim

2.1.3 Antikörper

Adhäsionsassay	Schaf anti-hLys AK	Acris (BP 609), Hiddenhausen
	Maus anti-CD62E	Ancell (240-020)
	Maus anti-CD 106	Cymbus Biotechnology LTD (CBL 206)
Western blot	Kaninchen anti-hLys	DAKO (A0099), Hamburg
	Maus anti-sLe ^x IgM	Calbiochem (565953), Bad Soden
ELISA	Maus anti-hLys	Biomedical Technologies Inc. (BT 630)
	Schaf anti-hLys	Human Lysozym ELISA kit BTI, Stoughton, MA, USA
	Esel anti-Schaf	Human Lysozym ELISA kit BTI, Stoughton, MA, USA

2.1.4 Bakterien

E.Coli XL1-Blue competent cells Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 Thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lac1 ^q ZΔM15Tn10(Tet ^r)]	Anzuchtmedium : LB-Medium	Stratagene, Heidelberg Kat.Nr. 200249
--	------------------------------	--

2.1.5 Medien für Bakterien

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl (in 800 ml dest. HO gelöst, der pH auf 7,0 eingestellt, auf 1 l mit destilliertem H ₂ O aufgefüllt und autoklaviert)
dYT-Medium	16 g Bacto-Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl (in 1 l dest. HO gelöst und autoklaviert)
Agaroseplatten	Den Medien wird Agarose in einer Endkonzentration von 1,5,% zugesetzt, im Dampftopf autoklaviert und anschließend Ampicillin (Endkonzentration 100 µg /ml) zugegeben.

2.1.6 Eukaryontische Zelllinien

CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) stabil transfiziert mit Fukosyltransferasen III-VII. Die Zellen wurden freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Vestweber, Münster	Zellwachstum: adhärent Kulturmedium: α-MEM, Penicillin- Streptomycin
HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)	Kulturmedium: EBM- Medium, Cell systems
U937 (human histocytic lymphoma)	DSMZ, Braunschweig Kulturmedium: 90% RPMI 1640, 10% FBS
Colo 206 und Colo 678	Kulturmedium: 85,6% MEM, 1% L- Glutamin, 2% Pen-Strep, 1% NEAA, 0,4% HEPES Puffer, 10% FBS
SW 480	Kulturmedium: 89% RPMI 1640, 1% Pen- Strep, 10% FBS
Cx-1	Kulturmedium: 86,6% DMEM, 2% Pen- Strep, 1% NEAA, 0,4% HEPES Puffer, 10% FBS

2.1.7 Fertigmaterial

Qiagen Plasmid kit für Maxipräparation, Qiagen- tip 500	Qiagen, Hilden
Human Lysozym ELISA kit	BTI, Stoughton, MA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Transformation

Zu einem entsprechenden Aliquot (200 µl) kompetenter Bakterien wird die zu transformierende DNA (1-5 ng in maximal 10 µl Volumen) gegeben. Nach einstündiger Inkubation auf Eis werden die Gefäße 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert („Hitzeschock“) und anschließend auf Eis abgekühlt. Zu dem Transformationsansatz wird 800 µl LB-Medium gegeben und 30 min bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert. Je 900 µl (9/10) und 100 µl (1/10) (bei 1/10 zusätzlich 400 µl LB-Medium dazugeben) des Ansatzes werden dann auf mit Ampicillin versetzten Medium-Agarose-Platten (Durchmesser 10 cm) verteilt und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

Ziel der Transformation ist die Einbringung des hLysII/IV-Plasmids in e.coli Bakterien. Durch die schnelle Bakterienvermehrung ist die Vermehrung des Plasmids leicht zu erlangen. Nach der Isolation der DNA aus dem bakteriellen Genom mittels der Maxipräparation wird die Konzentration und Reinheit spektrometrisch bestimmt.

2.2.2 Ermittlung der Transformationseffizienz

Durch Auszählen der Bakterienkolonien (KBE- „Kolonie bildende Einheiten“) auf der mit 1/10 des Transformationsansatzes versetzten Medium- Agarose- Platte kann unter Berücksichtigung der transformierten DNA-Menge die Transformationseffizienz in KBE/ µg DNA ermittelt werden.

Dazu werden die Kolonien auf einem Achtel der Platte ausgezählt. Die KBE ergibt sich aus: gezählten Kolonien * 8 *10 (nur 1/10 der Bakterien auf der Platte ausgesät) * 1000 (1ng eingesetzte DNA)/ µg DNA.

Bei Werten von $x \cdot 10^6$ / µg DNA geht man von einem mittleren Erfolg aus, bei $x \cdot 10^7$ / µg DNA von einem guten Ergebnis.

2.2.3 Bakterienanzucht

Von einer entsprechenden Stammpalte wird eine Kolonie mit einer Impföse abgenommen und in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Minipräparation (nach dem Protokoll der Firma Quiagen, Hilden, 1993)

Über Nacht wird eine Flüssigkultur (5 ml) der entsprechenden die Plasmid-DNA enthaltenden Bakterien mit Ampicillinzusatz (100 µg/ml) bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 2 ml der Kultur werden in ein Gefäß überführt und in 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und 250 µl P2-Puffer zugegeben. Der Ansatz wird nach Zugabe von 350 µl Neutralisations-Puffer (P3) 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine QUIAprep Säule aufgetragen und 30 sec. bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird mit 750 µl PE-Puffer und einer erneuten einminütigen Zentrifugation bei 12000 rpm gewaschen. Zu Schluss erfolgt die Eluation der DNA mit 50 µl Wasser und Zentrifugation (1 min/12000 rpm) in eine 1,5 ml Gefäß.

Maxipräparation (nach dem Protokoll der Firma Quiagen, Hilden, 1993)

Zuerst wird 200 ml einer die gewünschte Plasmid-DNA enthaltenden Bakterienkultur mit Ampicillinzusatz (100 µg/ml) angesetzt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am morgen zentrifugiert man die Kultur in einem GSA-Becher 15 min bei 3000 rpm und resuspendiert das Bakterienpellet in 9 ml P1-Puffer. Dazu werden 9 ml P2-Puffer gegeben, der Ansatz inkubiert 5 min bei Raumtemperatur. Die stark alkalische Pufferlösung 2 lysiert die Zellen und setzt damit die Plasmid-DNA frei. Anschließend werden 9 ml Neutralisierungs-Puffer (P3) zugesetzt und es folgt eine 20 minütige Inkubation auf Eis. Die Proteine und die chromosomale DNA werden durch die hohe Salzkonzentration gefällt, nicht dagegen die Plasmid-DNA. Durch Zentrifugation (SS34 / 4°C / 30 min / 12000 rpm) kann die Plasmid-DNA vom Pellet getrennt werden. Der Überstand wird auf die vorher mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte QUIAGEN-tip 500 Säule aufgetragen. Es folgen zwei Waschschrirte mit 30 ml QC-Puffer sowie die Elution mit 15 ml QF-Puffer. Das Eluat wird mit 0.7 Vol Isopropanol versetzt, womit die Plasmid-DNA gefällt wird; dann 30 min bei 4°C inkubiert und der Ansatz zentrifugiert (SM24/4°C/30 min/12000 rpm). Der Überstand soll vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen werden, das Pellet nach dem Waschen mit 70% Ethanol luftgetrocknet und anschließend in 100 µl Wasser oder 1/10 TE-Puffer aufgenommen werden. Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe des GeneQuant-Photometers (Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Die Ausbeute beträgt bis zu 500 µg DNA.

2.2.5 Photometrische DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Zur spektrometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration kommt das speziell hierfür entwickelte GeneQuant-Photometer der Firma Pharmacia unter Einsatz einer 100µl Quarzküvette zur Anwendung. 100µl der in TE-Puffer oder in H₂O gelösten DNA (1ml DNA gemischt mit 99 µl H₂O) werden hierfür luftblasenfrei in die Küvette pipettiert und simultan bei 260 nm und 280 nm gemessen. Bei entsprechender Programmierung liefert das Gerät automatisch folgende Ergebnisse : optische Dichte bei 260 und 280 nm (OD 260, OD 280), die Konzentration und den Reinheitsfaktor. Dabei entspricht eine OD 260 von 1 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 37 µg/ml einzelsträngiger DNA. Aus dem Verhältnis OD260/ OD280 ergibt sich die Reinheit der DNA bzw. RNA. Bei reiner DNA-Lösung liegt der Faktor bei 1,8. Liegt der gemessene Wert darüber, so ist dies ein Hinweis auf eine mögliche Verunreinigung durch RNA. Liegt der gemessene Wert darunter, so ist dies ein Indiz für eine mögliche Proteinkontamination und / oder für das Vorhandensein von organischen Lösungsmitteln. Auf reine RNA-Lösung weist ein Extinktionsverhältnis von 2,0 hin.

Probennummer	260 nm	280 nm	Ratio	Konzentration (µg/µl)
1	0,17	0,099	1,7172	0,85
2	0,031	0,02	1,55	0,155
3	0,123	0,7	1,757	0,615
4	0,08	0,038	2,1053	0,4
5	0,349	0,207	1,686	1,745
6	0,351	0,206	1,7039	1,755

Tabelle1: DNA-Konzentrationsbestimmung. Die Proben zwei und vier wurden aufgrund ihrer geringen DNA- Konzentration und möglichen Verunreinigungen nicht weiter verwendet. Für die Transfektion wurde Probe Nummer sechs verwendet.

2.2.6 Kultivierung von CHO-Zellen

CHO (chinese hamster ovary) –Zellen werden in α -minimal essential Medium (α MEM) mit Zusatz von 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin kultiviert und in einem Brutschrank mit 5 % -CO₂/Luft-Gemisch bei 37°C inkubiert. Alle drei bis vier Tage werden die Kulturen ausgedünnt und das Medium gewechselt.

2.2.7 Lipofektion von Zellen

Transiente Lipofektion

CHO-Zellen werden in einer Dichte von $0,8 \times 10^6$ Zellen / 25 cm² Kulturflasche ausgesät. Nach 24h Kultur entspricht die Zellkonfluenz ca 60-70%. Die CHO-Zellen werden durch Lipofektion transfiziert, wobei eine modifizierte Methode von Felgner et al verwendet wird.

In einem 2 ml Reaktionsgefäß wird 1,5 ml serumfreies Medium (Opti-MEM) vorgelegt und 7,5 μ g DNA zugegeben. In einem weiteren Polysterolröhrchen werden pro Ansatz 22,5 μ l Lipofektamin mit 1,5 ml Opti-MEM gemischt und tropfenweise zu dem DNA-Ansatz gegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird das DNA/Lipofektamin-Gemisch auf die inzwischen dreimal mit Opti-MEM (auf 37°C erwärmt) gespülten CHO-Zellen gegeben und für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wird die Transfektionslösung entfernt und durch α -MEM ersetzt. Nach zwei Tagen Kultur wird das Medium abgenommen und 15 min bei 4°C, 900/U zentrifugiert. Das Überstandsmedium kann dann im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt werden. Bei der transienten Transfektion wird die transfizierte DNA in der Empfängerzelle extrachromosomal gelagert, sie wird nicht im Genom der Empfängerzelle integriert. Deshalb kommt es zu keiner regelmäßigen Weitergabe der DNA an die nächste Zellgeneration. Die maximale Expression des Plasmids ist nach circa zwei Tagen erreicht, danach überwiegen die Zellen der nächsten Generation ohne eingebautes Plasmid und die Expression ist rückläufig.

Die Transfektion des hLysII/IV Plasmids wird mit der Lipofektionsmethode durchgeführt. Durch Zugabe von Lipofektamin zur DNA kommt es zur Liposomenbildung. Die DNA ist in einem Vesikel aus lipidhaltiger Doppelmembran eingeschlossen. Das Liposom bindet an die Zelloberfläche der Empfängerzelle und die DNA gelangt durch Fusion oder Endozytose in das Zellinnere der Empfängerzellen.

Der Mediumüberstand enthält das transient exprimierte Lysozym, da Lysozym zu >90% von den Zellen in das Medium abgegeben wird. Durch den Lysozymtest nach

Osserman und Lawlor wird Lysozym nachgewiesen. Über den Erfolg der Transfektion kann die Kotransfektion mit GFP Plasmid Aufschluss geben.

2.2.8 Immunaффinitätschromatographie

2.2.8.1 Herstellung einer Immunaффinitätschromatographiesäule

Lösung 1	PBS, 0,5M NaCl	pH 8,3
Lösung 2	0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl	pH 4,0
Lösung 3	1mM HCl	eiskalt
Puffer A	0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl	pH 8,3
Puffer B	0,1 M Natriumacetat, 0,5M NaCl	pH 4,0

Die Immunaффinitätschromatographie (IAC) beruht auf der spezifischen und reversiblen Wechselwirkung zwischen an die Säulenmatrix gekoppeltem Antikörper und Antigen. Sie wird für die Aufreinigung der Überstandsmedien verwendet. Zur Durchführung der Immunaффinitätschromatographie müssen die gegen den Zielanalyten gerichteten Antikörper an eine unlösliche Matrix gebunden werden. Zwischen Träger und Antikörper besteht eine feste kovalente Bindung, so dass die spezifischen Bindungseigenschaften des Liganden nicht beeinflusst wird. Ist die Bindung nicht stabil, kommt es bei mehrfacher Verwendung von Immunaффinitätschromatographiesäulen zum stetigen Verlust von Immunglobulinen und damit zur Verringerung der Säulenkapazität.

Wir verwenden eine 1 ml HiTrap NHS-aktivierte Sepharose Säule der Firma Amersham Biosciences. Das aktivierte Gel ist zur Lagerung mit 100% Isopropanol überschichtet. Es wird dreimal mit 2 ml eiskaltem 1 mM HCl ausgewaschen. Die Tropfgeschwindigkeit soll bei allen Vorgängen 1-2 Tropfen pro Sekunde betragen. Der Lysozymantikörper (polyklonaler Antikörper gegen humanes Lysozym von Acris) wird mit 3 ml Lösung 1 auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt und 15- 30 min lang durch die Säule gegeben, dazu werden an beiden Seiten 10 ml Spritzen angebracht. Es folgt ein Waschschrift, der Reihe nach werden 3 x 2 ml Puffer A, B, A in die Säule injiziert, der Puffer A verbleibt 15 min bei Raumtemperatur auf der Säule. Nun werden 3 x 2 ml Puffer B, A, B über die Säule gegeben. Zuletzt wird das Gel mit Lösung 4 (2 ml PBS + 0,1 M Natriumazid) überschichtet. Die Säule kann bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.8.2 Immunaффinitätschromatographie

Lösung A	10 mM Tris/HCl	pH 7,5
Lösung B	10 mM Tris/HCl	pH 8,8
Lösung C	10 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl	pH 7,5
Lösung D	100 mM Glycin/HCl	pH 2,8
Lösung E	1 M Tris/HCl	pH 8,0
Lösung F	0,1 % Natriumazid	

Die Säule auf Raumtemperatur erwärmen, die Verschlusskappen entfernen und den Lagerungspuffer abtropfen lassen. Die Säule wird mit 10 Bettvolumina (BV) Lösung A äquiliбriert. 10 ml des Testmediums werden dreimal hintereinander über die Säule geschickt. Anschließend wird die Säule mit je 20 BV Lösung A und C gewaschen, um alle Probenbestandteile, die nicht von den Antikörpern gebunden werden, aus der Säule aus zu waschen. Die Elution erfolgt mit 10 BV der Lösung D. Das Eluat kann in 1,5 ml Reaktionsgefäße fraktioniert werden, in denen 1/10 Volumen Lösung E vorgelegt wurde. Nach der Säureelution wird die Säule solange gewaschen, bis der pH 8,8 beträgt (etwa 10 ml). Nach einem erneuten Waschschrift mit 10-20 BV Lösung A wird die Säule mit 2 ml Lösung F überschichtet und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Eluate werden ebenfalls bei 4 °C gelagert.

