

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

**Zelladhäsionsblockade von U937- Zellen an
aktivierten HUVEC- Zellen durch hLysII/IV-FucTVI**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Stefanie Demmig
aus Hannover

Würzburg, September 2008

Referent bzw . Referentin : Prof. Dr. med. W. Scheppach

Koreferent bzw. Korreferentin : Prof. Dr. med. M. Scheuerlen

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 04.12.2009

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Polylaktosamine	1
1.2. Leukozytenadhäsion an aktivierten Endothelzellen.....	2
1.3. Metastasierung.....	4
1.4. Lysozym	6
1.5. Glykosyliertes Lysozym.....	8
1.6 Zielsetzung der Arbeit	10
2. Materialien und Methoden	11
2.1. Materialien.....	11
2.1.1. Geräte.....	11
2.1.2. Chemikalien	11
2.1.3. Marker	12
2.1.4. Antikörper	12
2.1.5. Enzym.....	12
2.1.6. Eukaryontische Zelllinien	13
2.1.7. Medien eukaryontischer Zellen	13
2.1.8. Fertigmaterial.....	13
2.1.9. Plasmidvektor	14
2.2 Methoden	15
2.2.1. Kultivierung von CHO-Zellen	15
2.2.2. Stabile Transfektion	15
2.2.2.1. Transfektion	15
2.2.2.2. Subklonierung	15
2.2.3. Bestimmung der Zellzahl durch die Neubauer- Zählkammer.....	16
2.2.4. Herstellung einer Immunaффinitätschromatographiesäule	17
2.2.5. Aufreinigung durch Immunaффinitätschromatographie (Hi-Trap, 1 ml, Säule)	18
2.2.6. Aufreinigung durch Immunaффinitätschromatographie (Sepharose 4B- CL Säule).....	19

2.2.7. Aufarbeitung des Eluates.....	19
2.2.7.1. Dialyse	19
2.2.7.2 Ultrafiltration	20
2.2.8. Herstellung von Lysozymplatten	20
2.2.9. Messung der Lysozymaktivität nach Osserman und Lawlor (1966).....	20
2.2.10. Zellaussaat für Adhäsionsassays	21
2.2.11. Färbung von U937- Zellen mit BCECF	21
2.2.12. Adhäsionsassay mit HUVEC- Zellen	22
2.2.13. Herstellung einer Standardkurve für ein Adhäsionsassay	22
2.2.14. Western Blot mit einem Tricin Gel	23
2.2.14.1. Probenvorbereitung.....	23
2.2.14.2. Elektrophorese	23
2.2.14.3. Blotting	24
2.2.14.4. Färbung.....	24
2.2.15. ELISA	24
3. Ergebnisse	26
3.1. Stabile Expression.....	26
3.2. Immunaффinitätschromatographie	26
3.3. Zelladhäsionsassay mit hLysII/IV-FucTVI	28
3.3.1. Adhäsionshemmung	28
3.3.2. Nichtlineare Regression.....	31
3.3.3. Mittlere Hemmkonzentration (IC50)	32
3.4. Western-Blot von hLysII/IV-FucTVI	33
4. Diskussion.....	34
4.1. Überexpression und Aufreinigung von hLysII/IV -FucTVI.....	34
4.2. Adhäsionsblockade mit hLysII/IV-FucTVI.....	35
4.3 hLysII/IV-FucTVI als Adhäsionsinhibitor	36
4.4. Blockierung Lewis-Antigen abhängiger Adhäsion	38
4.5. Ausblick.....	41
5. Zusammenfassung	42

6. Literaturverzeichnis.....	43
7. Anhang	61
7.1. Abkürzungsverzeichnis	61
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	63
7.3. Tabellenverzeichnis.....	64
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Polylaktosamine

Polylaktosamine sind Oligosaccharide mit der Struktur $(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNac}\beta 1 \rightarrow 3)_n$. Sie konnten zuerst auf der humanen Erythrozytenmembran nachgewiesen werden (Tsuji et al., 1980; Fukuda et al., 1984). Wiederholungen von Laktosaminseitenketten kommen in Glykoproteinen mit N-glykosidisch verknüpften Oligosaccharidketten (N-Glykane), sowie bei O-Glykanen vor (Childs et al., 1983). Ebenfalls treten sie bei Proteoglykanen (Scott, 1994) und Glykosphingolipiden (Koscielak et al., 1976) auf. Die Laktosamine sind in Erythrozyten Träger der Blutgruppenantigene ABH und li. Sie befinden sich vor allem auf zellmembrangebundenen Glykoproteinen (Fukuda et al., 1984). In kernhaltigen Zellen tragen die lysosomalen Membranproteine lamp-1 und 2 eine signifikante Menge an Polylaktosaminoglykanen (Carlsson et al., 1988). Die langen Oligosaccharidketten erhöhen die Stabilität der Lysosomenmembran und der Proteinanteil wird vor einer proteolytischen Verdauung geschützt und erhöht so die Überlebenszeit (Lee et al., 1990). Lamp-1 und 2 kommen auch in Endosomen und in der Zellmembran vor (Saitho et al., 1992).

Die Polylaktosaminsynthese erfolgt in zwei Schritten. Zuerst entsteht ein Trägeroligosaccharid. Danach folgt die eigentliche Polylaktosaminsynthese durch Zusammenwirken der Glykosyltransferasen N-Acetylglukosaminyltransferase VI, der N-Acetylglukosaminyltransferase „i“ und der $\beta 1$ -4 Galaktosyltransferase. Die Polylaktosaminketten können durch Fukosyl- und Sialyltransferasen derivatisiert werden. Durch die Derivatisierung der terminalen Laktosamineinheiten entstehen die ABH- und li-Blutgruppenantigene (Childs et al., 1978; Fukuda et al., 1984) und ebenfalls die Lewis- Antigene (Itzkowitz et al., 1986, Fukuda et al., 1985, Pearlstein et al., 1980). Die Lewis- Antigene (Le^x , Le^a , sLe^x , sLe^a) haben eine große Bedeutung bei Entzündungsprozessen (Review Varki, 1994) und der Metastasierung (Bevilaqua und Nelson, 1993).

1.2. Leukozytenadhäsion an aktivierten Endothelzellen

Die Leukozytenadhäsion ist ein wichtiger Bestandteil bei Entzündungen, Arteriosklerose und Immunantworten. Sie setzt sich aus vier verschiedenen Schritten zusammen: 1. Margination, 2. Rollen, 3. Adhäsion und 4. Diapedese. Unter Margination wird die Annäherung der Leukozyten aus der Strommitte in die Nähe des Endothels verstanden. Diese wird durch Interaktionen weißer und roter Blutzellen und Zellaggregation roter Blutkörperchen ausgelöst (Goldsmith und Spain, 1984; Abbitt und Nash, 2003).

Das Rollen („rolling/ tethering“) wird vor allem durch die Selektin-Familie vermittelt und bewirkt eine Verlangsamung der Leukozyten, durch einen Wechsel von Aktivierung und Deaktivierung der Zell-Zell-Bindung (Ley et al., 1991; Lawrence und Springer 1993). Die Selektine bestehen aus den drei transmembranären Glykoproteinen E-, P-, und L-Selektin.

E-Selektin wird nach Aktivierung der Endothelzellen durch Zytokine an der Oberfläche exprimiert (Bevilaqua, 1989; Hession et al., 1990) und markiert für die entzündungshemmende Reaktion den genauen Angriffsort (Ley et al., 2005). P-Selektin wird in Endothelzellen in Weibel-Palad-Körperchen gespeichert und erscheint bei Aktivierung an der Zelloberfläche (McEver, 1989). Es beeinflusst im Zusammenspiel mit Leukozyten und T-Zellen die Entzündungsreaktion, Atherosklerose und Immunantwort. L-Selektin wird auf Leukozyten exprimiert und vermittelt eine Leukozyten- Leukozyten Interaktion (Alon et al., 1996). Es trägt an seiner Oberfläche sLe^x-artige Epitope und interagiert mit E-Selektin (Zöllner et al., 1997). Ebenfalls reagiert es mit dem GlyCAM-1 Rezeptor auf Endothelzellen (Brieskin et al., 1993), auf welchem sLe^x- Antigene vorkommen (Hemmerich et al., 1994). An der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen befinden sich fukosylierte Sialyl-Lewis X – Antigene (sLe^x). Alle Liganden von den Zelladhäsionsmolekülen der Selektin-Familie besitzen sLe^x (Varki, 1994, Polley et al., 1991, Bevilaqua und Nelson, 1993; Greenberger et al., 2000). Der bekannteste Ligand für alle Selektine ist der auf fast allen Leukozyten vorkommende PSGL-1-Ligand, welcher das Rolling stabilisiert (Ramachandran et al., 2003; Xia et al., 2002; Tu et al., 1996).

Die Selektine bewirken zunächst eine lockere Bindung zum Endothel. In den Endothelzellen wird P-Selektin aus den Speichern mobilisiert und an der Zelloberfläche exprimiert. E-Selektin wird neu gebildet und auch an der Endothelzelloberfläche exprimiert. L-Selektin wird vermehrt auf aktivierten T-Lymphozyten gebildet, mit einer verstärkten Expression von β 1-6 verknüpften Seitenketten, sowohl in N-Glykanen (Lemaire et al., 1994), als auch O-Glykanen (Piller et al., 1988). Die lockere Bindung der Selektine mit PSGL-1 und Chemokine (z.B. IL-8, IL-1, RANTES) (DiVietro et al., 2001; Gerszten et al., 1999; Review Ben-Baruch, 1995) bewirkt eine Aktivierung der Integrine auf den Leukozyten (Lasky, 1995, Simon et al., 2000). Die Integrine verursachen eine feste Bindung an der Endothelzelloberfläche und sind an der Migration mit beteiligt. Es wird zwischen den β_1 - und den β_2 -Integrinen unterschieden. Das bekannteste β_1 -Integrin ist das VLA-4, welches mit dem Liganden VCAM-1 interagiert (Alon et al., 1995). Die β_2 -Integrine, vor allem Mac-1 und LFA-1, wirken kooperativ zusammen (Dunne et al., 2002) und binden an den Liganden der Immunglobulin-Superge-Familie ICAM-1 (Diamond et al., 1990), wobei LFA-1 eine stärkere stabilisierende Funktion besitzt (Henderson et al., 2001; Sigal et al., 2000) und auch an den Rezeptor JAM-1 der Endothelzellen bindet (Ostermann et al., 2002). Die anschließende Transmigration, vor allem durch die Basallamina, wird von PECAM-1 unterstützt (Duncan et al., 1999), welches zusätzlich noch eine regulatorische Funktion besitzt (Thompson et al., 2001). Es kommt sowohl auf den Endothelzellen, als auch auf den Leukozyten vor (Liao et al., 1997). Ebenfalls regulierend beteiligt an der Migration ist das Protein LSP-1, welches am Endothel exprimiert wird und an F-Actin bindet (Jonysta-Bilen et al., 1992; Liu et al., 2005).

In den Krankheitsbildern Leukozyten Adhäsions Defizienz (LAD) Typ I und Typ II ist die Adhäsionskaskade gestört und es kommt zu gehäuften und stärker ausgeprägten Infektionen. Bei LAD I und seinen Varianten kommt es durch Mutationen zu Störung der Funktion und Expression der β_2 -Integrine (Bunting et al., 2002, Kuijpers et al., 1997, Mathew et al., 2000). Die LAD II wird von einer Punktmutation im putativen GDP-Fucose Transporter im Golgi Apparat verursacht (Lühn et al., 2001) und führt zu einem Defekt bei der Glykosylierung

der Liganden auf den Leukozyten, wie unter anderem sLe^x (Becker und Lowe, 1999).

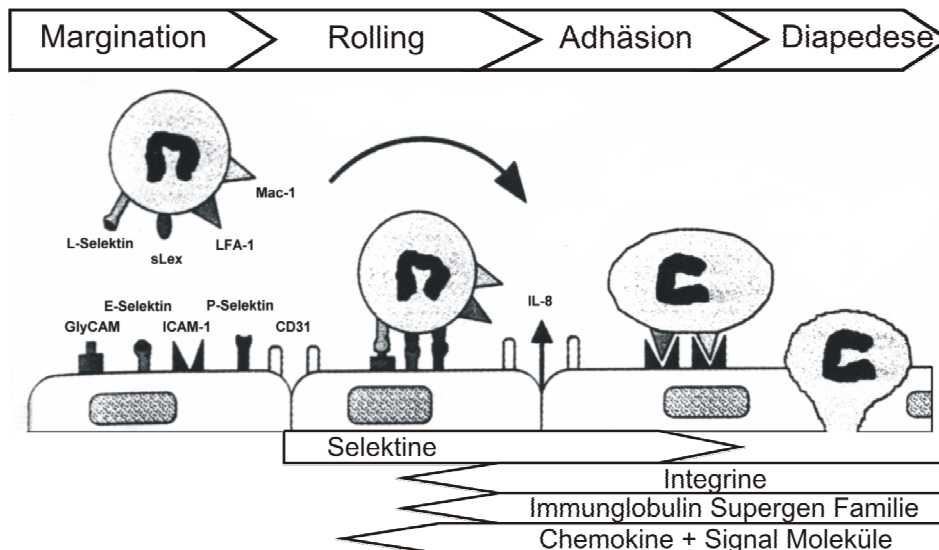


Abbildung 1: Interaktion von Leukozyten am aktivierten Endothel

1.3. Metastasierung

Am Anfang der Metastasierung steht die Transformation der Zelle. Die maligne Transformation ist assoziiert mit einer veränderten zellulären Glykosylierung und führt zur Synthese und Expression geänderter Kohlenhydratdeterminanten (Review Kim und Varki, 1997; Kannagi et al., 2004). In verschiedenen Tumoren kommen vermehrt di-, tri- und tetraantennäre Glykoproteine (Chandrasekaran et al, 1984; Mizoguchi et al., 1986) und Polylaktosamie vor, welche meist an tri- oder tetraantennäre Strukturen gebunden sind (Cummings und Kornfeld, 1984). Die Polylaktosamine werden meist an der β 1,6 Seitenkette angehängt (Dennis und Laferte, 1989, van den Eijnden et al., 1988), und konnten für verschiedene Tumoren nachgewiesen werden (Handerson und Pawelek, 2003). Für das Kolorektale- und Mammakarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der β 1,6-Seitenketten und das Auftreten von Metastasen und einer schlechten Prognose festgestellt werden (Handerson et al., 2005; Seelentag et al., 1998). In Kolonkarzinomzellen konnte eine vermehrte Expressierung der β 1-3 Acetylglukosamintransferase nachgewiesen werden, welche als Enzym für

die Entstehung der Laktosaminwiederholungen notwendig ist (Holmes et al., 1987).

Laferte und Dennis konnten 1989 in der Lymphomzelllinie MDAY-D2 nachweisen, dass das lamp-1 der Hauptträger der Polylaktosamine ist. Zellen mit hohem metastatischem Potential exprimieren vermehrt lamp-1 an der Zelloberfläche und enthalten mehr Laktosamineinheiten (Saitoh et al., 1992; Carlsson et al., 1988). Die erhöhte Polylaktosaminproduktion bewirkt einen Verlust der Kontaktinhibition, führt dadurch zu einem ungehinderten Wachstum der Zellen im Verband und zu einer verminderten Haftung an die umgebende Matrix (Demetriou et al., 1995).

Eine Erhöhung der β 1,4 Galaktosyltransferase korreliert stark mit der Expression von Acetyllaktosaminen (Ichikawa et al., 1999) und ist beim kolorektalem Karzinom mit Metastasen und einer schlechten Prognose assoziiert (Chen et al., 2005).

An den terminalen Enden der Polylaktosamine von Tumorzellen können durch Fukosylierung und Sialylierung Lewis- Antigene entstehen (Itzkowitz et al., 1986, Fukuda et al., 1985, Pearlstein et al., 1980). Diese werden, wie bei der Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Endothelzellen, unter anderem für die Bindung von Metastasenzellen an das Endothel verantwortlich gemacht (Review Krause und Turner, 1999, Majuri et al., 1992, Sawada et al., 1994). Die erhöhte Expression von Lewi-Antigenen, vor allem sLe^x , auf der Tumorzelloberfläche korreliert mit einer schlechten Prognose. Es kommt zu gehäuftem Auftreten von Metastasen und zu einer verminderten Überlebenszeit bei vielen verschiedenen Tumoren u.a. Kolonkarzinom, Magenkarzinom, Prostatakarzinom (Ura et al., 1997; Nakamori et al., 1993; Futamura et al., 2000, Jorgensen et al., 1995). Bei der Metastasierung muss zwischen sLe^x und sLe^a unterschieden werden. Sie werden auf verschiedenen Organen exprimiert: sLe^x vor allem auf Mamma-, Ovarial- und Lungenkarzinomzellen und sLe^a auf Karzinomzellen der Verdauungsorgane (Review Kannagi et al., 2004).

1.4. Lysozym

Humanes Lysozym (EC3.2.1.17) kommt in vielen sekretorischen Zellen von exokrinen Drüsen vor und wird in Körpersekrete abgesondert, z.B. Tränendrüsen, ösophagealen submukösen Drüsen, Magen und Pylorus Drüsen, Brunner Drüsen des Duodenums, Paneth Zellen und bronchialen serös-submuköse Drüsen (Mason und Taylor, 1975). Es katalysiert die Hydrolyse der β 1,4-glykosidischen Bindung zwischen N-Acetylglucosamin (NAG) und N-Acetylglucosaminsäure (NAM) der bakteriellen Zellwand (Shrake und Rubley, 1980).

Das Enzym besteht aus 129 Aminosäuren, 4 Disulfidbrücken und ist nicht glykosyliert. Es besitzt ein Molekulargewicht von 14,4 kDa, womit es ein kleines Protein ist, welches durch seine Disulfidbrücken eine große Stabilität aufweist.

Das Lysozym wurde 1922 von A. Fleming entdeckt. Die dreidimensionale Struktur wurde 1965 von Blake et al. bestimmt (s. Abb. 2), die cDNA-Sequenz von Yoshimurna et al. 1988 ermittelt und 1989 gelang Peters et al. die Lokalisation des Lysozymgens auf Chromosom 12. Es sind drei Mutationen des Lysozymgens bekannt. Die Mutationen I56T und D67H verursachen eine autosomal dominante hereditäre systemische Amyloidose (Pepys et al. 1993). Die häufigere T70N Mutation scheint keine Assoziation mit der Amyloidose zu besitzen (Booth et al., 2000).

Lysozym ist ein Bestandteil der unspezifischen Infektionsabwehr (Kooistra et al. 1980). Es wirkt antimikrobiell auf Gram-positive und weniger stark auf Gram-negative Bakterien (Yan and Hancock, 2000).

Fahlgren et al. stellten 2002 fest, dass Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn in ihren Dickdarmepithelzellen signifikant mehr Lysozym produzieren. Die Produktion steht jedoch nicht in Korrelation zur Krankheitsaktivität. 2002 und 2003 fand Rubio bei Epithelzelluntersuchungen des Darmtraktes heraus, dass bei neoplastischen kolorektalen Zellen eine starke Lysozym-Überexpression stattfindet. In Tierversuchen konnten antineoplastische Eigenschaften von Lysozym nachgewiesen werden. Beim Walker-Sarkom, Sarkom 180, Yoshida-Sarkom und Ehrlich-Asziteskarzinom konnte in jeweils mehreren Studien eine Reduktion der Tumorgroße zwischen

5% und 85% erreicht werden. Eine antimetastatische Aktivität zeigte sich bei Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom (Übersicht bei Sava et al., 1989). Die Applikation des Lysozyms (meist aus Hühnereiweiß) erfolgte dabei überwiegend intraperitoneal oder peritumoral. Über die Wirkung bei humanen Tumoren ist weniger bekannt. Castellari und Gardini (1964) behandelten 10 Patienten mit Karzinomen des Uterus, der Vulva, des Kolons, des Rektums und der Mundhöhle in einer Dosierung von 500 mg Lysozym i.v.. Die Autoren machten keine Aussagen zu der Wirkung auf die TumorgroÙe, berichteten aber über einen deutlich analgetischen Effekt der Behandlung. Ähnliche Beobachtungen machten 1964 Battaglia et al. bei Patienten mit Magen-, Prostata-, Uterus- und Mamma-Karzinomen. 1980 wurde Lysozym in Japan für die Behandlung von humanen Tumoren patentiert (Hiroshi et al., 1980a,b). Sava et al. konnte 1995 im Tierversuch bei der Kombinationsgabe von Lysozym und Zytostatika bei Mamakarzinom und Lungenmetastasen, eine Reduzierung des Tumorwachstums, sowohl bei Primärtumor und Metastase, als auch eine postoperative Überlebenszeit- Verlängerung beobachten. 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 (Übersicht bei Sava, 1996). So konnte eine Interaktion mit den Antigen-präsentierenden Zellen der Peyer-Plaques im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Die extrazelluläre Lysozymkonzentration korreliert mit dem Ausmaß der Makrophagenbeteiligung bei der Immunantwort (Bordin und Young, 1980) und Lysozym wirkt durch eine T-Zell-Aktivierung proliferationsfördernd auf Lymphozyten (Cole et al., 1986). Eine Freisetzung von antigenen Bestandteilen der Zellwand von durch Lysozym lysierten Bakterien könnte ebenfalls zu einer gesteigerten Immunreaktion beitragen (Namba et al., 1981; Jolles, 1976). Die immunsteigernde Wirkung in Kombination mit einer direkten Interaktion mit Pathogenen macht Lysozym zu einem interessanten Medikament sowohl bei viralen als auch bei bakteriellen Infektionen, das alleine oder zusätzlich zu Antibiotika oder Virostatika verabreicht werden kann (Verhamme, 1985). Ibrahim et al. stellte 2002 die Bedeutung der Möglichkeit der genetischen Veränderung des Lysozymgenoms heraus, um die

antimikrobielle Wirkung zu verstärken und zu erweitern, da es sich hierbei um ein sehr kleines Protein handelt.

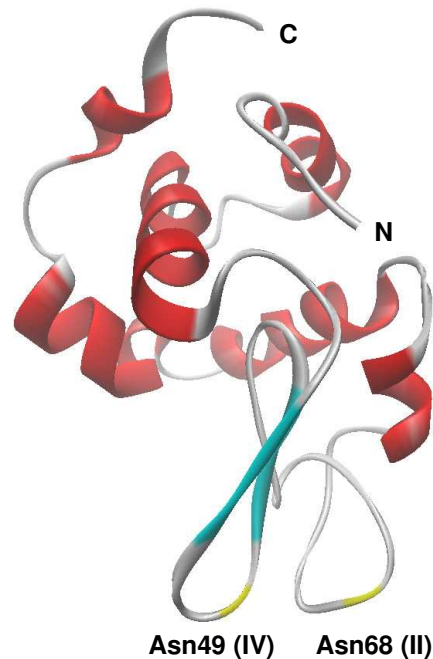


Abbildung 2: 3D-Struktur von hLysII/IV, mit den N-Glykosylierungsstellen 49(IV) und 68 (II)

1.5. Glykosyliertes Lysozym

Lysozym ist ein sekretorisches Protein und ist normalerweise nicht glykosyliert. 1991 stellte Horst et al. drei Lysozymmutanten (Lys I, Lys II, Lys III) her, welche alle eine unterschiedlich starke Glykosylierung aufwiesen (Lys I > Lys II > Lys III). Die Lysozymmutanten waren enzymatisch aktiv und zeigten ein normales Antikörperbindungsverhalten. 1998 untersuchte Melcher et al. doppelt glykosylierte Lysozymmutanten (hLysI/IV und hLysII/IV) und konnte zeigen, dass die Glykosylierung an beiden Stellen unabhängig voneinander stattfindet und komplexe Oligosaccharidketten mit einer unterschiedlichen Anzahl von Laktosaminrepeats entstanden. In den Lysozymmutanten II/IV wurde das Serine Kodon an der Glykosylierungsstelle IV mit einem Threonin Kodon

ausgewechselt (hLys II/IVT), welches die Produktion glykosylierten Lysozyms in CHO-Zellen stark erhöhte. Ebenfalls zeigte sich, dass bei eng benachbarten N-Glykosylierungsstellen, z.B. hLysII/IV, vermehrt größere Oligosaccharide gebildet werden. Als Folge der Glykosylierung an der Stelle II ist die Synthese von triantennären Oligosacchariden an der Stelle IV erhöht und sie enthalten mehr N-Acetyllactosaminrepeats (Melcher et al., 2000). Durch die Konstruktion eines neuen Plasmidvektors pMCI/hLysII/IV mit einem hybriden Intron im 5'-untranslatierten Bereich konnte Melcher et al. 2002 die Expression des glykosylierten Lysozyms um das 33fache steigern. Um eine Synthese von sLe^x an den endständigen Polylaktosaminen von hLysII/IV in CHO-Zellen zu ermöglichen, mussten Zellen verwendet werden, die vorher stabil mit einer humanen Fucosyltransferase transfiziert worden waren, da die CHO-Wildtypzellen selbst keine Fucosyltransferasen exprimieren. Nach Testung von fünf verschiedenen Fucosyltransferasen (III-VII), zeigte sich, dass in der Zelllinie CHO-FucTVI offensichtlich die effektivste sLe^x-Produktion möglich war, da durch hLysII/IV exprimiert in CHO-FucTVI, die Zelladhäsion von U937 an HUVEC-Zellen signifikant gehemmt werden konnte (Möller, 2006, Doktorarbeit).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ein Hauptproblem vorheriger Studien war, dass durch die nur geringen zur Verfügung stehenden Mengen an aufgereinigtem hLysII/IV keine detaillierten Studien zur Wirksamkeit von hLysII/IV durchgeführt werden konnten. Aus diesem Grund war das erste Ziel dieser Doktorarbeit, hLysII/IV stabil in CHO-FucTVI -Zellen zu transfizieren. Das zweite Ziel war größere Mengen von hLysII/IV-FucTVI aufzureinigen und schließlich durch die Verwendung unterschiedlicher hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen die Wirksamkeit des aufgereinigten Lysozymmutanten in einem in-vitro Adhäsionsassay durch U937- Zellen mit HUVEC-Zellen zu testen und die mittlere Hemmkonzentration zu bestimmen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Affinitätschromatographiesäule HiTrap NHS activated HP, 1ml	Amersham Biosciences, Freiburg
Affinitätschromatographiesäule Sepharose 4B-CL	Pharmacia, Freiburg
CO ₂ Brutschrank "Hera cell"	Heraeus, Hanau
Elektrophoresegerät „power pac 200“	BioRad, München
Elektrophoresekammer „mini trans blot“	BioRad, München
ELISA-Reader „Tecan Spectra II“	Tecan, Crailsheim
Feinwaage AB 204	Muttler Toledo, Schweiz
Kühlzentrifuge „Labofuge 400R“	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge „Sorvall RC 5B Plus“	DuPont, Newtown
Luminescence Spektrometer LS 50 B	Perkin Elmer, Boston, USA
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
Ph-Meter	InoLab, WTW, Weilheim
Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rotoren für die Kühlzentrifuge	SS34
Spectra/Por® Easy to Use Dialysis Membran	Spectrum, Breda, Niederlande
Sterilwerkbank „Hera safe“	Heraeus, Hanau
Vortexer „MS2 Minishaker“	IKA Labortechnik, Staufen
Waage AB204	Mettler Toledo, Giessen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Petrischalen	Sigma, Deisenhofen
Magnetrührer IKAMAG Reo	IKA, Staufen
Ultrazentrifugationsrohre Vivascience Vivaspin 15	Sartorius, Göttingen
Vakuumpumpe Mini Vac E1	Axon Lab, Reichenbach

2.1.2. Chemikalien

Agarose	Sigma, Deisenhofen
BCECF	Mo Bi Tec, Göttingen
0,5% Coomassie Blue G	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DMSO- Lösung	Calbiochem, Bad Soden
ECL- Lösung	Amersham Biosciences, Freiburg

Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Niederland
Ethanolamin	Sigma, Deisenhofen
FBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Lipofektamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Micrococcus luteus	Sigma, Deisenhofen
Non Fat Dry Milk	BioRad, München
PBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	Merck, Darmstadt
RPMI mit 2% FBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
RPMI ohne FBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
SDS 10%	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
TNF α	Sigma, Deisenhofen
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
0,1% Triton- x100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin –EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

Alle übrigen Chemikalien entsprechen dem Reinheitsgrad p.A. und wurden von den Firmen Merck und Sigma bezogen.

2.1.3. Marker

Kaleidoskopmarker	BioRad, München
-------------------	-----------------

2.1.4. Antikörper

Western Blot	Kaninchen anti-hLys	DAKO, Hamburg
	Maus anti-sLe ^x IgM	Calbiochem, Bad Soden
Chromatographiesäule	Maus IgG2a	Acris, Hiddenhausen
	Lysozyme AK	
ELISA	Schaf anti-hLys	Human Lysozym ELISA kit BTI, Stoughton, MA, USA
	Esel anti-Schaf IgG Peroxidase	Human Lysozym ELISA kit BTI, Stoughton, MA, USA
Adhäsionsassay	VCAM-1 Antikörper	Cymbus Biotechnology LTD, Chandlers Ford
	E-Selektin Antikörper	Ancell, Bayport, MN

2.1.5. Enzym

Human Lysozym	SCIPAC, Sittingbourne
---------------	-----------------------

2.1.6. Eukaryontische Zelllinien

CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) stabil transfiziert mit Fukosyltransferasen VI. Die Zellen wurden freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Vestweber, Münster	Zellwachstum: adhärent Kulturmedium: α -MEM, Puromycin
HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)	Cell Systems, USA Kulturmedium: EBM- Medium
U937 (human histocytic lymphoma)	DSMZ, Braunschweig Kulturmedium: 90% RPMI 1640, 10% FBS

2.1.7. Medien eukaryontischer Zellen

CHO- Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
M 199 Medium/10mM/l Hapes	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
α -MEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8. Fertigmaterial

Novex Running Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Human Lysozym ELISA kit	BTI, Stoughton, MA, USA

2.1.9. Plasmidvektor

Der Vektor pMCI hLysII/IV wurde 2002 von R. Melcher hergestellt. Er besteht aus 7062 bp. Die Expression wird von einem CMV- und SV40-Promoter/Enhancer gesteuert und durch die SV40 late Polyadenylierungsstelle terminiert. Er besitzt ein hybrid Intron in der 5'-untranslatierten Region, welcher zu einer verstärkten Expression von glykosyliertem Lysozym führt. Die Selektion transfizierter CHO-Zellen wird durch ein Puromycin- Resistenzgen ermöglicht und die Selektion transformierter Bakterien durch ein Ampicillin-Resistenzgen.

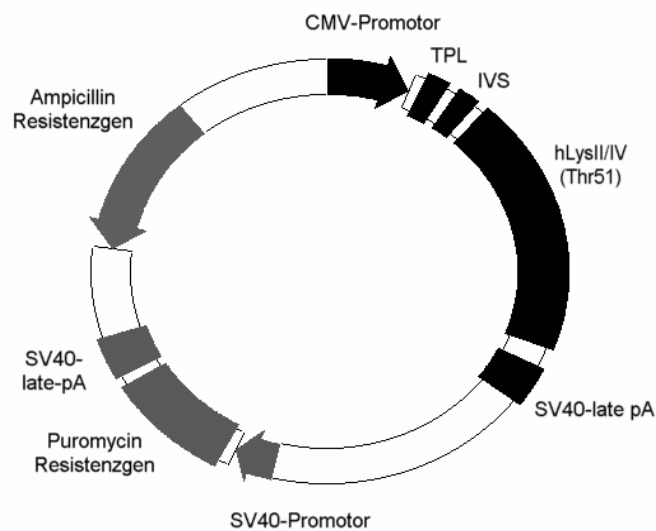


Abbildung 3: Plasmidvektor pMCI hLysII/IV

2.2 Methoden

2.2.1. Kultivierung von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen werden in α -MEM mit Zusatz von 14 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin in einem Brutschrank mit 5% CO_2 /Luft-Gemisch bei 37°C kultiviert. Alle drei bis vier Tage erfolgt ein Mediumwechsel und die Zellen werden ausgedünnt.

2.2.2. Stabile Transfektion

2.2.2.1. Transfektion

In eine 25 cm^2 Kulturflasche werden $1,5 \times 10^5$ CHO- Zellen (Chinese Hamster Ovary- Zellen) ausgesät. Nach 1-2 Tagen entspricht die Zellkonfluenz ca. 50-70%. In einem 2 ml Reaktionsgefäß werden 7,5 μg DNA in 1,5 ml serumfreiem Medium (Opti-MEM) gemischt. In einem zweiten Röhrchen werden pro Ansatz 22,5 μl Lipofektamin zu 1,5 ml Opti-MEM gegeben und dann tropfenweise zur DNA-Lösung hinzugegeben. Anschließend erfolgt eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Währenddessen werden die CHO-Zellen dreimal mit je 5 ml Opti-MEM gewaschen. Nun werden je 1,5 ml des DNA/Lipofektamin-Gemisches auf die CHO-Zellen gegeben und es folgt eine erneute Inkubation bei 37°C für 6 Stunden. Danach wird die Transfektionslösung entfernt und durch α -MEM ersetzt. Nach 2 Tagen erfolgt die Selektionierung mit 14 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin haltigen α -MEM, welches alle 2-3 Tage gewechselt wird und auf Lysozym mittels der Osseman und Lawlor Methode getestet wird. Nach 3-4 Wochen können Puromycin-resistente Zellen erkannt und subkloniert werden.

2.2.2.2. Subklonierung

Zuerst werden die überlebenden Zellen trypsinisiert. Dafür wird zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, mit 4 ml Trypsin/EDTA gespült und danach für 5-10 min mit 3 ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich lösen. Nun wird die Reaktion mit 7,5 ml MEM-Medium gestoppt und in ein 10 ml Gefäß abpipettiert. Die Zellsuspension wird

für 10 min bei 900 rcf und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml MEM- Medium resuspendiert. Anhand der Neubauer-Zählkammer wird die Zellzahl bestimmt und eine Verdünnungsreihe hergestellt, so dass 50 Zellen auf 20 ml MEM- Medium verteilt sind. Anschließend werden sie auf eine 96er well Platte mit je 200 µl, dies entspricht ½ Zelle pro well, verteilt. Die lysozym-exprimierenden Zellen werden nach einer Proliferationszeit von 2-3 Wochen erneut trypsiniert und aus den 96er-well Platten in 6er-well Platten überführt. Zuerst werden die Zellen mit 150 µl PBS gewaschen, danach mit 100 µl Trypsin/EDTA und anschließend mit 50 µl Trypsin/EDTA für 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Mit CHO-Medium wird die Reaktion gestoppt, in das 6er-well überführt und auf 4 ml aufgefüllt. Es folgt eine weitere Zugabe von 4 ml CHO-Medium mit 14 µg/ml Puromycin zur Selektionierung der Zellen.

2.2.3. Bestimmung der Zellzahl durch die Neubauer- Zählkammer

Für die Zellzählung werden 500 µl Zellsuspension mit 500 µl Trypanblau vermischt und anschließend in die Zählkammer gefüllt. Unter dem Mikroskop werden nun 4 große Quadrate ausgezählt, wobei nur die Zellen oben und links auf der Linie mitgezählt werden, und der Mittelwert wird errechnet. Die Gesamtzellzahl der Suspension wird wie folgt bestimmt: Zuerst wird der Mittelwert mit 10^4 multipliziert (Zellkonzentration/ ml) und anschließend mit dem Volumen der Zellsuspension (Zellzahl/ ml) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Zellsuspension multipliziert.

2.2.4. Herstellung einer Immunaффinitätschromatographiesäule

Benötigte Lösungen:

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

Hierbei wird eine HiTrap NHS-activated HP 1 ml Sepharose Säule der Firma Amersham Biosciences verwendet, auf welche anti-Lysozyme Antikörper (Ms IgG2a, Acris) gebunden werden.

Alle folgenden Schritte müssen ohne Zeitverzögerung nacheinander ausgeführt werden. Beim Auftragen der einzelnen Lösungen soll eine Geschwindigkeit von 1-2 Tropfen pro Sekunde nicht überschritten werden und es darf kein Lufteinschluss stattfinden.

Die Säule ist vom Hersteller mit 100 % Isopropanol überschichtet, welches mit 3x2 ml eiskaltem 1 mM HCl (Lsg. 2) ausgewaschen wird. Die Lysozymantikörper werden mit 5 ml der Lösung 1 auf eine Konzentration von 0,67 mg/ml verdünnt und über 15-30 min mit Hilfe von 10 ml Spritzen an jeder Seite auf die Säule verteilt. Es folgen nun mehrere Waschschrirte mit je 3x2 ml. Der Reihe nach werden Puffer A, Puffer B und Puffer A aufgetragen. Mit dem letzten Puffer auf der Säule erfolgt eine Ruhezeit von 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden je 3x2 ml Puffer B,A,B aufgetragen und es folgt erneut eine Ruhezeit mit Puffer B auf der Säule bei Raumtemperatur für 15 min. Abschließend wird die Säule mit 0,1 M Azid in PBS (Lösung 3) überlagert und im Kühlschrank bei 4 °C aufrecht gelagert.

2.2.5. Aufreinigung durch Immunaффinitätschromatographie (Hi-Trap, 1ml, Säule)

Aus dem gewonnenen Medium der stabil transfizierten CHO-Zellen wird das Lysozym mittels der Lysozymantikörper tragenden Sepharose Säule (Hi-Trap) herausselektioniert.

Benötigte Lösungen:

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

Zur Vorreinigung wird das zu verwendende Medium für 20 min bei 2000 rcf, 4 °C zentrifugiert und nur der Überstand, frei von Zelltrümmern, weiterverwendet.

Die Säule wird auf Raumtemperatur erwärmt und dann mit 10 ml Lösung A äquibriert. Danach wird 3 ml des Mediums 3-mal auf die Säule gegeben. Es folgt ein Waschschrift mit je 10 ml Lösung A und C. Die säuresensitiven Lysozymantikörper werden mit 3 ml Lösung D eluiert und fraktioniert in 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, in denen 300 µl Lösung F vorgelegt wurden. Das Eluat wird auf Eis gelagert. Die Säule wird nun zuerst mit Lösung B gewaschen, bis der pH 8,8 beträgt (ca. 10 ml) und ein weiteres mal mit 5 ml der Lösung A. Zur Lagerung wird die Säule mit 2 ml Lösung 1 überschichtet und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Um genügend Lysozym zu gewinnen, werden zehn Säulenläufe durchgeführt und die Eluate zusammengegeben.

2.2.6. Aufreinigung durch Immunaffinitätschromatographie (Sepharose 4B-CL Säule)

Diese Säule wurde freundlicherweise vom Institut für Physiologische Chemie der Universitätsklinik Marburg zur Verfügung gestellt.

Benötigte Lösungen:

Lösung A	10 mM Tris/ HCl	pH 7,5
Lösung B	10 mM Tris/ HCl	pH 8,8
Lösung D	100 mM Glycin/ HCl	pH 2,8
Lösung F	1 M Tris/ HCl	pH 8,0

Zur Vorreinigung wird das zu verwendende Medium für 20 min bei 2000 rcf, 4°C zentrifugiert und nur der Überstand, frei von Zelltrümmern, weiterverwendet.

Alle weiteren Schritte finden im Kühlraum bei 4°C statt. Der Lagerungspuffer wird entfernt und anschließend die Säule mit 3 ml Lösung A gewaschen. Nun wird 15 ml Medium der stabil transfizierten CHO-Zellen aufgetragen. Es folgt ein Waschgang mit 10 ml Lösung A. Anschließend wird mit 15 ml Lösung D, in ein mit 1,5 ml Lösung F vorgelegtes Reaktionsgefäß, eluiert. Die Säule wird mit 5 ml Lösung B und 5 ml Lösung A gewaschen und mit Lösung A zur Aufbewahrung überlagert.

2.2.7. Aufarbeitung des Eluates

2.2.7.1. Dialyse

Benötigte Lösung:

PBS	0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ 8 g/l NaCl 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	pH 7,4
-----	---	--------

Um Salze und andere Bestandteile aus den durch die Aufreinigung des Mediums gewonnenen Eluaten zu entfernen, erfolgte die Dialyse mit einer Membran der Firma Spectrumlabs (Spectra/ Por 7). Die Membran wird

zunächst für 30 min bei 4 °C unter leichter Rotation in destilliertem Wasser gewaschen und danach 2-mal mit destilliertem Wasser ausgespült. Nun erfolgt die Befüllung der Dialysemembran mit dem Eluat. Die Dialyse wird gegen PBS durchgeführt, wobei ein Verhältnis von 1: 100 (Eluat: PBS Puffer) erreicht werden soll. Die Dialyse wird bei 4°C und leichter Rotation für 17 Stunden durchgeführt.

2.2.7.2 Ultrafiltration

Das gewonnene dialysierte Eluat wird mit Hilfe von Vivascience Vivaspin 15 Ultrafiltern mit einer Porengröße von 5000 Da konzentriert. Bei 4°C und 3200 rcf wird das Eluat in 60-90 min auf ein Volumen von 400-500 µl konzentriert.

2.2.8. Herstellung von Lysozymplatten

2 g Agarose werden mit 200 ml 67 mM NaPO₄, pH 7,0 über 15 min in der Mikrowelle zum Aufkochen gebracht und danach bis 50°C abgekühlt. Währenddessen werden 80 mg *Micrococcus luteus* mit 20 ml 67 mM NaPO₄, pH 7,0 vermischt und anschließend zur abgekühlten Agarose gegeben. Die *Micrococcus*- Agarose Suspension wird zu je 10 ml in Petrischalen pipettiert und zum Auskühlen stehen gelassen. Die Lysozymplatten werden lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.2.9. Messung der Lysozymaktivität nach Osserman und Lawlor (1966)

In die Lysozymplatten werden 7 Löcher mit dem Durchmesser von 5 mm gestanzt und anschließend 20 µl des lysozymhaltigen Mediums in die Löcher gegeben. Gleichzeitig wird eine weitere Platte mit Standard Lysozymkonzentrationen erstellt. Nun werden die Platten bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Aufgrund der Größe des transparenten Hofes, welcher durch Diffusion des Lysozyms in das Gel und die dort stattfindende Lysierung

der Bakterien entsteht, kann die Lysozymkonzentration des getesteten Mediums im Vergleich zu den Lysozym- Standardwerten abgeschätzt werden.

2.2.10. Zellaussaat für Adhäsionsassays

Für die Adhäsionsassays werden HUVEC Zellen aus Kulturflaschen in eine 6er-well Platte überführt, um eine bestimmte Zellzahl zu Versuchsbeginn zu erreichen. Das Medium wird von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin/EDTA gespült und bei 37°C für 5 min mit 1 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wird die Lösungsreaktion mit 4,5 ml Medium gestoppt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und der Rest der Suspension mit 900 rcf bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Nun wird der Überstand entfernt und das Zellpellet mit Medium auf die Zellzahl von 300.000 Zellen pro well verdünnt. Nach einer Proliferationszeit von ca. 72 Stunden haben die Zellen die Versuchsdichte von 300000/well erreicht.

2.2.11. Färbung von U937- Zellen mit BCECF

Um die Zellkonzentration beim Adhäsionsversuch messen zu können, werden U937 Zellen (human histiocytic lymphoma) mit einem Fluoreszinfarbstoff (BCECF) gefärbt. Für 5×10^6 U937 Zellen werden 50 µg BCECF-Farbstoff benötigt. Zunächst wird der Farbstoff in 80 µl DMSO gelöst und anschließend zu den U937- Zellen gegeben, welche in 5 ml RPMI Medium ohne FBS gelagert werden. Es folgt eine Inkubation über 30 min bei 37°C im Wasserbad. Um die Färbung zu stoppen, werden 5 ml RPMI 2% FCS Medium hinzugefügt. Die Zellen werden vom Medium durch eine 7 min lange Zentrifugation bei 1000 U/min und 4°C getrennt und der Überstand abgesaugt. Anschließend werden sie mit M199-Medium /10m M/l Hepes resuspendiert.

2.2.12. Adhäsionsassay mit HUVEC- Zellen

Die vorbereiteten HUVEC Zellen werden in 6er-well Platten 6h bei 37°C mit 50 U/ml TNF- α inkubiert. Die Bestimmungen aller verwendeter Substanzen werden grundsätzlich doppelt durchgeführt. Als Positivkontrolle dient ein VCAM-Antikörper (20 μ g/ ml). Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgt 30 min bei 37°C. Danach wird das Medium entfernt und 1×10^6 gefärbte U937 Zellen in 1 ml Medium hinzugegeben und erneut 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS und einer zweiminütigen Inkubation mit Trypsin/ EDTA werden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in 15 ml Gefäße überführt. Nach einer zweimaligen Zentrifugation mit 1000 U/min bei 4°C für 7 min wird das Zellpellet mit 2 ml PBS + 0,1% Triton X-100 resuspendiert, gemischt und die Fluoreszenz gemessen.

2.2.13. Herstellung einer Standardkurve für ein Adhäsionsassay

Nach einer Zellzählung erfolgt die Färbung von 5×10^6 Zellen in 5 ml RPMI Medium ohne FBS mit 50 μ g BCECF- Farbstoff. Die Zellen werden für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach werden weitere 5 ml RPMI mit 2% FBS hinzugegeben, um die Färbung zu stoppen. Nun folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 900 U/min und 4°C. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und die Zentrifugation wird wiederholt. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet mit PBS + 0,1% Triton X-100 resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Fluoreszenzaktivität gemessen.

2.2.14. Western Blot mit einem Tricin Gel

Benötigt Lösungen:

Probenpuffer	2,0 ml 1.0 MTris- HCl, pH 6,8 1,0 ml ddH ₂ O 4,0 ml Glycerol 100% 2,0 ml SDS 10% 0,8 ml 0.5% Coomassie Blue G
Transferpuffer(10x)	30,3 g Trisbase 144,0 g Glycin ad 1000 ml ddH ₂ O

2.2.14.1. Probenvorbereitung

Der Probenpuffer wird im Verhältnis 1:9 (50 µl: 450 µl) mit Mercaptoethanol vermischt. In je einem 1,5 ml Eppendorf Röhrchen werden nun Proben mit Probenpuffer im Verhältnis von 2:1 vermischt, wobei darauf zu achten ist, das die Geltasche später maximal 25 µl fasst. Es folgt eine Inkubation der Proben für 3 min bei 98 °C im Wasserbad und danach eine kurze Lagerung auf Eis.

2.2.14.2. Elektrophorese

Der Laufpuffer (Novex, Invitrogen, Karlsruhe) wird zunächst mit ddH₂O im Verhältnis 1:9 verdünnt. Nun werden das 10-20 % Tricingel (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) in die Kammer eingesetzt und die Gelkammern mit dem Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wird entfernt, die Geltaschen gespült und die Proben, ein „Kaleidoskop“-Größenmarker (10 µl) und positive Kontrollen geladen. Darauf folgt die Elektrophorese zunächst 30 min bei 120 V und anschliessend für 70 min bei 135 V, bis der Marker oder die Proteinfront gerade die Unterkante des Gels erreicht hat.

2.2.14.3. Blotting

Nach dem Ende der Elektrophorese wird zunächst 100 ml Transferpuffer mit 200 ml Methanol und 700 ml ddH₂O vermischt. Eine auf Filtergröße zurechtgeschnittene PVDF Membran (Millipore, USA) wird mit 100% Methanol aktiviert und zusammen mit Schwämmen und Whatman-Filterpapier kurz in Transfer Buffer eingelegt. Das Gel wird direkt auf die Membran gelegt und von beiden Seiten mit Filterpapier und Schwämmen abgedichtet. Das Blotting wird nun bei 150 mA durchgeführt.

2.2.14.4. Färbung

Nach dem Blotten wird die Membran entfernt und für eine Stunde in 5 % Milch gelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Danach wird eine Inkubation über Nacht mit dem 1. Antikörper (Lysozym-Antikörper), durchgeführt. Anschließend wird die Membran zweimal für je 10 Minuten in PBS gewaschen und für 1 Stunde mit 10 ml eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers in 5 % Milch in PBS inkubiert. Der Waschschrift wird wiederholt und die Membran für eine Minute in ECL-Lösung eingelegt. Anschließend wird ein Film damit belichtet und entwickelt.

2.2.15. ELISA

Angewendet wurde hierbei ein Sandwich-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) der Firma BTI. Die 96-well Platte ist mit einem lysozymspezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. Die Standardwerte (1-50 ng/ml), Positiv- und Negativkontrollen, sowie die 1:10 verdünnten Proben werden aufgetragen und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgen drei Waschschriffe mit einem NaPO₄-Puffer und das Hinzugeben von 100 µl Schaf-anti-Lysozym-Antikörper. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wird erneut dreimal mit dem NaPO₄-Puffer gewaschen und danach 100 µl des Meerrettich-Peroxidase markierte Antikörper (Affe-anti-Schaf-IgG) für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugefügt. Für die Detektion werden zu gleichen Anteilen

Peroxidase Lösung und Substrat vermischt, welches nach erneutem dreimaligem Waschen der Platten für 15 Minuten hinzugefügt wird. Die ablaufende chemische Reaktion wird mit 100 µl Stopplösung beendet und innerhalb von 15 Minuten bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des humanen Lysozyms in den Proben ist proportional zur Farbentwicklung und kann im Vergleich zu den Standardwerten ermittelt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Stabile Expression

Ziel war es, CHO-FucTVI Zellen stabil mit hLysII/IV (Thr51) zu transfizieren, damit größere Mengen lysozymhaltigen Mediums gesammelt und aufgereinigt werden können. Dazu wurde eine Transfektion der Zellen mit dem Plasmidvektor pMCI/hLysII/IV(Thr51) nach der Lipofektionsmethode durchgeführt. Nach Selektionierung der stabil transfizierten Zellen mit Puromycin wurden mehrere Zellklone auf Lysozymaktivität untersucht und die stärksten Klone vermehrt (s. Tabelle 1).

Zellklon	Klon	Lysozymkonzentration (ng/ml)
CHO FucTVI /hLysII/IV	S3/4 F11	600
CHO FucTVI /hLysII/IV	S3/4 A11	300
CHO FucTVI /hLysII/IV	G2/4 B1	200

Tabelle 1: hLysII/IV-FucTVI Konzentration pro Zellklon

3.2. Immunaффinitätschromatographie

Die Mediumüberstände der Lysozym II/IV (Thr51) produzierenden Klone sollten durch eine mit polyklonalem Lysozymantikörper gekoppelte Sepharose-Säule aufgereinigt werden. Es wurden zehn Säulenläufe durchgeführt, die Eluate vereinigt und mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten aufkonzentriert. Zur Vorbereitung der weiteren Versuche erfolgte eine Dialyse gegen PBS. Jeweils ein Aliquot pro Klon wurde in einem SDS-PAGE-Gel getrennt und die Lysozymformen mittels eines Western-Blots dargestellt. Zwischen dem Ausgangsmedium und der Lysozymkonzentration im Ultrafiltrat konnte im Durchschnitt ein Zugewinn von Faktor 3,74 gemacht werden. Der Zugewinn an Lysozym zwischen den Eluaten und nach der Ultrafiltration besteht im Durchschnitt um den Faktor 5,93. Unabhängig von der Ausgangskonzentration

ist die Endkonzentration des Lysozyms nach Ultrafiltration vergleichbar und beläuft sich auf ungefähr 1100ng/ml.

Versuch	hLysII/IV- FucTVI Medium (ng/ml)	hLysII/IV- FucTVI Eluat (ng/ml)	hLysII/IV- FucTVI Ultrafiltrat (ng/ml)
1	600	300	1160
2	300	160	1109
3	200	160	1118

Tabelle 2: Lysozymkonzentrationen im CHO- Medium, Eluat und Ultrafiltration

	Lysozymkonzentrationsveränderung			
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Durchschnitt
Ultrafiltration: Ausgangsmedium	1,93	3,69	5,59	3,74
Ultrafiltration: Eluat	3,87	6,93	6,99	5,93

Tabelle 3: Lysozymkonzentrationsveränderungen zwischen dem Ausgangsmedium, dem Eluat und nach der Ultrafiltration

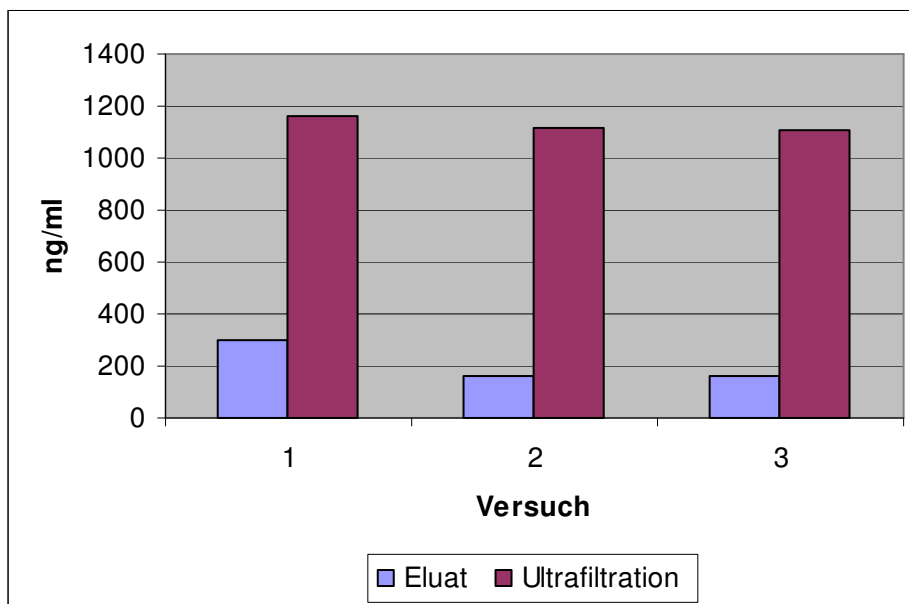


Abbildung 4: Vergleich der Konzentration von hLysII/IV-FucTVI nach der Immunaффinitätschromatographie und der Ultrafiltration

3.3. Zelladhäsionsassay mit hLysII/IV-FucTVI

Ziel war es die Wirksamkeit des Lysozym II/IV(Thr51)- FucTVI in verschiedenen Konzentrationen auf die Zelladhäsion in-vitro zu testen. Dafür wurde das aus der Immunaффinitätschromatographie gewonnene dialysierte und konzentrierte Eluat in den Konzentrationen von 0,1 µl, 1 µl, 10 µl und 100 µl, was ca. 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml entsprach, sowie einer Mediumkontrolle (+TNFa/ ohne hLysII/IV(Thr51)-FucTVI) und Positivkontrolle (Anti-VCAM-Antikörper) auf HUVEC Zellen mit gefärbten U937 Zellen getestet und die Zellzahl im Luminoscence Spectrometer LS50B/ Perkin Elmer bestimmt.

3.3.1. Adhäsionshemmung

Es zeigte sich eine signifikante Hemmung bei 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml Lysozym. Zur Auswertung wurden zusätzlich 47 ng/ml und 369 ng/ml hLysII/IV-FucTVI aus der Doktorarbeit von D. Möller verwendet.

	Adhäsion in %	Adhäsionsblockade in %	p-Wert
Kontrolle	100		
Anti- VCAM-1	50,91	49,09	0,0009
0,1 ng/ml	90,98	9,02	0,28
1 ng/ml	74,62	25,38	0,017
10 ng/ml	75,61	24,39	0,009
47 ng/ml	68,33	31,67	0,0003
100 ng/ml	72,06	27,94	0,001
369 ng/ml	68,41	31,59	0,01

Tabelle 4: Adhäsionshemmung mit unterschiedlichen hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen