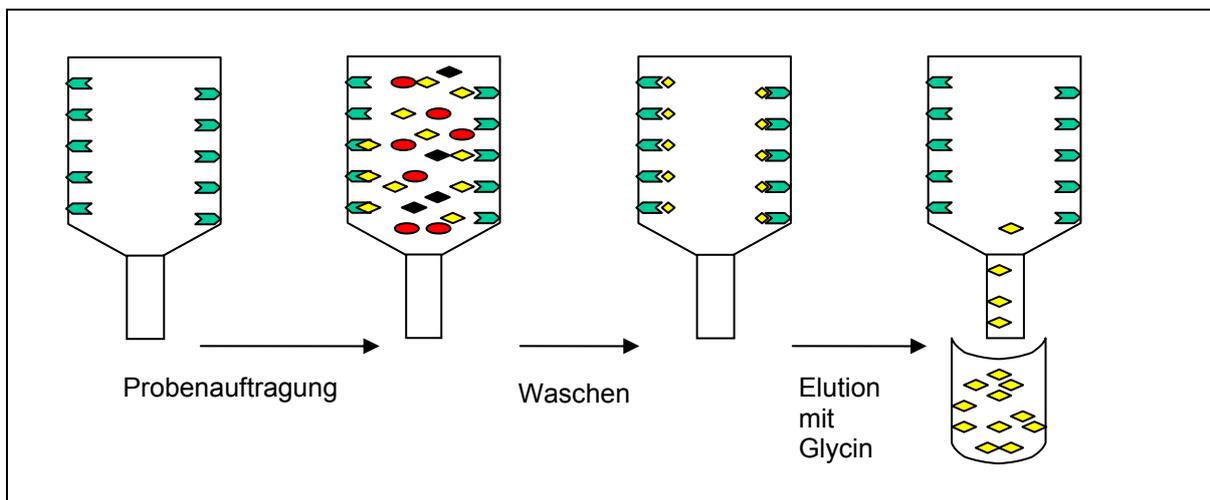
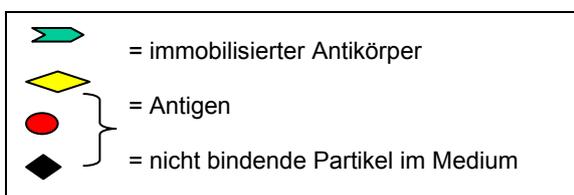


Abbildung 7 Schema der Funktionsweise der Immunaффinitätschromatographie



2.2.9 Ultrafiltration

Die Eluate werden in Vivaspin4 Ultrazentrifugationsröhrchen mit einer Porengröße von 5000 Da bei 4000/U, 4°C circa 30 min zentrifugiert. Das Volumen wird auf 200µl eingengt.

2.2.10 Lysozymtest nach Osseman und Lawlor, 1966

Welche der Eluate Lysozym enthalten, kann mittels Lysozymtest abgeschätzt werden. Die Quantifizierung von Lysozym basiert auf Beobachtungen, dass die Zellwand von *Micrococcus luteus* durch Lysozym verdaut wird. Es werden Agarplatten hergestellt, die eine Suspension aus *Micrococcus luteus* Fragmenten enthalten. Wird Lysozym auf diese Testplatten aufgetragen, kann aufgrund des entstehenden transparenten Lysehofs die Menge quantifiziert werden.

100 mg Agarose wird in 10 ml 67 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,0 im Dampftopf für 15 min aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt, mit der *Micrococcus*-Suspension (4,0 mg *Micrococcus luteus* aufgelöst in 1 ml 67 mM Na-Phosphat-Puffer) vermischt und in runde Kunststoffschalen gegossen (Durchmesser 10 cm). Diese werden nach der Polymerisation der Agarose bei 4 °C aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch werden Löcher für die Probenauftragung in das Gel gestanzt.

Die Testlösung (20µl) wird in die Probenauftragslöcher der *Micrococcus*-Platten pipettiert und die Platten für 4 Stunden in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert. Das Lysozym diffundiert in die Gelmatrix und lysiert die im Gel immobilisierten Bakterien, so dass ein transparenter Hof rings um die Auftragslöcher entsteht. Anhand der Durchmesser der Lysehöfe lässt sich mittels einer Eichgeraden die Lysozymkonzentration in der Probe abschätzen. Als Eichsubstanz werden definierte Konzentrationen humanen Lysozyms verwendet.

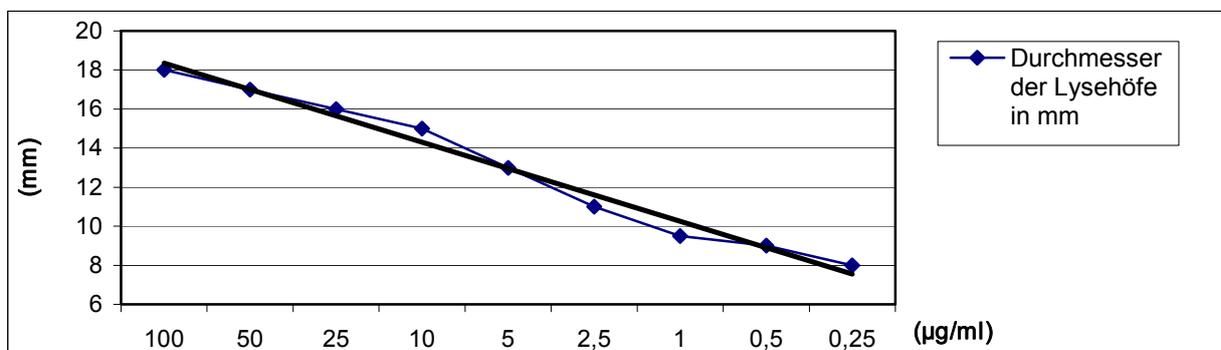


Abbildung 8: Eichgeraden zur Bestimmung der Lysozymkonzentration nach Osseman und Lawlor

2.2.11 Adhäsionsassay

Beim Adhäsionsassay wird das Bindungsverhalten von fluoreszenzmarkierten Leukozyten (hier U937-Zellen) an stimulierte Endothelzellen (HUVEC-Zellen) untersucht. Anhand einer Standardkurve kann das Intensitätssignal der Fluoreszenz in eine Zellzahl umgerechnet werden. Erhält man ein starkes Intensitätssignal haften viele U937 an HUVEC- Zellen, bei einem schwachen Signal ist die Bindung gering. Um eine optimale Adhäsion zu erlangen, müssen die Endothelzellen zur Ausbildung von E-Selektin mit TNF α stimuliert werden.

Für die Kultur der HUVEC- Zellen werden 6- Loch –Platten verwendet, pro Vertiefung werden ca. 0,5 Mio Zellen ausgesät (10 Mio Zellen auf 18 Vertiefungen). Nach vier Tagen Kultur ist Konfluenz erreicht. Ein Teil der HUVEC- Zellen werden 6 h vor Versuchsbeginn mit 50 U/ml TNF α bei 37 °C aktiviert.

Das HUVEC- Medium wird abgesaugt und durch 1 ml frisches HUVEC- Medium ersetzt, hinzugefügt werden die zu untersuchenden Proben und Kontrollproben (200 μ l VCAM). Alles inkubiert 30 min bei 37°C. Anschließend werden 1 Mio fluoreszenzmarkierte U937 Zellen pro Vertiefung für 30min bei 37°C dazugegeben.

Für die Zellmarkierung werden U937 Zellen mit einem in 80 μ l DMSO gelösten BCECF-Farbstoff gefärbt (5 Mio Zellen und 5 ml BCECF), 30 min bei 37°C inkubiert und der Färbvorgang mit 5 ml RPMI abgestoppt. Nach Zentrifugation (900 U/min, 10 min, 4°C) erfolgt die Resuspension in 20 ml M199 (10 mmol/l HEPES).

Nicht gebundene U937 Zellen werden im Waschvorgang mit 2 ml PBS entfernt. Die HUVEC- Zellen werden mit 1 ml Trypsin/EDTA 2 min bei 37°C trypsinisiert, mit dem Zellschaber gelöst und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1000 U/min/ 4°C/ 7 min, das Zellpellet wird mit 2 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das neue Zellpellet wird in 2 ml PBS +0,1% Triton resuspendiert. In Messküvetten überführt kann das Zellgemisch am Luminescence Spektrometer gemessen werden.

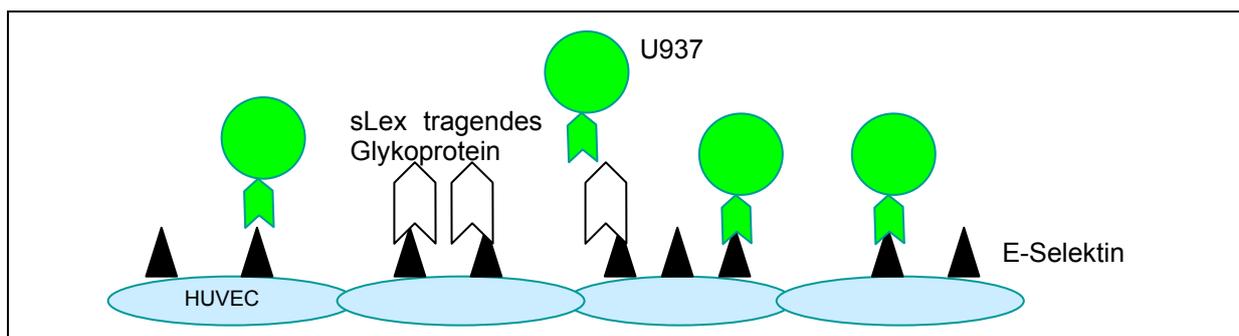


Abbildung 9: Prinzip des Adhäsionsassays

2.2.12 ELISA

Für den „sandwich ELISA“ (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) werden bereits mit einem spezifischen immobilisierten Antikörper beschickte Testplatten verwendet. Nach Zugabe der Testproben in die Reaktionsvertiefungen kommt es zur Antigen – Antikörper – Bindung. Nach Auswaschen allen ungebundenen Proteins, wird ein spezifischer enzymmarkierter Antikörper zugegeben. Das Enzym katalysiert eine Farbreaktion, welche photometrisch ermittelt wird.

Wir verwenden einen für humanes Lysozym- spezifischen sandwich ELISA der Firma BTI (Stoughton, MA, USA). Eine Polystyrenplatte wird mit Lysozym-spezifischem monoklonalem Antikörper beschichtet. 100 µl der auf Lysozym zu testenden Proben (1:10 verdünnt) werden zugesetzt, ebenso die Standardwerte, Negativ- und Positivkontrollen. Für die Standardkurve werden folgende Lysozymkonzentrationen verwendet: 50 ng/ml; 25 ng/ml; 12,5 ng/ml; 6,25 ng/ml; 3,125 ng/ml; 1,56 ng/ml und 0,78 ng/ml. Die Positivkontrolle ist humanes Lysozym, Negativkontrolle besteht aus Waschpuffer. Die Testlösungen inkubieren abgedeckt zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wird das Testmaterial aus den Vertiefungen entfernt und dreimal mit Natriumphosphat-Waschpuffer gewaschen. Ein Antigen-spezifischer Antikörper (Schaf anti-hLys IgG) wird hinzugefügt und inkubiert eine Stunde bei Raumtemperatur. Erneut wird dreimal mit Waschpuffer gewaschen und der Horseradish Peroxidase- markierte Drittantikörper (Esel anti-Schaf IgG) für eine Stunde bei RT zugegeben. Für die Detektion wird zu gleichen Teilen Peroxidase Lösung und Hydrogen Peroxid Substrat gemischt und nach einem weiteren Waschschrift für 15 Minuten in die Reaktionsvertiefungen gegeben. Nach Ablauf der chemische Reaktion wird mit 100 µl Stopplösung abgestoppt und innerhalb von 15 Minuten bei 405 nm im Tecan ELISA Reader gemessen. Die Konzentration des humanen Lysozym ist proportional zur Farbentwicklung. Exakte Werte werden durch Vergleich mit einer Standardkurve erlangt, die mit gereinigtem humanen Lysozym erstellt wurde.

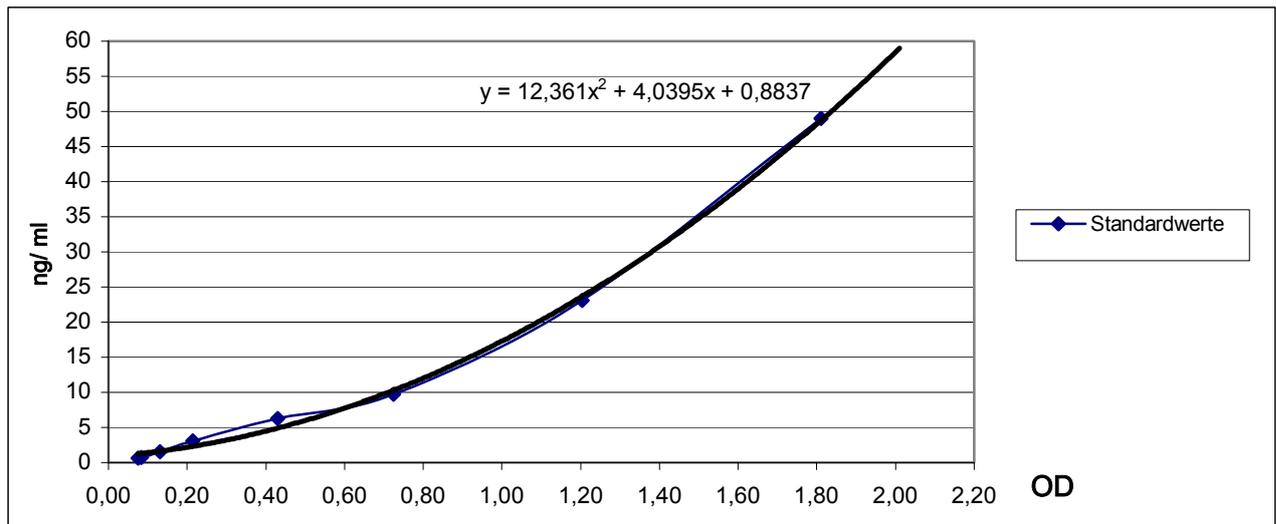


Abbildung 10: Standard-Lysozymkonzentrationen im ELISA

2.2.13 Western Blot

Der Western Blot ist ein spezifischen immunologischen Nachweis für Proteine, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Trägermembran fixiert werden.

SDS Sample Puffer, Aufbewahrung RT

Stacking Puffer 4x	25 ml	
Glycerol 100%	10 ml	Sigma, Deisenhofen
SDS	4 g	Serva, Heidelberg
Bromphenol blue	30 mg	Sigma, Deisenhofen
Pyronon Y	20 mg	
ddH ₂ O	ad 40 ml	

Stacking Puffer, 4x, pH 6,8; Aufbewahrung RT

Trisbase 0,5 M	30,2	Calbiochem
SDS 0,8%	40	Serva, Heidelberg
ddH ₂ O	ad 500 ml	

Reservoir Puffer, pH 8,3 ; 10x

Trisbase 0,25 M	30,2 g	Calbiochem
Glycin 1,92M	145,3 g	Sigma, Deisenhofen
1% SDS	100 ml	Serva, Heidelberg
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Blotting Puffer, 10x

Trisbase 0,25 M	30,2 g	Calbiochem
Glycin 1,92M	145,3 g	Sigma, Deisenhofen
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Transfer Puffer, 1x; Aufbewahrung 4°C

Trisbase 0,025 M	3,02 g	Calbiochem
Glycin 0,192M	14,53 g	Sigma, Deisenhofen
Methanol 20%	200 ml	J.T.Baker, Niederlande
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Trockenmilch blocking Puffer

Trockenmilch 5%	25 mg	Sigma, Deisenhofen
Tween 20 0,1%	500µl	Sigma, Deisenhofen
Na-Azid 0,1%	10 ml	Merck, Darmstadt
TBS 1x (20 mM Tris/HCl pH 7,4; 300 mM NaCl)	ad 500 ml	

BSA blocking Puffer

BSA 6%	30 g	Merck, Darmstadt
Trisbase 1x	50 ml	Calbiochem
Na-Azid 0,1%	10 ml	Sigma, Deisenhofen
ddH ₂ O	ad 500 ml	

Der erste Schritt des Western blots ist die Auftrennung in der Gel-Elektrophorese. Man verwendet zur Auftrennung von Proteinen die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese. Die Proben werden vorbereitet, indem zuerst 1 vol. Mercaptoethanol mit 4 vol. Sample Puffer gemischt werden, anschließend wird ein Teil dieser Mischung zu 30 µl des aufkonzentrierten Überstandmediums gegeben. Die Probenlösungen werden 4 min bei 100°C gekocht und 5 min auf Eis gelagert. Es folgt die Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese. Das Reaktionsgel wird in die Elektrophoresekammer eingebaut und mit 1 l Reservoir Puffer überschichtet. Die Probenlösung wird in die Geltaschen pipettiert, wobei das maximale Volumen von 100 µl pro Geltasche nicht überschritten werden soll. Die Elektrophorese läuft bei 120 V ca. 1,5 h. Danach wird das Gel aus der Kammer in eine Wanne mit Transfer Puffer überführt und kann dort zunächst aufbewahrt werden. Die zugeschnittene Blottingmembran wird 10- 15 sec in 100% Methanol gewaschen, mit ddH₂O abgespült und ebenfalls in Transfer Puffer gegeben. Es folgt der Aufbau der Transferelektrophoresekammer, dazu werden Gel und PVC Blottingmembran zwischen Whatman Filterpapier und Schwämmen platziert, in die Transferkammer überführt und mit Transfer Puffer überschichtet. Die Überführung dauert bei 200 mA konstantem Strom ungefähr 2 Stunden. Das elektrische Feld zieht die negativ geladenen Proteine in den einzelnen Banden auf die Nylonmembran, dort werden sie durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden.

Die Blottingmembran wird in 5% Trockenmilch Blocking Puffer überführt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die in der Milch enthaltenen Proteine sättigen die restlichen Bindungsstellen der Membran ab, so dass keine weiteren Proteine unspezifisch binden können. Es folgt die Färbeprozedur. Zuerst wird die Blottingmembran zweimal je 10 min in 50 ml PBS gewaschen. Der spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtete Erstantikörper (hier Lysozym- AK) wird in BSA blocking Puffer und 0,05-01% Tween 20 gelöst und verbleibt eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran. Die nicht gebundenen Antikörper werden mit PBS abgewaschen (zweimal 10 min). Im nächsten Schritt wird die Membran mit einem Zweit-Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, behandelt. Der Peroxidase gekoppelte Zweit-Antikörper wird in TBS gelöst, die Inkubation dauert eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die Bindung der beiden Antikörper an das auf der Membran fixierte Protein wird über eine enzymkatalysierte Lichtreaktion (Chemolumineszenz) sichtbar gemacht. Dazu wird die Membran eine Minute in ECL- Lösung gebadet. Die Peroxidase löst im Kontakt mit ECL- Lösung eine chemische Reaktion aus, welche die Substratmoleküle zum Leuchten bringt. Auf einem Film erscheint diese Reaktion schwarz, sie ist abhängig von der Belichtungsdauer. Da die Reaktion sehr intensiv ist, reichen Belichtungszeiten von einigen Sekunden bis Minuten.

3. Ergebnisse

3.1 Lysozymbestimmung aus dem Überstandsmedium nach Transfektion

Die Transfektion des hLys II/IV Plasmids in CHO- Fukosyltransferase III-VII- Zellen wurde erfolgreich durchgeführt. Das Vorhandensein von Lysozym im Zellmedium konnte mit dem Lysozymtest nach Osseman und Lawlor nachgewiesen werden, sowie durch Lysozym-spezifischen ELISA und Western blot. Die angegebenen Lysozymkonzentrationen sind Durchschnittswerte, die durch Lysozymbestimmung im Medium von drei verschiedenen Transfektionen erlangt wurde. Für den anschließenden Adhäsionsassay wurden die Medien aus CHO-FUCT III, V, VI und VII auf eine Konzentration von 369 ng/ ml Lysozym verdünnt und für den Adhäsionsassay verwendet.

Zelllinie	Lysozym (ng/ml) - Lysozymtest)	Lysozym (ng/ml) - Lysozym-ELISA
CHO FucT III	500	472
CHO FucT IV	300	369
CHO FucT V	500	472
CHO FucT VI	500	513
CHO FucT VII	400	422
WT	400	401

Tabelle 2: Transiente Transfektion von CHO-FUCTIII-VII Zellen mit hLysII/IV und Vergleich des Lysozymtests nach Osseman und Lawlor und des Lysozym-ELISAs

3.2 Immunaффinitätschromatographie und Ultrafiltration

In einem weiteren Versuch wurde das Überstandsmedium nach Transfektion mittels einer Immunaффinitätssäule aufgereinigt. Das Eluat (10ml) wurde anschließend mittels Ultrafiltration auf 200µl aufkonzentriert. Die Lysozymkonzentrationen der jeweiligen aufkonzentrierten Zellmedien beträgt zwischen 594 ng/ml beim Wildtyp und 661 ng/ml bei CHO-FucT III- Lysozym.

	Konzentration hLysII/IV nach Reinigung (ng/ml)	Konzentration hLysII/IV nach Ultrafiltration (ng/ml)	Faktor
WT	546,717	594,004	1,086
CHO FucT III	149,955	661,509	4,411
CHO FucT IV	278,913	646,785	2,319
CHO FucT V	240,308	632,368	2,631
CHO FucT VI	428,538	644,676	1,504
CHO FucT VII	589,817	616,877	1,049

Tabelle 3: Vergleich der Konzentrationen nach der Aufreinigung des Mediumüberstands mittels Immunaффinitätschromatographie und anschließender Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration

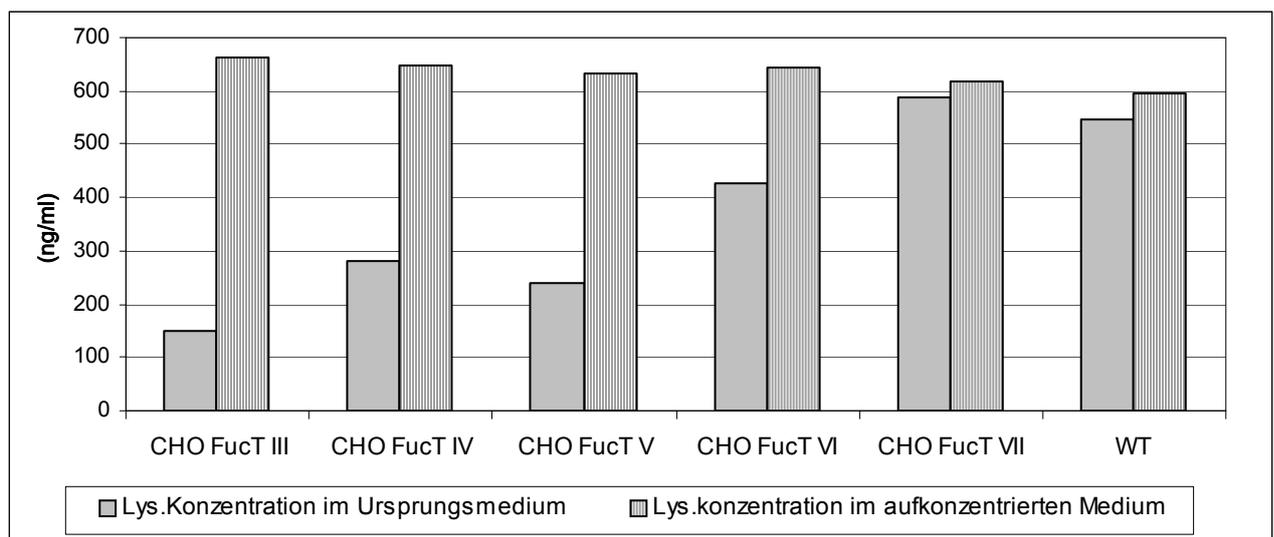


Abbildung 11: Vergleich der Konzentrationen nach der Aufreinigung des Mediumüberstands mittels Immunaффinitätschromatographie und anschließender Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration

3.3 Adhäsionsassay

3.3.1 TNF α und die Adhäsion von U937 Zellen an HUVEC Zellen

Werden Endothelzellen einer TNF α Stimulation ausgesetzt, wird die Expression von E-Selektin-, VCAM- und ICAM- Rezeptoren heraufreguliert. Dies sind Adhäsionsmoleküle, die von Leukozyten für das Durchtreten durch Endothel genutzt werden. Werden sie nicht ausgebildet, kommt es zu keiner Leukozytenadhäsion mit anschließender Diapedese. TNF α ist ein Zytokin und wird im Körper von Mastzellen und Makrophagen im Verlauf der Immunantwort gebildet. Die Stimulation von HUVEC- Zellen mit TNF α verbessert die Zelladhäsion von U937 Zellen deutlich. Dargestellt sind Mittelwerte von neun Einzelmessungen. Die Anzahl der adhärenen U937 an stimulierte HUVEC Zellen beträgt fast 400000 Zellen. An nicht stimulierte HUVEC haften lediglich 18000 U937 Zellen, die Adhäsion ist damit vernachlässigbar gering (s. Abb. 12).

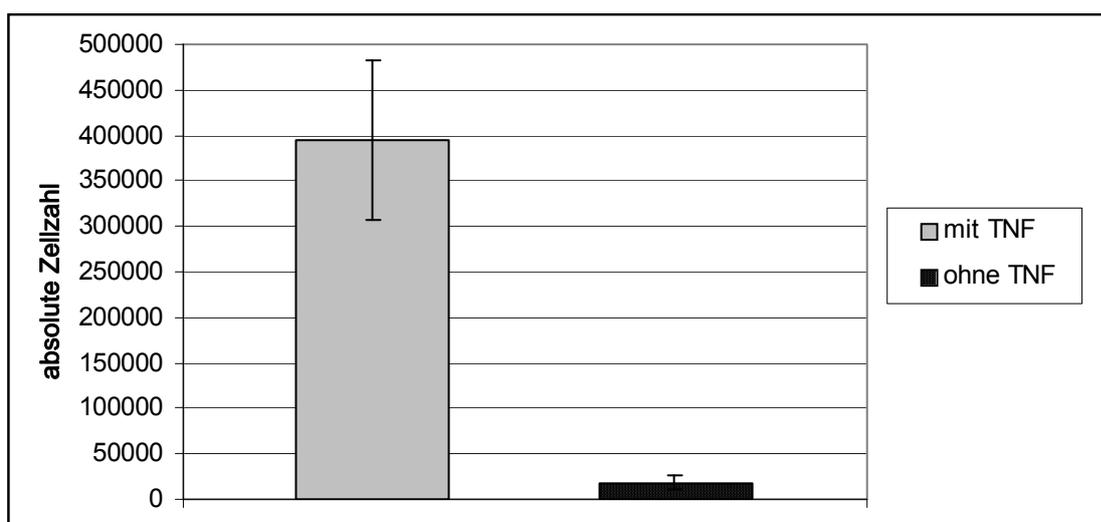


Abbildung 12: Adhäsion der U937 Zellen an stimuliertes/ nicht stimuliertes Endothel (n=9)

Die Zelladhäsion kann auch durch E-Selectin oder VCAM-Antikörper inhibiert werden. Durch E-Selectin-Antikörper kann allerdings die Adhäsion maximal um 29%, durch VCAM dagegen um bis zu 58% vermindert werden. In Abbildung 13 sind die Mittelwerte aus vier Einzelmessungen dargestellt.

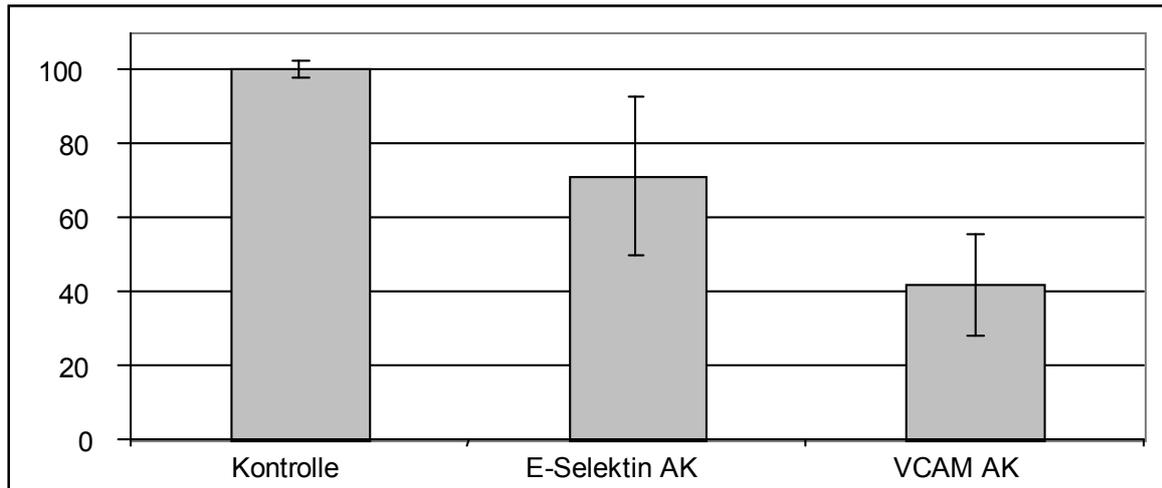


Abbildung 13: Adhäsionshemmung durch E-Selektin und VCAM-AK (n=4)

3.3.2 Adhäsionsassay mit Lysozymmutanten aus Überstandsmedium

Diese Adhäsionsversuche wurden mit Überstandsmedium der mit pMCI/hLys II/IV transient transfizierten CHO FucT III-VII-Zellen durchgeführt. Es wurde eine definierte Menge des glykosylierten Lysozym (369 ng/ml) eingesetzt, die Lysozymkonzentration im Überstandsmedium wurde zuvor mit ELISA bestimmt.

	Adhäsion in %	Adhäsionsblockade in %	p- Wert
WT	100,00		1,00
FUCTIII	128,85		0,64
FUCTIV	93,35	6,65	0,78
FUCTV	100,41		0,96
FUCTVI	68,41	31,59	0,01
FUCTVII	103,42		0,95
Anti-VCAM-1	52,34	47,66	0,06

Tabelle 4: Adhäsionshemmung durch nicht aufgereinigtes Überstandmedium aus CHO-FUCTIII-VII-Zellen transfiziert mit hLysII/IV

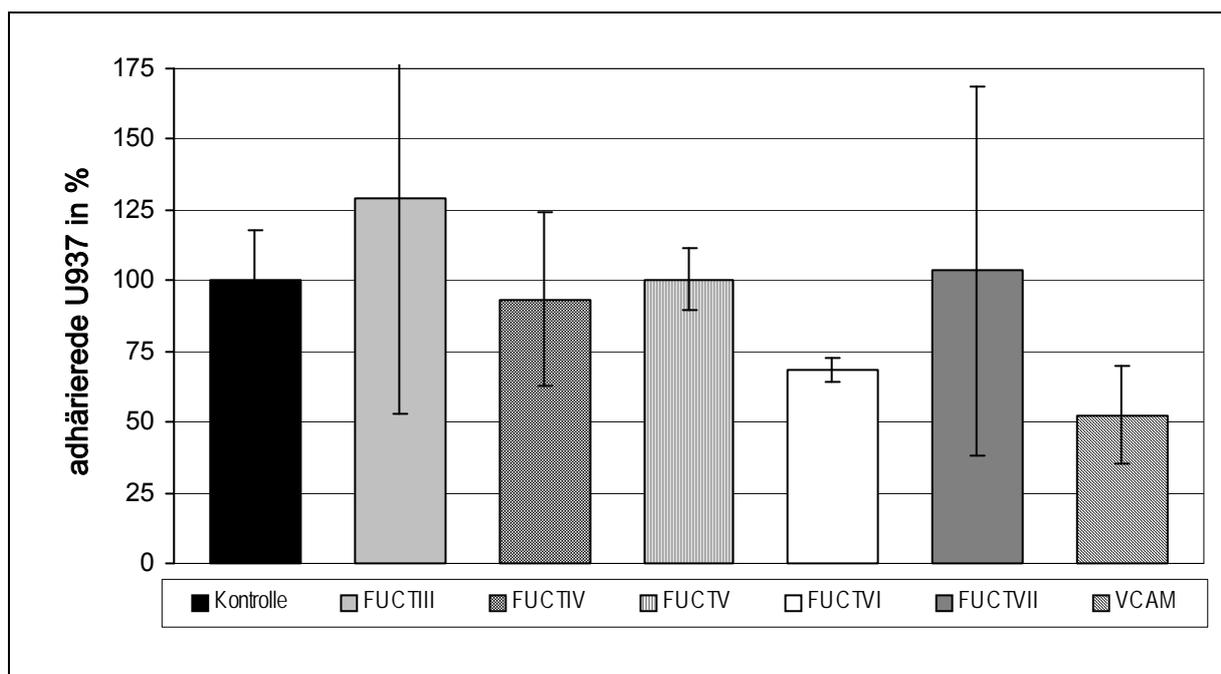


Abbildung 14: Adhäsionsassay mit Überstandslysozym

Im Diagramm dargestellt sind Mittelwerte von drei Einzelmessungen, die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-Test. Als signifikant verminderte Adhäsion wurde ein p-Wert von ≤ 0.05 gewertet.

Die Bindung von U937 Zellen an mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierten HUVEC Zellen wird der maximalen Bindung (100%) gleichgesetzt und ist im Schaubild als Kontrolle bezeichnet. Das durch Fukosyltransferase VI veränderte Lysozym ist als einziges glykosyliertes Lysozym in der Lage, die Adhäsion signifikant zu blockieren ($p = 0,01$). Es verringert die Anhaftung um 31,59 %. Zum Vergleich wurde ein VCAM-1 Antikörper eingesetzt, es konnte eine deutliche Zelladhäsionsverminderung von 47,66 % erzielt werden, jedoch ist sie statistisch nicht signifikant ($p = 0,06$).

3.3.3 Adhäsionsassay nach Immunaffinitätschromatographie

Für diesen Adhäsionsversuch wurde ein Teil des Überstandsmedium durch eine mit polyklonalem humanem Lysozymantikörper gekoppelte Sepharose-Säule aufgereinigt. Die Eluatfraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration aufkonzentriert und eine definierte Menge von 78 μl für den Adhäsionsassay verwendet, das entspricht einer durchschnittlichen Menge von 47 ng/ml Lysozym.

Dadurch soll bestätigt werden, dass der Effekt der im Adhäsionsversuch zu sehen ist, alleine von Lysozym herrührt und nicht durch Bestandteile des Kulturmediums

hervorgerufen wird. Durch die Aufkonzentration soll eine noch effektivere Adhäsionsblockade erzielt werden.

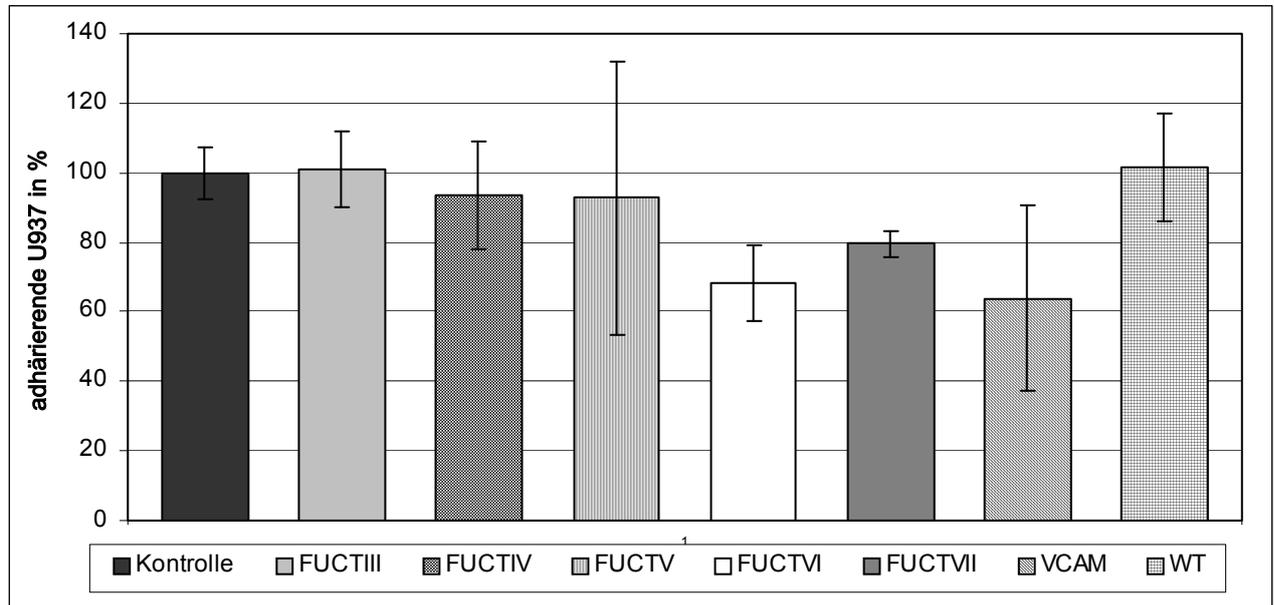


Abbildung 15: Adhäsionsassay nach Immunaffinitätschromatographie

	Adhäsion in %	Adhäsionsblockade in %	p-Wert
Kontrolle	100		
FUCTIII	101,05		0,87
FUCTIV	93,54	6,46	0,44
FUCTV	92,71	7,29	0,72
FUCTVI	68,33	31,67	0,0003
FUCTVII	79,55	20,45	0,0001
VCAM	63,95	36,05	0,02
WT	101,71		0,78

Tabelle 5: Adhäsionshemmung durch aufgereinigtes Überstandmedium aus CHO-FUCTIII-VII-Zellen transfiziert mit hLysII/IV

Wieder sind Mittelwerte von drei Einzelmessungen dargestellt, die Auswertung erfolgte mittels t-Test. Signifikanz besteht bei P-Werten ≥ 0.95 oder ≤ 0.05 .

Die Kontrolle stellt die adhärenen U937 Zellen ohne Vorinkubation mit blockierenden Substanzen dar und wird deshalb gleich 100% gesetzt.

Durch Lysozymmutanten der CHO-FucT VI und VII -Zellen konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Adhäsion von 31,30% bzw von 20,45% erreicht werden (FucT VI $p= 0,003$; FucT VII $p=0,001$). Für die Lysozymmutanten aus CHO-FucT III, IV und V kann mangels Signifikanz keine Aussage getroffen werden.

Mit dem VCAM-1 Antikörper konnte eine Verringerung der Zelladhäsion von 36,05 % erzielt werden, auch sie ist statistisch signifikant ($p= 0,02$).

3.3.4 Adhäsionsassay mit hLysII/IV transfizierten Kolonkarzinomzellen

In einem weiteren Adhäsionsassay wurde untersucht, ob transfizierte Kolonkarzinomzellen in der Lage sind die Bindung von Leukozyten an HUVEC Zellen zu unterbinden. Aus dem Gelingen der Blockade ergibt sich der Rückschluss, dass die Kolonkarzinomzelllinie eine/ mehrere Fukosyltransferasen enthält, welche in der Lage ist sLe^x/ Le^x zu generieren. Die Kolonkarzinomzelllinien SW480, Colo206, Colo678, Cx-1 wurden transient mit dem Plasmid pMCIhLysII/IV transfiziert. Zusätzlich wurde die humane Endothelzelllinie HUVEC mit pMCI/hLysII/V transfiziert. Für den Adhäsionsassay wurden 78 μ l des aufkonzentrierten und ultrafiltrierten Überstandsmediums verwendet. Zur Lysozymkonzentrationsbestimmung wurde ein Lysozymtest nach Osserman und Lawlor durchgeführt.

Zelllinie	Lysozymkonzentration im Ultrafiltrat
SW 480	1 μ g/ml
Colo 206	1 μ g/ml
Colo 678	1 μ g/ml
Cx-1	700 ng/ml
Transfizierte HUVEC	700 ng/ml

Bei den untersuchten Kolonkarzinomzelllinien erreichte die Lysozym-Mutante aus den SW 480 Zellen die effizienteste Blockierung von 32,91%, mit $p=0,001$ besteht Signifikanz, sowie bei Colo 206- Glykoprotein ($p=0,002$), welche die Adhäsion um 26,29% reduziert. Über die restlichen Glykoproteine kann keine Aussage gemacht werden, da keine Signifikanz besteht. Wieder bestand die Kontrolle in einem VCAM-Antikörper, der die U937- Adhäsion signifikant um 41,18% ($p=0,0004$) senkte.

Zelllinie	Adhäsion in Prozent	Adhäsionsblockade in Prozent	p-Wert
Kontrolle	100		
Colo 206	73,71	26,29	0,002
Colo 678	87,22	12,78	0,06
Cx-1	71,78	28,22	0,11
SW 480	67,09	32,91	0,001
transf. HUVEC	88,34	11,66	0,32
VCAM	58,82	41,18	0,0004

Tabelle 6: Adhäsionshemmung durch aufgereinigtes Überstandmedium von verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien transfiziert mit hLysII/IV.

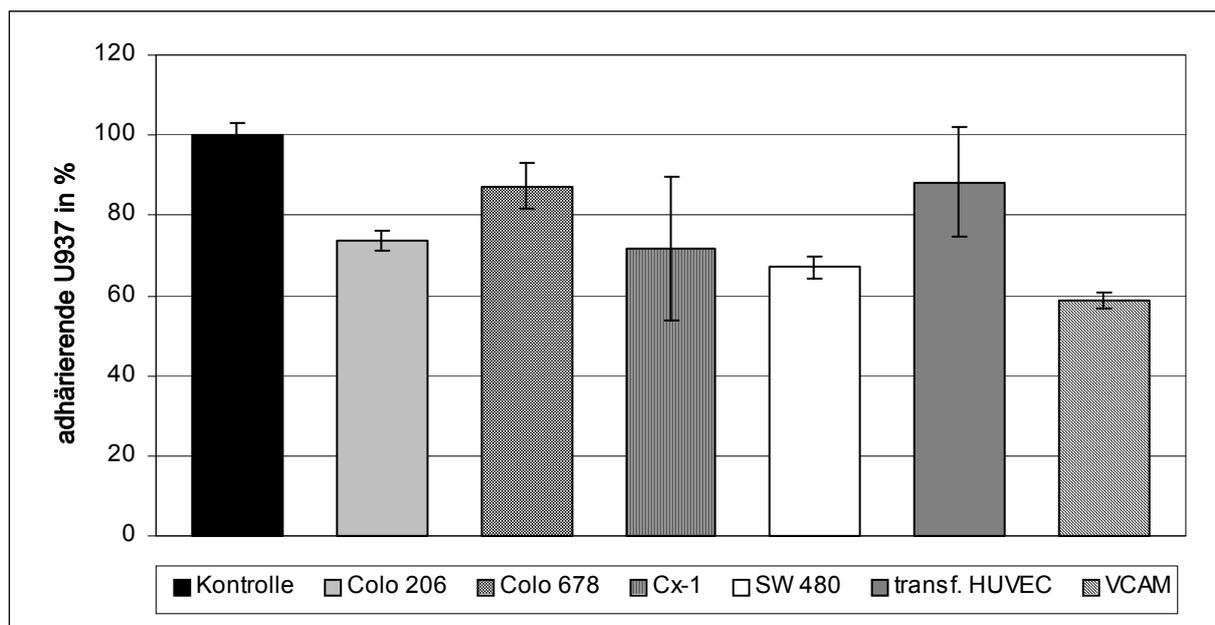


Abbildung 16: ADH mit hLysII/IV transfizierten Kolonkarzinomzellen

3.4 Western blot von hLysII/IV und sLe^x

Durch den Western blot konnten die verschiedenen glykosylierten Formen von hLysII/IV dargestellt werden. Die Bande bei 14,4 kDa zeigt das nicht glykosylierte Lysozym, die mannosereiche Lysozymform stellt sich bei etwa 18,5 kDa dar, des weiteren sind einfach und doppelt glykosylierte Lysozymformen sichtbar. Bei den Banden mit dem Molekulargewicht zwischen 20 und 23 kDa handelt es sich um einfach glykosyliertes Lysozym. Die doppelt glykosylierten Lysozymformen finden sich in der 25- 32 kDa-Bande. Dabei trägt jeweils die unterste Bande keine Laktosamin- Wiederholungen, die oberen Banden tragen immer eine Laktosamineinheit mehr.

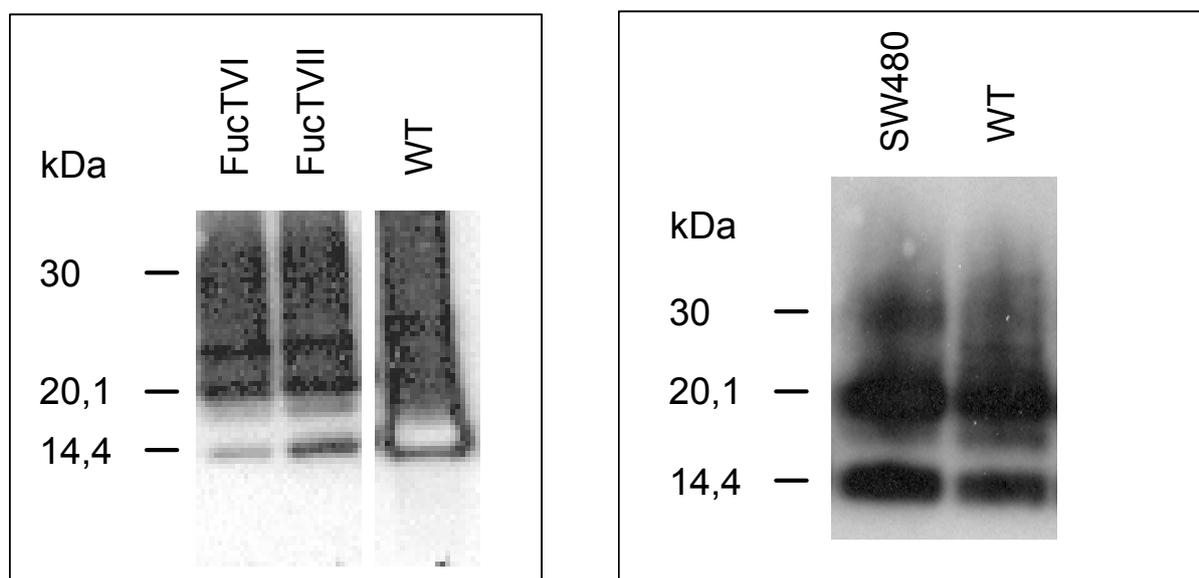


Abbildung 17: Western Blot Darstellung von Lysozym im Mediumüberstand am Beispiel von in CHO-FucTVI und VII transient exprimiertem Lysozym

Ein mit sLe^x- Antikörper durchgeführter Western blot erbrachte leider kein nachweisbares Ergebnis. Für diesen Test wurden dieselben Proben wie für den Lysozym Western blot verwendet.

4. Diskussion

4.1 Überexpression und Aufreinigung von hLysII/IV in CHO-FucTIII-VII-Zellen

Die transiente Transfektion des hLysII/IV-Plasmids in CHO-FucT III-VII- Zellen wurde erfolgreich durchgeführt. Überexprimiertes hLysII/IV-FucTIII-VII konnte durch den auf der Lyse von *Micrococcus luteus* Wandfragmenten basierenden Lysozymtest als auch durch einen Lysozym-ELISA im Medium nachgewiesen werden. Eine Reinigung konnte durch eine Immunaффinitätschromatographie durchgeführt werden und die glykosylierten Lysozymformen im Western-Blot dargestellt werden. Im Durchfluß konnte kein Lysozym mehr nachgewiesen werden und die Lysozymkonzentrationen im aufzureinigendem Medium und im Eluat waren vergleichbar. Die verwendete Immunaффinitätschromatographiesäule (ca. 1ml Säulenmaterial) ist somit für die Aufreinigung kleinerer Mengen Lysozym aus Zellkulturmedium (10ml) gut geeignet. Für die Ultrafiltration wurden Röhrchen mit einer Porengröße von 5000 Da gewählt (Molekülgröße von nicht glykosyliertem Lysozym: 14600 Da). Auffallend war, dass die Lysozymkonzentrationen in den Ultrafiltraten aus CHO-FUCTIII-VII um den Wert 630 ng/ml schwankten, obwohl die Ausgangsmedien unterschiedlich konzentriert waren. Das Überstandsmedium konnte maximal um das vierfache aufkonzentriert werden, es war jedoch nicht möglich eine höhere Lysozymkonzentration als ca. 630 ng/ml zu erlangen. Bei der Aufreinigung und Aufkonzentrierung des Mediums aus Kolonkarzinomzelllinien konnte eine Konzentration bis maximal 1µg/ml erreicht werden. Der Verlust an Lysozym nach Ultrafiltration im Vergleich zum Ausgangsmedium und Eluat der Immunaффinitätschromatographie war jedoch auch bei diesen Zelllinien erheblich. Es scheint eine geringe Bindungskapazität der Ultrafiltrationssäule vorzuliegen. Möglicherweise sind Restproteine nach der Immunaффinitätschromatographie (z.B. Albumin, Antikörper) die Ursache dafür. Für die Aufkonzentrierung des in dieser Arbeit verwendeten Lysozym-Eluates war die Ultrazentrifugationssäule nur unzureichend geeignet und es müssen andere Methoden zur Konzentrierung gefunden werden oder vorher noch weitere Reinigungsschritte durchgeführt werden.

4.2 Adhäsionsversuche mit hLysII/IV-FucTIII-VII

Für den Adhäsionsversuch wurden 380 ng/ml Lysozym aus Überstandsmedium und 47ng/ml aufgereinigtes Lysozym der mit hLysII/IV transfizierten CHO-FucT-III-VII Zellen verwendet. In beiden Versuchen zeigt sich ähnliche Ergebnisse: hLysII/IV-FucTVI ist in der Lage die Adhäsion der Leukozyten an TNF α stimuliertes Endothel signifikant um ca. 30% zu reduzieren ($p= 0,0089$ im Überstandsmedium; $p=0,0003$ nach Aufreinigung). Im Adhäsionsassay mit den FucT III, IV, V, VII Lysozym – Mutanten konnte keine signifikante Selektinblockade erzielt werden (s. Abb. 18).

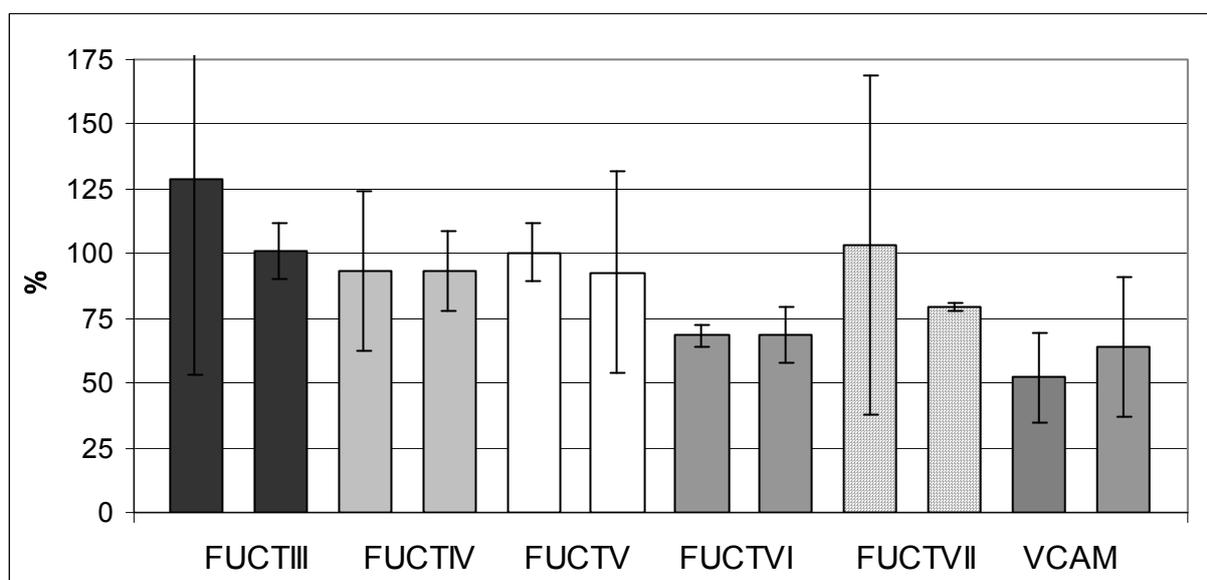


Abbildung 18 Übereinstimmung der Adhäsionsassays

Sowohl mit 47ng/ml als auch mit 380ng/ml konnten etwa gleiche Ergebnisse in der prozentualen Leukozytenblockade (31,6%) erzielt werden. Eine ähnliche Blockade konnte auch mit einem E-Selektin Antikörper erreicht werden (30%; s. Abb. 13). Mehr als 30% Inhibition (+/- Meßungenauigkeit) ist durch eine Blockade der E-Selektin-Rezeptoren offenbar nicht möglich. Da die Wirkung von hLysII/IV-FucTVI wahrscheinlich über E-Selektinblockade vermittelt wird (s.u.) war bereits mit 47ng/ml die komplett mögliche Adhäsionsblockade zu erzielen. Bei einem Molekulargewicht von 14 kDa entspricht 47 ng/ml 3,4nM. Da die einfach und doppelt-glykosylierten Lysozymformen bis 30 kD groß sind, kann von einer kompletten Adhäsionsblockade bei 1,7-3,4 nM ausgegangen werden. Eine Aussage über die Menge hLysII/IV-FucTVI, durch die eine 50%ige Adhäsionsblockade erreicht werden kann (IC50) ist nicht möglich, ist jedoch kleiner als 3,4nM.

4.3 Fucosyltransferase VI und die Bildung von sialyl-Lewis^x (sLe^x)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch transient in CHO-FucTVI überexprimiertes hLysII/IV die Adhäsion von U937-Zellen an aktivierte HUVEC-Zellen sehr effektiv blockiert werden kann. Ursächlich für diese Adhäsionsblockade könnten endständige sLe^x-Zuckerstrukturen an den Polylaktosaminketten von hLysII/IV sein, die mit dem E-Selektinrezeptor der HUVEC-Zellen interagieren. Kraus hat 1999 in ihrer Diplomarbeit die Glykosylierung von transient in CHO-FUCTIII-VII überexprimierten hLysII/IV-Mutanten untersucht. Dabei konnte sie eine Fukosylierung an N-Acetylglukosamin- Resten von glykosyliertem Lysozym durch alle Fukosyltransferasen nachweisen. Die Fukosyltransferase VI scheint dabei Aktivität gegenüber sämtlichen N-Acetylglukosamin-Resten zu zeigen und es besteht eine Sensitivität gegenüber Sialidase. Die Autorin folgert aus ihren Ergebnissen, dass durch die FucTVI sLe^x-Strukturen auf den Polylaktosaminketten gebildet werden können. Das Verhältnis von Le^x zu sLe^x scheint dem von Grabenhorst beschriebenen Verteilungsverhältnis von 1,1: 1 zu entsprechen (Grabenhorst et al.,1999). Durch die Zugabe von hLysII/IV-FucTVI kann erwartungsgemäß die Adhäsion nur in dem Maße blockiert werden, wie es auch durch einen E-Selektin-Antikörper gelingt (ca. 30%). Leider gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die endständigen sLe^x-Strukturen auf hLysII/IV-FucTVI im Western-Blot nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde der sLe^x-Antikörper Klon KM93 verwendet. Ota et al. zeigten 2000, dass sLe^x-Strukturen auf der Oberfläche von Kolonkarzinomzellen teilweise nur von sLe^x-Antikörpern des Klons FH6 dargestellt werden konnten. Weitere Studien müssen durchgeführt werden, um zu überprüfen ob durch diesen Antikörper sLe^x auf hLysII/IV-FucTVI nachgewiesen werden kann.

Hinweise darauf, dass durch FucTVI sLe^x-Strukturen gebildet werden ergaben sich bereits 1992. Koszidin et al fanden heraus, dass durch Transfektion des FucTVI-Genes Säugetierzellen die Fähigkeit erlangten, sLe^x und Le^x an der Oberfläche zu exprimieren. FucT VI katalysiert den Fukose-Transfer von GDP-Fukose auf alpha-2,3 sialylierte Substrate und zeigt damit deutliche Substratspezifität, die z.B. bei FucT IV nicht nachgewiesen werden konnte. Xia et al zeigten 2004, dass nach Behandlung von CD34 positiven humanen Nabelschnurzellen mit GDP-Fukose und exogener alpha1-3 Fukosyltransferase VI die Expression von sLe^x an der Zelloberfläche gesteigert werden konnte. sLe^x wurde dabei mit einem spezifischen monoklonalen sLe^x- Antikörper (HECA-452) in der Flußzytometrie nachgewiesen. Ebenso konnte

eine Zunahme der Bindung dieser Zellen an E- und P- Selektin festgestellt werden. Zwischen fehlendem sLe^x an der Zelloberfläche und dem Unvermögen der CD34 positiven Zellen an E-Selektin zu binden bestand eine starke Korrelation. Mollicone et al zeigten 1994, dass eine bestimmte Nukleotid- Austausch Mutation (missense mutation) im FucT VI Gen verantwortlich ist für eine verminderte Plasmaaktivität der Fukosyltransferase VI, wie sie bei bestimmten Familien aus Java gefunden wurde. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die α 1,3-Fukosyltransferase- Aktivität im Plasma von FucT VI herrührt. Die missense -Mutation im FucT VI- Gen führt zu einem Fehlen des sLe^x- Glykoproteins an der Oberfläche der roten Blutkörperchen, erzeugt aber keine Symptome bei den Betroffenen. Majuri et al erkannten 1994, dass inflammatorische Zytokine wie TNF α die Aktivität der Fukosyltransferase VI in HUVEC Zellen steigern. HUVEC Zellen sind Endothelzellen, die wie oben beschrieben E-Selektin und damit sLe^x an ihrer Oberfläche tragen. Es ist bekannt, dass die E-Selektin Expression durch TNF α erhöht wird. Wird nun auch die FucT VI Aktivität gesteigert, kann man davon ausgehen, dass auch sLe^x vermehrt entsteht. Hinweise für den Bildungsort der Fukosyltransferase VI stammen von Brinkmann-van der Linden. Er stellte fest, dass Zellen mit einer bestimmten missense- Mutation im FucT VI Gen Leberproteine fehlerhaft fukosylieren. Er schließt daraus, dass die Leber der Bildungsort sei. Davon gehen auch Johnson et al aus, die 1995 die Fukosyltransferase VI durch verschiedene Chromatographieverfahren aus der Leber isolierten. Die vorherrschende Präsenz von FucT VI in HepG2-Zellen wurde von Borsig et al 1997 beschrieben. Schnyder-Candrian hingegen beschreibt 2000 die FucT VI als Golgi-assoziiertes Enzym mit Vorkommen in humanen Endothelzellen (HUVEC) und in Weibel-Palade Körperchen. Allerdings konnten außer FucT VI auch alle anderen vier Fukosyltransferasen in HUVEC- Zellen nachgewiesen werden, so dass die Aussagekraft beschränkt ist. Das Vorkommen der FucT VI in Weibel-Palade Körperchen scheint aussagekräftiger zu sein, denn auch P-Selektin ist in Weibel-Körperchen gespeichert. Eventuell besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von FucT VI in Weibel-Palade-Körperchen und der dortigen Bildung von P-Selektin.

4.4 Fukosyltransferasen III, IV, V, VII und die Bildung von sLe^x

Zöllner et al zeigten 1996, dass FucT III eine große Anzahl an Glykoprotein-Liganden bildet, FucT IV und FucT VII jedoch generierten spezifische E-Selektin-Liganden. Maly et al favorisieren ebenfalls FucT VII als Schlüsselenzym bei der E-Selektin - Liganden-Synthese. Bei Untersuchungen an FucT VII defizienten Mäusen wurde eine fehlende Migration der Neutrophilen in entzündetes Gewebe nachgewiesen. Unklarheit besteht darüber, warum bei den FucT VII defizienten Mäusen trotz Fehlen des scheinbaren Schlüsselenzyms eine Selektin-Liganden-Aktivität bestehen bleibt. Weninger stellte 2000 fest, dass in doppelt defizienten Mäusen für FucT IV und VII (FucT IV und VII -/-) das lockere Anheften und Ablösen der Leukozyten an das Endothel („Leukozyten-rolling“) fehlt, in FucT VII defizienten herabgesetzt und in FucT IV-defizienten Mäusen nicht verändert war. Bei den einfach FucT IV und VII-defizienten Tierstämmen war die „rolling“-Geschwindigkeit jeweils erhöht. Er kommt zum Schluß, dass die endothelialen Selektine und die Fukosyltransferasen eine verschiedene aber überlappende Funktion haben. Die Arbeitsgruppe um Homeister führte 2001 ebenfalls Untersuchungen an FucT IV und FucT VII defizienten Mäusen durch und beschrieb ebenfalls eine verminderte Leukozytenadhäsion. 2004 bestätigten Martinez et al die Vermutung, dass humane FucT IV und VII dazu beitragen das L-/ P- und E-Selektin abhängige „rolling“ am Endothel zu regulieren, wobei Fukosyltransferase VII eine dominante Rolle bei der Bindung an PSGL-1 zu spielen scheint. Eine stabile Transfektion von FucT IV/ VI / VII- Genen in Jurkat-Zellen wurden von Knibbs et al durchgeführt. Nur in FucT VII-Zellen zeigt sich eine erhöhte Synthese von E-Selektin-Ligand auf der Zelloberfläche. Hauptsächlich Fukosyltransferase VII scheint die E-Selektin-Liganden- Synthese in humanen T-Lymphoblasten zu regulieren. Guo et al. beschrieben 2003 das Vorkommen von sLe^x in humanen hepatozellulären Ca-Zellen (H7721) und untersuchte die Expression der alpha-1,3-FucT mit real- time PCR. Er kommt zum Schluss, dass FucT IV das Hauptenzym für die Synthese von sLe^x zu sein scheint. Die Expression der mRNA FucT IV war am höchsten, nachfolgend von FucT III und FucT VI. Kudo et al konnten 1998 keine Fukosyltransferase als Schlüsselenzym ausmachen, die für die erhöhte Expression des sLe^x- Antigens in kolorektalen Tumorzellen verantwortlich war.

4.5 Rekombinante hLysII/IV-Mutanten aus Kolonkarzinomzellen

Im Rahmen weiterer Versuch wurden Kolonkarzinomzellen der Zelllinien SW480, Cx-1, Colo 206 und Colo 678 und die Endothelzelllinie HUVEC erfolgreich mit hLysII/IV transfiziert. Nach Majuri et al (1994) exprimieren HUVEC Zellen sLe^x und besitzen sowohl mRNA als auch Enzymaktivität von verschiedenen α 2,3- Sialyltransferasen und α 1,3- Fukosyltransferasen. TNF α Stimulation kann das Level der mRNA Expression von FucT VI erhöhen, ebenso wie die α 1,3 FucT Aktivität in HUVEC. Demnach müsste das rekombinante Glykoprotein auch sLe^x an den Seitenketten tragen. Der Adhäsionsversuch mit aufgereinigtem hLysII/IV aus dem Überstandsmedium von transfizierten HUVEC ergab jedoch eine statistisch nicht signifikante Adhäsionsblockade von 11,66% (p=0,325). Durch das transient in SW480 und Colo206 exprimierte hLysII/IV konnte eine signifikante Adhäsionsblockade von 32,91% und 26,29% erreicht werden (p= 0.0020; p= 0.0011). Mit Cx-1 und Colo 678- Lysozymmutanten konnte die Adhäsion um 28,22% bzw. 12,78% reduziert werden, die statistische Signifikanz war jedoch nicht gegeben.

Verschiedene Fukosyltransferasen konnten bereits in Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden: Kanoh et al untersuchten 2003 eine mit alpha1,3 Fukosyltransferase VI cDNA transfizierte Kolonkarzinomzelllinie (KM12-LX). Bei der Transfektion entstanden zwei verschiedene Zellklone, die sich anhand der mRNA-Expressionsrate unterschieden. Der Zellklon mit einer hohen Expressionsrate von FucT VI- mRNA hatte eine hohes Bindungsvermögen an E-Selektin exprimierende CHO-Zellen. Die Zellen dieses Zellklons wurden von den beiden monoklonalen sLe^x-Antikörpern FH6 und KM93 erkannt und waren resistent gegenüber Endo- β -Galaktosidase. Die Zellen des Zellklons mit mittelmäßiger Expressionsrate von FucT VI mRNA wurden hingegen lediglich von dem FH6 Antikörper erkannt. Nach der Behandlung mit Endo- β -Galaktosidase konnte dies nicht mehr nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass FH6 ein nicht spezifischer sLe^x- Antikörper ist, KM93 scheint dagegen das Tetrasaccharid spezifisch zu binden. Die Schlussfolgerung ist, dass die FucT VI-Zellen mit mittelmäßiger Expression kein sialyl Lewis x an der Zelloberfläche besitzen, die FucT VI-Zellen mit hoher FucT VI Expression jedoch schon. Kanoh schließt aus diesen Ergebnissen, dass das Ausmaß der Expression von FucT VI verantwortlich ist für die Ausbildung von zwei verschiedenen Oberflächenglykanen. Eine einzige Fukosyltransferase (FucT VI) scheint in der Lage zu sein, die strukturellen Eigenschaften des Oberflächenglykans zu bestimmen.

Hiller et al berichteten 2000 über die Hemmung der sialyl Lewis x/a Synthese und der Kolonkarzinomzellproliferation durch stabile Transfektion einer antisense Sequenz der humanen alpha-1,3-Fukosyltransferase III und VI -Gene in Colo 205 Zellen. Normale Colo 205 Zellen besitzen sLe^x und eine hohe alpha1,3-Fukosyltransferase-Aktivität. Die antisense Transfektanten besaßen hingegen kein sLe^x, FucT III- und VI Transkripte konnten nicht nachgewiesen werden.

Chandrasekaran et al hoben 2003 die große Ähnlichkeit der Kolonkarzinom-Fukosyltransferase zur Fukosyltransferase VI hervor. Diese entsprechen einander bezüglich der Substratspezifität. Möglicherweise gilt die FucT VI in Zukunft als Tumormarker für Kolonkarzinome oder sie kann bei deutlicher Erhöhung auf einen Tumor hindeuten.

Mas et al untersuchten 1998 die Expression und Funktion von sieben Fukosyltransferasen (FucT I- VII) in gesundem Pankreasgewebe sowie in Pankreastumorgewebe. Mittels RT-PCR konnten Transkripte aller Fukosyltransferasen sowohl in gesundem als auch in malignem Gewebe nachgewiesen werden. Nur FucT VI fand sich ausschließlich in Pankreastumorgewebe. Möglicherweise kann auch hier das Vorkommen der Fukosyltransferase VI als Tumorfaktor gewertet werden.

Wittig et al beschrieb 1996 das Vorhandensein von FucT IV und VII in 16 untersuchten Zelllinien. Auch das Vorkommen von sialyl Lewis x auf verschiedenen Karzinomzellen konnte dokumentiert werden (Nemoto et al.,1998). Jedoch haben nicht alle Kohlenhydratstrukturen, die als sLe^x Antigen bezeichnet werden, die Funktion eines E-Selektin-Liganden.

Mannori et al. beschrieben 1997 die Bindung von LS180, T84 und Colo205 an alle drei Selektine. Die Kolonkarzinomzelllinie Colo 320 band an P- und L- Selektin, nicht aber an E-Selektin; HT-29 nur an E-Selektinrezeptoren.

Nicht nur sLe^x spielt eine Rolle bei der Metastasierung, nach Takada (1993) vermittelt sLe^x die Adhäsion von Tumorzellen aus Lunge, Leber und Ovar an das Endothel, während sLe^a an der Bindung von Kolon-, Pankreas- und Magenkarzinomzellen beteiligt ist.

Yago et al. analysierte Transkripte der Fukosyltransferasen in humanen epithelialen Tumorzelllinien und Leukämiezelllinien mit Northern Blot. In 14 von 15 epithelialen Tumorzelllinien und in allen Leukämiezelllinien wurde sLe^x nachgewiesen, sLe^a in acht epithelialen, aber keiner Leukämie-Zelllinie. Transkripte von FucT III, IV und VI

zeigten sich in fast allen epithelialen Tumorzellen, während die Leukämiezellen hauptsächlich FucT IV Transkripte besaßen. Dieser Studien nach, scheinen verschiedene Fukosyltransferasen an der Synthese von sLe^x/ sLe^a beteiligt zu sein und die alpha-1,3 Fukosyltransferase- Aktivität in epithelialen Tumor- und Leukämie-Zelllinien durch eine Mischung verschiedener FucT begründet zu sein.

Die Erkenntnisse aus der Literatur weisen darauf hin, dass Kolonkarzinomzellen Fukosyltransferasen besitzen und eine Bildung von sialyl Lewis ^{x/a} stattfindet.

Das Ergebnis dieser Arbeit ist, dass alle rekombinanten Glykoproteine in der Lage sind -unterschiedlich stark- die Adhäsion von U937 Zellen an HUVEC Zellen zu blockieren. Jedoch kann keine Aussage gemacht werden, welche der fünf Fukosyltransferasen in den Kolonkarzinomzellen vorhanden ist und bei der vermuteten Generierung von sLe^x beteiligt ist. Dieses Adhäsionsmodell eignet sich auch nicht zur Klärung der Frage, welcher der drei Selektinrezeptoren durch die Lysozymmutanten besetzt wird.

4.6 Möglichkeiten der E-Selektin Blockade

Die Unterbindung der sLe^x -Selektin Adhäsion stellt eine attraktive Möglichkeit dar entzündungsvermittelte Krankheiten, Metastasierung und Entwicklung der Arteriosklerose zu kontrollieren. Die Herausforderung ein Substrat zu entwickeln, welches die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand blockiert ist groß. Es bestehen verschiedene Forschungsansätze und mögliche Therapeutika wurden bereits hergestellt: E-Selektin Antikörper (Bargatze et al.,1994), lösliches E-Selektin (Ulich et al.,1994), Selektin-Ig Chimere (Mulligan et al.,1993), an Oligosaccharide gebundenes sLe^x/sLe^a (Mulligan et al.,1993), molekulare Analoga von sLe^x (Rao et al.,1994), sialyl Lewis x- Glykoliposomen (Zeisig et al.,2003) und rekombinante Glykoproteine (Rittershaus et al.,1999). Bisher konnte aber kein Substrat tatsächlich als Medikament eingesetzt werden, da große Nachteile zu verzeichnen waren. Diese bestanden zum Beispiel in schweren Nebenwirkungen, hohen Kosten, kurzer Halbwertszeit in vivo oder Immunogenität. Das kleine sLe^x- Oligosaccharid an sich eignet sich nicht als Präparat, da die Bindung zwischen Selektinen und monovalentem sLe^x sehr schwach ist. Schon bald wurden sLe^x- Analoga entwickelt, die eine höhere Affinität zu Selektinen besitzen (Kaila et al., 2003). Slee et al. beschäftigten sich 2001 mit der Herstellung eines niedrig molekulargewichtigen

Selektininhibitors, bei dem die Zuckermoleküle des sLe^x durch andere Strukturen ersetzt wurden. Dadurch soll die Affinität erhöht werden und eine orale Applikation erreicht werden. Das von Aydt et al. 2003 erzeugte sLe^x Analogon TBC1269, ein mannosyliertes Diphenyldimer mit einem Molekulargewicht von 1000 Da befindet sich im Moment in einer Phase II Studie für die Behandlung von Asthma und Psoriasis ([www. revotar.de/](http://www.revotar.de/)). Nicht- Kohlenhydrat Strukturen wie OC229648 (Romano et al., 2001) und Efomycine M (Schon et al., 2002) imitieren die räumliche Struktur von sLe^x. Diese Medikamente befinden sich in präklinischen Studien. Im Tiermodell konnte bereits eine reduzierte Leukozytenadhäsion nachgewiesen werden. Gute Effekte zeigte Efomycine M in experimentellen Studien auf Psoriasis. Monoklonale E-Selektin Antikörper zeigten keinen therapeutischen Effekt bei Psoriasis (Bhushan et al., 2002). Bargatze et al. charakterisierten einen monoklonalen Antikörper (EL-246), der ein gemeinsames Epitop an der Oberfläche von E- und L- Selektinen erkennt. Das Lymphozyten „rolling“ auf aktivierten HUVEC konnte durch Infusionen mit EL-246 reduziert werden. Am Mausmodell wurde die Lymphozytenwanderung zu peripheren Lymphknoten durch eine Vorbehandlung der Lymphozyten mit EL-246 um 65% herabgesetzt. EL-246 scheint ein potenter pharmakologischer Inhibitor der Leukozyten- Endothelzell Interaktion zu sein, die durch E- oder L- Selektine vermittelt ist. Der Nachteil besteht in einer kurzen Halbwertszeit des zirkulierenden Antikörpers. Generell besteht die Gefahr bei Verabreichung eines Antikörpers von der Maus eine Immunreaktion auszulösen. Ulich et al machten 1994 Vergleichsstudien mit E-Selektin Antikörper und löslichem E-Selektin an Rattenlungen. LPS induziert die pulmonare E-Selektin mRNA Expression. Eine Inhibition der Auswanderung von Neutrophilen in den bronchioalveolären Raum konnte sowohl mit E-Selektin AK als auch mit löslichem E-Selektin erreicht werden. Die Antikörper müssen allerdings in großen Mengen zugeführt werden, da er schnell abgebaut wird. Mulligan et al arbeiteten mit rekombinanten Selektin- Ig Chimeren und untersuchte deren Fähigkeit zum Schutz vor Neutrophilen- induzierter Lungenentzündung, welche durch IgG Immunkomplexe verursacht wurde. Er stellte fest, dass die akute entzündliche Lungenentzündung durch L-und E-Selektine vermittelt wird und durch Gabe von E- /L-Selektin-Ig Chimeren gebessert werden kann. Es zeigten sich Veränderungen der Permeabilität und Blutung. Die Herstellung scheint aber sehr aufwendig und teuer zu sein.

Eine weitere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Suche nach sLe^x- Analoga. Rao et al fanden das Glykosid Glycyrrhizin, welches die Selektin Bindung an sLe^x blockiert. Nach Substitution der Glucuronsäure durch C-Fukose entstand ein dem ursprünglichen sLe^x Pharmacophoren sehr ähnliches Glycyrrhizin- Derivat. Dieses Derivat ist ein effektiver Selektinblocker mit antiinflammatorischer Wirkung. Jedoch besteht eine niedrige Affinität zum Selektinrezeptor und Kreuzreaktionen zwischen den drei Selektinen wurden beobachtet.

Zeisig et al. beschrieben 2003 die verminderte Tumorzelladhäsion an E-Selektin tragende Zellen durch sterisch stabilisierte Liposomen, die den s-Le^x Liganden am Ende einer PEG- Seitenkette trugen (sLe^x-PEG-Liposom E). Die Adhäsion von HT29 Kolon- und Lewis lung (LL) Karzinomzellen wurde um circa 60-80% vermindert.

Der Vorteil der Liposomen besteht in der besonders hohen Flexibilität. Dies ermöglicht den Liganden an der Oberfläche von Liposomen Cluster auszubilden, und es können multivalente Interaktionen stattfinden.

Die Tatsache, dass sich E-Selektin auf aktivierten Endothelzellen befindet wird in den Untersuchungen von Everts et al. (2003) ausgenutzt. Er verwendet E-Selektin gekoppelte Antikörper als carrier-Molekül, um anti-inflammatorisch wirkende Medikamente (Dexamethason) selektiv in aktivierte Endothelzellen einzuschleusen. Langzeitstudien müssen noch abgewartet werden, bevor die Effektivität beurteilt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit Entzündungsvorgänge zu beeinflussen besteht in der Blockierung des Komplementsystems.

Rittershaus et al verwenden 1999 den löslichen Komplementrezeptor Typ 1 (sCR1) als Proteingrundgerüst. Er wird in CHO-FucT Zellen exprimiert. Dies macht die Biosynthese des sialyl Lewis x Tetrasaccharids während der posttranslationalen Glykosylierung möglich. Es entsteht das Glykoprotein sCR1-sLex, welches zur Unterbrechung der Komplementkaskade führt. Außerdem wurde sCR1[desLHR-A] hergestellt, es handelt sich um eine Version von sCR1, dem die C4b Bindungsstelle fehlt. Es ist ein selektiver Inhibitor des alternativen Komplementweges (Scesney et al., 1996). Diese rekombinanten Glykoproteine sollen die Komplementaktivierung und die Selektin- vermittelten Zellinteraktionen verhindern. Im statischen Bindungsassay fungieren die sLe^x tragenden Glykoproteine als Selektinliganden und blockieren damit die E-Selektin vermittelte Adhäsion. Am Rattenmodell für Lungenverletzungen konnte Mulligan eine verminderte Neutrophilenanhäufung und

Albuminextravasation feststellen (Mulligan et al., 1999). Vorteile dieses sCR1 Proteins bieten die 25 möglichen Glykosylierungsstellen für N-glykosidisch gebundene Zucker. Theoretisch könnte an 25 Stellen sLe^x entstehen, wodurch sich die Bindungsmöglichkeit enorm erhöht. Die Auswertung dieser Experimente zeigt aber, dass das Tetrasaccharid sLe^x nur an 13-15 der möglichen 25 Glykosylierungsstellen des Polypeptids CR1 entstand.

Um eine effizientere Glykosylierung zu erreichen berichteten Thomas et al 2000 aus derselben Arbeitsgruppe über ein Verfahren mit in vitro Glykosylierung die sLe^x-Struktur auf alle N-Glykane des sCR1 zu übertragen. Das CR1 Glykoprotein wird in CHO-Wildtyp-Zellen produziert und durch α 1,3-Fukosyltransferase VI und α 2,3 Sialyltransferase ST3Gal-III modifiziert. Dadurch konnte im Adhäsionsassay eine zehnfach höhere Affinität zu E-Selektin erreicht werden und eine doppelt so hohe Menge an sLe^x pro Mol Glykoprotein wurde erzielt.

4.7 E-Selektin-Blockade durch hLysII/IV-FUCTVI

Obwohl die mittlere Hemmkonzentration (IC₅₀) von hLysII/IV-FUCTVI im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass sie unter 3,4nM liegt. Dies würde eine bisher noch nie erreichte Spezifität bedeuten. Die bisher zur Verfügung stehenden Inhibitoren haben eine IC₅₀ im mikromolaren Bereich. Ursächlich dafür könnte eine optimale Anordnung der endständigen sLex-Liganden im Trägermolekül Lysozym sein. Um genaue Informationen über die 3D-Struktur von hLysII/IV-FUCTVI zu erlangen müsste eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden. Bislang steht hLysII/IV-FUCTVI dafür nicht im ausreichendem Maße zur Verfügung. Ein zusätzlicher Vorteil von Lysozym als Trägerprotein von sialyl- Lewis^x sind potentielle antineoplastische Eigenschaften. Dies ließ sich in Tierversuchen nachweisen. In mehreren Studien wurde eine Reduktion der Tumorgröße festgestellt, so zum Beispiel bei Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom (Sava et al., 1989).

Das rekombinante Glykoprotein (hLysII/IV-FucTIII-VII) hat ein Molekulargewicht bis 35 kDa und ist damit um ein Vielfaches größer als das Tetrasaccharid sLe^x. Niedermolekulare Substanzen (< 30 kDa) werden frei aus dem Glomerulum filtriert. Sialyl-Lewis^x kann die Kapillarschlingen unbehindert passieren und wird aus dem Blutkreislauf eliminiert. Stoffe mit höherem Molekulargewicht werden beim Durchtritt

behindert. In der dreischichtigen Basalmembran werden Teilchen mit einem Molekulargewicht von ~ 200 kDa reflektiert. Die Schlitzporen der Podozyten halten Stoffe von > 65 kDa zurück. Die Basalmembran und die Schlitzporen sind reich an sialinsäurehaltigen Proteoglykanen und Glykoproteinen. Diese negativen Wandladungen bedingen, dass polyanionische Makromoleküle die Wand weniger gut passieren können. Dies trifft für das rekombinante Glykoprotein zu. Der Siebkoeffizient ($[x]_{\text{Filtrat}} / [x]_{\text{Plasma}}$) beträgt für Myoglobin mit dem Molekulargewicht von 17 kDa 0,75, für Eialbumin mit dem Molekulargewicht von 43,5 kDa 0,22. Bei einem 35 kDa schweren Molekül schätzt man einen Siebkoeffizienten von 0,4. Für die Berechnung der Siebkoeffizienten werden allerdings zusätzlich die Daten des Molekülradius und Molekülgröße benötigt (Schmidt, 1997), die hier nicht vorliegen. Lysozym hat eine Halbwertszeit im Körperkreislauf von vier Stunden, schon 20 Minuten nach Injektion wird es in der Niere aufgenommen (Haas et al., 1997). Für eine verbesserte Retention des Lysozym im Körperkreislauf könnte in Zukunft ein Plasmid hergestellt werden, welches die cDNA für glykosyliertes Lysozym mehrmals enthält. Dadurch entsteht ein (Fusions-) Glykoprotein mit erhöhtem Molekulargewicht. Dieses höhere Molekulargewicht verhindert eine glomeruläre Filtration und verbleibt länger im Körper. Zusätzlich würde die Anzahl der möglichen Glykosylierungsstellen vergrößert und die Möglichkeit der sLe^x Entstehung erhöht. Ein weiterer Vorzug des Lysozym ist, dass es sich um ein körpereigenes Protein handelt und deshalb keine oder nur eine geringere Immunreaktion hervorruft. Die Herstellung ist einfach, es bedarf keiner aufwendigen Geräte. Das Glykoprotein kann auch in großer Menge durch einfache Zellkultivierung hergestellt werden.

Wegen Nebenwirkungen von Lysozym auf den Blutdruck untersuchte Haverdings et al. die optimale Verabreichung von Lysozym. Nach Bolusinjektion wurde ein beträchtlicher tubulärer Lysozymverlust im Urin und kardiovaskuläre Nebenwirkungen festgestellt. Es bietet sich eine kontinuierliche i.v. Lysozymgabe an, bei der nur eine geringe Blutdrucksteigerung zu bemerken war.

4.8 Ausblick

Um das Glykoprotein FucTVI-hLysII/IV in größeren Mengen herstellen zu können muß noch eine stabile Transfektion des hLysII/IV-Plasmids in CHO-FUVTVI-Zellen erfolgen. Die Kolonkarzinomzelllinien Colo206 und SW480 sollten ebenfalls stabil transfiziert werden. Es werden Zelllinien entstehen, die dauerhaft das gewünschte Glykoprotein produzieren. Der Nachweis von sLe^x-Strukturen kann durch die Anwendung weiterer Antikörper im Western-Blot und/oder nach radioaktiver Markierung, z.B. mit ³⁵S noch erfolgreich durchgeführt werden. Die genaue Analyse der Zuckerketten der beider Glykosylierungsstellen sollte jedoch noch erfolgen, z.B. mittels MALDI-TOF. Die IC₅₀ von hLysII/IV-FUCTVI muß ermittelt werden. Dazu kann es sinnvoll sein CHO-E-Selektin-Zellen für den Adhäsionsversuch zu verwenden, da mit E-Selektininhibitoren nur eine 30%ige Adhäsionsblockade in HUVEC zu erreichen ist. Zusätzlich kann ein Versuch mit einer „Flußkammer“ erfolgen, bei der die Hemmkapazität von hLysII/IV-FUVTVI, -SW480 und -Colo206 im Blutfluß simuliert werden kann. Nach erfolgreicher Durchführung dieser Versuche kann die antiinflammatorische und antimetastatische Potenz im Tierversuch weiter analysiert werden

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch transiente Transfektion fünf rekombinante Glykoproteine (hLysII/IV-FUCTIII-VII) überexprimiert und aufgereinigt. Durch hLysII/IV-FUCTVI konnte die Zelladhäsion von U937 an HUVEC-Zellen signifikant gehemmt werden. Die Wirkung wird wahrscheinlich durch eine Interaktion zwischen dem sLe^x-Antigen und dem E-Selektin-Rezeptor vermittelt. Die Fucosyltransferase VI ermöglicht die Bildung von endständigen sLe^x-Antigenen an den Polylaktosaminseitenketten von hLysII/IV. Die Interaktion von hLysII/IV-FUCTVI und E-Selektin ist hochspezifisch. Bereits in einer Konzentration von 3,4nM ist eine komplette Blockade der E-Selektin Rezeptoren erreicht. Die bisher zur Verfügung stehenden E-Selektin-Inhibitoren müssen in mikromolarem Maßstab eingesetzt werden. Auch durch eine Transfektion der Kolonkarzinomzelllinien SW480 und Colo206 konnten Lysozymmutanten hergestellt werden, mit denen eine signifikante Adhäsionsblockade möglich ist. Die Spezifität war dabei ähnlich gut wie bei hLysII/IV-FUCTVI. Man kann sich hLysII/IV-FUCTVI, -SW480 und Colo206 als potentielle therapeutische Substanzen vorstellen, die zum Beispiel zur Entzündungs- oder Metastasierungshemmung eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Atkinson B, Ernst CS, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF, Koprowski H (1982)** Gastrointestinal cancer associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res*; 42: 4820-4823.
- Aydt E, Wolf G (2003)** Development of synthetic pan-selectin antagonists: a new treatment strategy for chronic inflammation in asthma. *Pathobiol* 70: 297-301.
- Bargatze RF, Kurk S, Watts G, Kishimoto TK, Speer CA, Jutila MA (1994)** In vivo and in vitro functional examination of a conserved epitope of L- and E-selectin crucial for leukocyte-endothelial cell interactions. *J Immunol* 152: 5814-25.
- Bavilacqua MP, Nelson RM (1993)** Selectins. *J Clin Invest* 91: 379-387.
- Bavilaqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA (1987)** Identification of an inducible endothelial- leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad* 24; 928-9242.
- Bhushan M, Bleiker TO, Ballsdon AE, Allen MH, Sopwith M, Robinson MK, Clarke C, Weller RP, Graham-Brown RA, Keefe M, Barker JN, Griffiths CE (2002)** Anti-E-Selectin is ineffective in the treatment of psoriasis: a randomised trial. *Br J Dermatol* 146: 824-831.
- Borsig L, Katopodis AG, Bowen BR, Berger EG (1997)** Trafficking and localisation studies of recombinant α 1,3- fucosyltransferase VI stably expressed in CHO cells. *Glycobiol* 8: 259-268.
- Boufanti R, Furie BC, Wagner DD (1989)** PADGEM (GMP 140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73: 1109-1112.
- Brinkmann -van der Linden CM, Mollicone R, Oriol R, Larson G, van den Eijnden DH, van Dijk W (1996)** A missense mutation in the FUT6 gene results in total absence of α 3-fucosylation of human α ₁-acid glycoprotein. *J Biol Chem* 271: 14492-14495.
- Carlsson SR, Rotz J, Piller F, Fukuda M (1988)** Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *J Biol Chem* 263: 18911-18919.
- Chandrasekaran EV, Chawda R, Rhodes JM, Locke RD, Piskorz CF, Matta KL (2003)** The binding characteristics of Aleuria aurantia, Lens Culinaris and few other lectins in elucidation of fukosyltransferase activities resembling cloned FT VI and apparently unique to colon cancer cells. *Carb Res* 338: 887-901.
- Etzioni A, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips M, Paulson J C, Gershoni- Baruch R (1992)** Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med* 327: 1789-1792.
- Everts M, Asgeirdottir SA, Kok RJ, Twisk J, de Vries B, Lubberts E, Bos EJ, Werner N, Meijer DK, Molema G (2003)** Comparison of E-Selectinexpression at mRNA and protein levels in murine models of inflammation. *Inflamm Res* 52: 512-518.
- Falk KE, Karlsson KA, Larson G, Thurin J, Bluszcz M, Steplewski Z, Koprowski H (1983)** Mass spectrometry of a human tumor glycolipid antigen being defined by mouse monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 110: 383-391.
- Fassbender K, Mossner R, Motsch L, Kischka U, Grau A, Hennerici M (1995)** Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke* 26: 1361-1364.

- Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie Ch, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK (1992)** The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis x oligosaccharide. *J Cell Biol* 117: 895-902.
- Fukuda M und Hindsgaul O (1994)** *Frontiers in Molecular Biology: molekular Glycobiology*. IRL PRESS, Oxford University Press.
- Fukuda M, Dell A, Oates J E, Fukuda M N (1984)** Structure of branches lactosaminoglycan, the carbohydrate moiety of band 3 isolated from adult human erythrocytes. *J Biol Chem* 259: 8260-8273.
- Galan MC, Venot AP, Phillips RS, Boons GS (2004)** The design and synthesis of a selective inhibitor of fucosyltransferase VI. *Org.Biomol. Chem*,2: 1376-1280.
- Goelz S, Kumar R, Potvin B, Sundaram S, Brickelmaier M, Stanley P (1994)** Differential expression of an E-selectin ligand (sLe^x) by two Chinese hamster ovary cell lines transfected with the same alpha (1,3)-fucosyltransferase gene (ELFT). *J Biol Chem*. 269: 1033-40.
- Grabenhorst E, Nimtz M, Costa J, Conradt HS (1998)** In vivo specificity of human α 1,3/4-fucosyltransferases III-VII in the biosynthesis of Lewis x and sialyl Lewis x motifs on complexe-type N-glycans *J Biol Chem* 273: 30985-30994.
- Guo P, Zhang Y, Zhang XY, Chen HL, Zhang Y, Wang H, Narimatsu H (2003)** Analysis of lewis antigens on cell surface and α -1,3-Fukosyltransfrase subtypes in H7721 human hepatocarcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 22: 135-139.
- Haas M, Kluppel AC, Wartna ES, Moolenaar F, Meijer DK, de Jong PE, de Zeeuw D (1997)** Drug-targeting to the kidney: renal delivery and degradation of naproxen-Lysozyme conjugate in ivo. *Kidney Int* 52: 1693-9.
- Haas M. Moolenaar F, Meijer DK, de Zeeuw D (2002)** Specific drug delivery to the kidney. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 16: 4889-496.
- Haverdings RF, Haas M, Greupink AR, de Vries PA, de Zeeuw D, Meijer DK (2001)** Potentials and limitations of the low-molecular-weight proteins lysozyme as a carrier for renal drug targeting, *Ren Fail* 23: 397-409.
- Hemmerich S, Leffler H, Rosen SD (1995)** Structure of the O-glycans in GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin. *J Biol Chem* 270: 12035-12047.
- Hiller KM, Mayben JP, Bendt KM, Manousos GA, Senger K, Cameron HS, Weston BW. (2000)** Transfection of α (1,3)fucosyltransferase antisense sequence impairs proliferative and tumorigenic ability of human colon carcinoma cells. *Mol. Carcinogenesis* 27: 280-288.
- Hiroshi S, Osborn L, Goff D, Chi-Rosso G, Vassallo C, Pasek M (1980)** Anticancer pharmaceuticals containing lysozyme. *Jpn kokai tokkia Koko. Patant* 80.33,409 (Cl. A61K37/54), *Appl.*78/104, 846.
- HomeisterJ, Thall A, Petryniak B, Maly P, Rogers C E, Smith PL, Kelly RJ, Gersten KM, Askari SW, Cheng G, Smithson G, Marks RM, Misra AK, Hindsgaul O, von Andrian UH, Lowe JB. (2001)** The α (1,3) fucosyltrasnferases FucT-IV and FucT- VII exert collaborative control over selectin-dependent leukocyte recruitment and lymphocyte homing. *Immunity* 15: 115-126.
- Isozaki H, Ohyama T, Mabuchi H (1998)** Expression of cell adhesion molecule CD44 and sialyl Lewis A in gastric carcinoma and colorectal carcinomain association with hepatic metastasis. *Int J Oncol*; 13: 935-942.

- Iwai K, Ishikura H, Kaji M, Sugiura H, Ishizu A, Takahashi C, Kato H, Tanabe T, Yoshiki T (1993)** Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium *Int J Cancer* 54: 972-7.
- Jakobsen PH, Morrisjones S, Hviid L, Theander TG, Elhassan IM, Bygbjerg IC, Greenwood BM, Ronn A (1995)** Increased plasma concentrations of sICAM-1, sVCAM-1 and sELAM-1 in patients with *Plasmodium falciparum* or *P. vivax* malaria and association with disease severity. *Immunol.* 83: 665-669.
- Johnson PH, Donald AS, Clarke JL, Watkins WM (1995)** Purification, properties and possible gene assignment of an alpha 1,3-fucosyltransferase expressed in human liver. *Glycoconj J* 12: 879-893.
- Kaila N, Thomas BE (2002)** Design and synthesis of sialyl Lewis(x) mimics as E- and P-selectin inhibitors. *Med Res Rev* 22: 566-601.
- Kanoh A, Ota M, Narimatsu H, Irimura T (2003)** Expression levels of FUT6 gene transfected into human colon carcinoma cells switch two sialyl-Lewis x related carbohydrate antigens with distinct properties in cell adhesion. *Biochem and Biophys Res Comm* 303: 896-901.
- Kim DS, Lee KY (1994)** Serum soluble E-selectin levels in Kawasaki Disease. *Scand J Rheumatol* 23: 283-286.
- Kimura H, Shinya N, Nishihara S, Kaneko M, Irimura T, Narimatsu H (1997)** Distinct substrate specificities of five human α -1,3-fucosyltransferases for in vivo synthesis of the sialyl lewisX and lewisX epitopes. *Biochem Biophys Res Comm* 237: 131-137.
- Knibbs RN, Craig RA, Natsuka S, Chang A, Cameron M, Lowe JB, Stoolman LM (1996)** The fucosyltransferase FucT-VII regulates E-selectin ligand synthesis in human T cells. *J Cell Biol* 133: 911-20.
- Kobayashi T, Hashimoto S, Imai K, Amemiya E, Yachi M, Yachi A, Horie T (1994)** Elevation of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and sE-selectin levels in bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 96: 110-115.
- Koszidin KL, Bowen BR (1992)** The cloning expression of a human alpha-1,3 fucosyltransferase capable of forming the E-selectin ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 152-157.
- Kraus I (1999)** Biosynthese von fukosylierten Poly-laktosaminen an glykosyliertem Lysozym. Diplomarbeit.
- Kudo T, Ikehara Y, Togayachi A, Morozumi K, Watanabe M, Nakamura M, Nishihara S, Narimatsu H (1998)** Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. *Lab Invest* 78: 797-811.
- Kurz RW, Graf B, Gremmel F, Wurnig C, Stockenhuber F (1994)** Increased serum concentrations of adhesion molecules after coronary angioplasty. *Clin Sci* 87: 627-633.
- Lang, Florian (1990)** Pathophysiologie, Pathobiochemie. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 47-50.
- Lee N, Wang WC, Fukuda M (1990)** Granulocytic differentiation of HL-60 cells is associated with increase of poly-N-acetyllactosamine in Asn-linked oligosaccharide attached to human lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 265: 20476-20483.
- Majuri ML, Mattila P, Renkonen R (1992)** Recombinant E-selectin-protein mediates tumor cell adhesion via sialyl-Le^a and sialyl Le^x. *Biochem Biophys Res Commun.*; 182: 1376-1382.

- Majuri ML, Pinola M, Niemela R, Tiisala S, Natunen J, Renkonen O, Renkonen R (1994)** Alpha 2,3-sialyl and alpha 1,3-fucosyltransferase-dependent synthesis of sialyl Lewis x, an essential oligosaccharide present on L-selectin counterreceptors, in cultured endothelial cells. *Eur J Immunol* 12 : 3205-10.
- Maly P, Thall A, Petryniak B, Rogers CE, Smith PL, Marks RM, Kelly RJ, Gersten KM, Cheng G, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y, Hindsgaul O, von Andrian UH, Lowe JB (1996)** The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86: 643-53.
- Mannori G, Santoro D, Carter L, Corless C, Nelson RM, Bevilacqua MP (1997)** Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am J Pathol* 151: 233-43.
- Martinez M, Joffraud M, Giraud S, Baisse B, Bernimoulin MP, Schapira M, Spertini O (2004)** Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin and E-selectin: Role of human fucosyltransferase-IV and -VII. *J Biol Chem* 280: 5378-5390.
- Martin-Satue M, Marrugat R, Cancelas JA, Blanco J (1998)** Enhanced expression of $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes correlates with E-selectin-mediated adhesion and metastatic potential of human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 58,1544-1550.
- Mas E, Pasqualini E, Caillil N, El Battari A, Crotte C, Lombardo D, Sadoulet MO (1998)** Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: comparative study between cancer tissues established tumoral cell lines. *Glycobiology* 8: 605-613.
- Melcher R, Grosch HW, Grosse O, Hasilik A (1998)** Increased elongation of N-acetylglucosamine repeats in doubly glycosylated lysozyme with a particular spacing of the glycosylation sites. *Glycoconj. J.* 15: 987-993
- Melcher R, Grosch HW, Hasilik A (2002)** Plasmid vectors with an 5'-hybrid intron facilitate high level glycoprotein expression in CHO-cells. *Biochim Biophys Acta.* 1575(1-3):49-53.
- Melcher R, Hillebrand A, Schröder B, Karas M, Hasilik A (2000)** Glycosylation-site-selective synthesis of N-acetyl-lactosamine repeats in bis-glycosylated human lysozyme. *Biochem. J.* 348: 507-515.
- Mollicone R, Gibaud A, Francois A, Ratcliffe M, Oriol R (1990)** Acceptor specificity and tissue distribution of three human alpha-3-fucosyltransferases. *Eur J Biochem.* 191: 169-76.
- Mollicone R, Reguigne I, Fletcher A, Aziz A, Rustam M, Weston BW, Kelly RJ, Lowe JB, Oriol R (1994)** Molecular basis for plasma alpha(1,3)-fucosyltransferase gene deficiency (FUT6) *J Biol Chem* 269: 12662-12671.
- Mulligan MS, Watson SR, Fennie C, Ward PA (1993)** Protective effects of selectin chimeras in neutrophil-mediated lung injury. *Journal Immunology* 151: 6410-6417.
- Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S (1993)** Increased expression of sialyl Lewis x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res* 53: 3632-3237.
- Nemoto Y, Izumi Y, Tezuka K, Tamatani T, Irimura T (1998)** Comparison of 16 human colon carcinoma cell lines for their expression of sialyl Le x antigens and their E-selectin-dependent adhesion. *Clin Exp Met* 16: 569-576.

- Nishihara S, Nakazato M, Kudo T, Kimura H, Ando T, Narimatsu H. (1993)** Human α -1,3 Fucosyltransferase (FucT VI) gene is located at only 13 Kb 3' to the lewis type fucosyltransferase (FucT III) gene on chromosome 19. *Biochem and Biophys Res Com* 190: 42-46.
- Oka N, Akiguchi I, Kawasaki T, Ohnishi K, Kimura J (1994)** Elevated serum levels of endothelial leukocyte adhesion molecules in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 35: 621-624.
- Osserman EF, Lawlor DP (1966)** Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J Exp Med* 124: 921-951.
- Ota M, Takamura N, Irimura T (2000)** Involvement of cell surface glycans in adhesion of human colon carcinoma cells to liver tissue in a frozen section assay: role of endo-beta-galactosidase-sensitive structures. *Cancer Res* 60:5261-8
- Pan J, McEver RP (1995)** Regulation of the human P-Selectin promoter by BCL-3 and specific homodimeric members of the NF-kappa B/Rel family. *J Biol Chem* 270: 23077-23083.
- Rao BN, Anderson MB, Musser JH, Gilbert JH, Shaefer ME, Foxall C, Brandley BK (1994)** Sialyl Lewis x mimics derived from a pharmacophore search are selectins inhibitors with antiinflammatory activity. *J Biol Chem* 269: 19663-19666.
- Rittershaus CW, Thomas LJ, Miller DP, Picard MD Geoghegan-Barek KM, Scesney SM, Henry LD, Sen AC, Bertino AM, Hanning G, Adari H, Mealey RA, Gosselin ML, Couto M, Hayman EG, Levin JL, Reinhold VN, Marsh HC (1999)** Recombinant glycoproteins that inhibit complement activation and also bind the selectin adhesion molecules. *J Biol Chem* 274: 11237-11244.
- Romano SJ, Slee DH (2001)** Targeting selectins for the treatment of respiratory disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2: 907-913.
- Saitoh O, Wang W, Lotan R, Fukuda M (1992)** 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: 5700-5711.
- Sasaki K, Kurata K, Funayama K, Nagata M, Watanabe E, Ohta S, Hanai N, Nishi T (1994)** Expression cloning of a novel alpha-1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis x carbohydrate determinants in leukocytes. *J Biol Chem* 269: 14730-14737.
- Sava G, Benetti A, Ceschia V, Pacor S. (1989)** Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent. *Anticancer Res.* 9: 583-591.
- Sawada T, Ho JLL, Chung YS, Sowa M, Kim YS (1994)** E-selectin binding by pancreatic tumor cells is inhibited by cancer sera. *Int J Cancer.*; 57: 901-907.
- Scesney SM, Makrides SC, Gosselin ML, Ford PJ, Andrews BM, Hayman EG und Marsh HC (1996)** A soluble deletion mutant of the human complement receptor type 1, which lacks the C4b binding site, is a selective inhibitor of the alternative complement pathway. *Eur. J. Immunol.* 26: 1729-1735.
- Schmidt RF, Thews G (1997)** *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag, S. 745-750.
- Schnyder-Candran S, Borsig L, Moser R, Berger EG (2000)** Localisazion of α 1,3 fucosyltrasnferase VI in Weibel-Palade bodies of huma endothelial cells. *PNAS* 97: 8369-8374.
- Schon MP, Krahn T, Schon M, Rodriguez ML, Antonicek H, Schultz JE, Ludwig RJ, Zollner TM, Bischoff E, Bremm KD, Schramm M, Henninger K, Kaufmann R, Gollnick HP, Parker CM, Boehncke**

- WH (2002)** Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. *Nat Med* 4: 366-372.
- Schuldes H, Schkeicher D, Mayer G, Merkus B, Cinlati J, Blaheta R (2003)** Binding of gastrointestinal tumor cells to endothelial E- and P- selectin adhesion receptors leads to transient down-regulation of sLe^x ligands in vitro. *Int J Colorectal Dis* 18: 292-299.
- Slee D, Romano SJ, Yu J, Nguyen TN, John JK, Raheja NK, Axe FU, Jones TK, Ripka WC (2001)** Development of potent non-carbohydrate imidazole-based small molecule selectin inhibitors with anti-inflammatory activity. *J Med Chem* 44: 2049-2107.
- Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD (1993)** Divergent fates of P- and E-selectin after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 4: 791-801.
- Sugama Y, Tiruppathi Ch, Janakidevi K, Andersen TT, Fenton JW, Malik AB (1992)** Thrombin-induced expression of endothelial P-Selectin and intercellular adhesion molecule-1: A mechanism to stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol* 199: 935-944.
- Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R (1993)** Contribution of carbohydrate antigens sialyl LewisA and sialyl LewisX to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer res* 53: 354-361.
- Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R (1993)** Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer res*; 53: 354-361.
- Tedder T F, Steeber D A, Chen A, Engel P (1995)** The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9: 866-873.
- Thomas LJ, Panneerselvam K, Beattie DT, Picard MD, Xu B, Rittershaus CW, Marsh Jr. HC, Hammond RA, Qian J, Stevenson T, Zopf D, Bayer RJ (2004)** Production of a complement inhibitor possessing sialyl lewis x moieties by in vitro glycosylation technology. *Glycobiology* 14: 883-893.
- Ulich TR, Howard SC, Remick DG, Yi EHS, Collins T, Guo KZ, Yin SM, Keene JL, Schmuke, JJ, Steining SM, Welply JK, Williams JH (1994)** Intratracheal administration of endotoxin and cytokines: VIII. LPS induces E-selectin expression; anti-E-selectin and soluble E-selectin inhibit acute inflammation. *Inflammation* 18: 389-298.
- Varki A (1994)** Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7390-7397.
- Varki A, Cumming R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J (1999)** Essentials of glykobiology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vestweber D, Blanks JE (1999)** Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.*; 79: 181-213.
- Wagers AJ, Stoolman LM, Craig R, Knibbs RN, Kansas GS (1998)** An sLex-deficient variant of HL60 cells exhibits high levels of adhesion to vascular selectins: further evidence that HECA-452 and CSLEX1 monoclonal antibody epitopes are not essential for high avidity binding to vascular selectins. *J Immunol* 160: 5122-5129.
- Wang WC, Lee N, Aoki D, Fukuda MN, Fukuda M (1991)** The poly-N-acetyllactosamines attached to lysosomal membrane glycoproteins are increased by prolonged association with the golgi complex. *J Biol Chem* 266: 23185-23190.

- Watson ML, Kingsmore SF, Johnston GI, Siegelmann MH, Le Beau MM, Lemons RS, Bora NS, Howard TA, Weissman IL, McEver RP, Seldin MF (1990)** Genomic organisation of the selectin family of leukocytes adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med* 172: 263-272.
- Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, Souchkova N, Quackenbush EJ, Lowe JB, von Andrian UH (2000)** Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity* 12: 665-76.
- Wenisch C, Myskiw D, Parschalk B, Hartmann T, Dam K, Graninger W (1994)** Soluble endothelium-associated adhesion molecules in patients with Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 98: 240-244.
- Weston BW, Nair RP, Larsen RD, Lowe JB (1992)** Isolation of a novel human alpha (1,3)fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group alpha (1,3/1,4)fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities. *J Biol Chem.* 267: 4152-60.
- Wittig BM, Thees R, Kaulen H, Gott K, Bartnik E, Schmitt C, Meyer zum Buschenfelde KH, Dippold W (1996)** Alpha(1,3)fucosyltransferase expression in E-selectin-mediated binding of gastrointestinal tumor cells. *Int J Cancer* 67: 80-85.
- Xia L, McDaniel JM, Yago T, Doeden A, McEver RP (2004)** Surface fucosylation of human cor blood cells augments binding to p-Selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. *Blood* 104: 3091-3096.
- Yago K, Zenita K, Ginya H, Sawada M, Ohmori K, Okuma M, Kannagi R, Lowe JB (1993)** Expression of alpha-(1,3)-fucosyltransferases which synthesize sialyl Le(x) and sialyl Le(a), the carbohydrate ligands for E- and P- selectins, in human malignant cell lines. *Cancer Res* 53: 5559-5565.
- Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP (1996)** Interleukin 4 or oncostatin induces a prolonged increase in P-Selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* 184: 81-92.
- Zeisig R, Stahn R, Wenzel K, Behrens D, Fichtner I (2004)** Effect of sialyl Lewis X-glycoliposomes on the inhibition of E-selectin-mediated tumour cell adhesion in vitro. *Biochem Biophys Acta* 1660: 31-40.
- Zöllner O, Vestweber D (1996)** The e-Selectin ligand-1 is selectively activated in chinese hamster ovary cells by the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferases IV and VII. *J Biol Chem* 271: 33002-33008.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Asn	Asparagin
CDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CHO- Zellen	chinese hamster ovary cells
DMSA	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
et al	und andere („et aliter“)
Fuc	Fukose
FucT	Alpha (1,3)-Fukosyltransferase
Gal	Galaktose
GFP	green fluorecence protein
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
HEV	Hohe endotheliale Venolen in lymphatischen Geweben
hLysII/IV	humane Lysozym- Mutante II/IV
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
KBE	“Kolonie bildende Einheit”
KBp	Kilobasenpaare
Kda	Kilodalton
Lamp	„Lysosomal membrane proteins“
Le ^x	Lewis x
Lys	Lysozym
Man	Mannose
MEM	“modified eagle medium”
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)
OD	Optische Dichte= Extinktion
PBS	„phosphat buffered saline“
Rpm	Rotations per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sLe ^a	sialyl Lewis a
sLe ^x	sialyl Lewis x
SW-480, Colo 206, Colo 678, Cx-1	Kolonkarzinomzelllinien
TBS	“tris buffered saline”
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Trishydroxymethan
U	Unit= Enzymeinheit
U937	humane histocytische Lymphomzelllinie
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule
WT	Wildtyp

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	N-Glykangrundstruktur	1
Abbildung 2	Schemat. Darstellung von biantännärem Poly-N-Acetylglukosamin	2
Abbildung 3	Darstellung von sLex	3
Abbildung 4	Wechselwirkungen zwischen Adhäsionsmolekülen und Endothelzellen führen zur Diapedese	8
Abbildung 5	Darstellung von Lysozym	10
Abbildung 6	pMCI hLysII/IV	12
Abbildung 7	Schema der Funktionsweise der Immunaффinitätschromatographie	22
Abbildung 8	Eichgeraden zur Bestimmung der Lysozymkonzentration nach Osserman und Lawlor	23
Abbildung 9	Prinzip des Adhäsionsassays	24
Abbildung 10	Standard-Lysozymkonzentrationen im ELISA	26
Abbildung 11	Vergleich der Konzentrationen nach der Aufreinigung des Mediumüberstands mittels Immunaффinitätschromatographie und anschließender Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration	30
Abbildung 12	Adhäsion der U937 Zellen an stimuliertes/ nicht stimuliertes Endothel	31
Abbildung 13	Adhäsionshemmung durch E-Selektin und VCAM-AK	32
Abbildung 14	Adhäsionsassay mit Überstandslysozym	33
Abbildung 15	Adhäsionsassay nach Immunaффinitätschromatographie	34
Abbildung 16	ADH mit hLysII/IV transfizierten Kolonkarzinomzellen	36
Abbildung 17	Western Blot Darstellung von Lysozym im Mediumüberstand am Beispiel von in CHO-FucTVI und VII transient exprimiertem Lysozym	37
Abbildung 18	Übereinstimmung der Adhäsionsassays	39

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	DNA-Konzentrationsbestimmung. Die Proben zwei und vier wurden aufgrund ihrer geringen DNA- Konzentration und möglichen Verunreinigungen nicht weiter verwendet. Für die Transfektion wurde Probe Nummer sechs verwendet.	19
Tabelle 2	Transiente Transfektion von CHO-FUCTIII-VII Zellen mit hLysII/IV und Vergleich des Lysozymstests nach Osseman und Lawlor und des Lysozym-ELISAs.	30
Tabelle 3	Vergleich der Konzentrationen nach der Aufreinigung des Mediumüberstands mittels Immunaффinitätschromatographie und anschließender Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration.	31
Tabelle 4	Adhäsionshemmung durch nicht aufgereinigtes Überstandmedium aus CHO-FUCTIII-VII-Zellen transfiziert mit hLysII/IV.	33
Tabelle 5	Adhäsionshemmung durch aufgereinigtes Überstandmedium aus CHO-FUCTIII-VII-Zellen transfiziert mit hLysII/IV.	35
Tabelle 6	Adhäsionshemmung durch aufgereinigtes Überstandmedium von verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien transfiziert mit hLysII/IV.	36

Lebenslauf

Name, Vorname	Möller, Dorothee
Geburtsdatum/-ort	12.09.1978 in Ludwigsburg
Familienstand	Ledig
Anschrift	Ernst-Reuter-Str. 17, 97080 Würzburg
E-Mail	Doro.Moeller@gmx.de

Schullaufbahn

1985- 1989	Grundschule Marbach am Neckar
1990- 1998	Friedrich- Schiller-Gymnasium Marbach
1998	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

05/ 1999- 11/2005	Studium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/ 2001	Physikum
03/ 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/ 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/ 2004-10/2005	Praktisches Jahr
11/ 2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

Augenheilkunde	Universitätsaugenklinik Würzburg
Innere Medizin	Medizinische Universitätsklinik Würzburg
	Norwich and Norfolk University Hospital, England
Chirurgie	GZO Spital Wetzikon, Schweiz

Seit 04/ 2006	Assistentin der Universitätsaugenklinik Würzburg
---------------	--

Würzburg, den 12. Juni 2006

Dorothea Möller

Danksagung

Herrn Prof. Scheppach möchte ich danken für die Möglichkeit, die hier vorgestellte Arbeit in seinem gastroenterologischen Labor an der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Melcher, dem Betreuer meiner Promotionsarbeit. Ich danke für die exzellente Betreuung, die wertvollen Anregungen und tatkräftige Unterstützung während meiner Zeit im Labor.

Herrn Dr. Kudlich danke ich für Motivation und stets große Hilfsbereitschaft bei allen inhaltlichen und formalen Fragen.

Ein großer Dank gebührt den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des gastroenterologischen Labors.

Ich danke Frau Dusel und Frau Kuhn für die Einarbeitung in die Zellkultur, Frau Backhaus für Hilfestellung bei Western blot und Frau Kelber für die Unterstützung bei den Adhäsionsversuchen. Ich danke für die ständige Unterstützung und große Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit.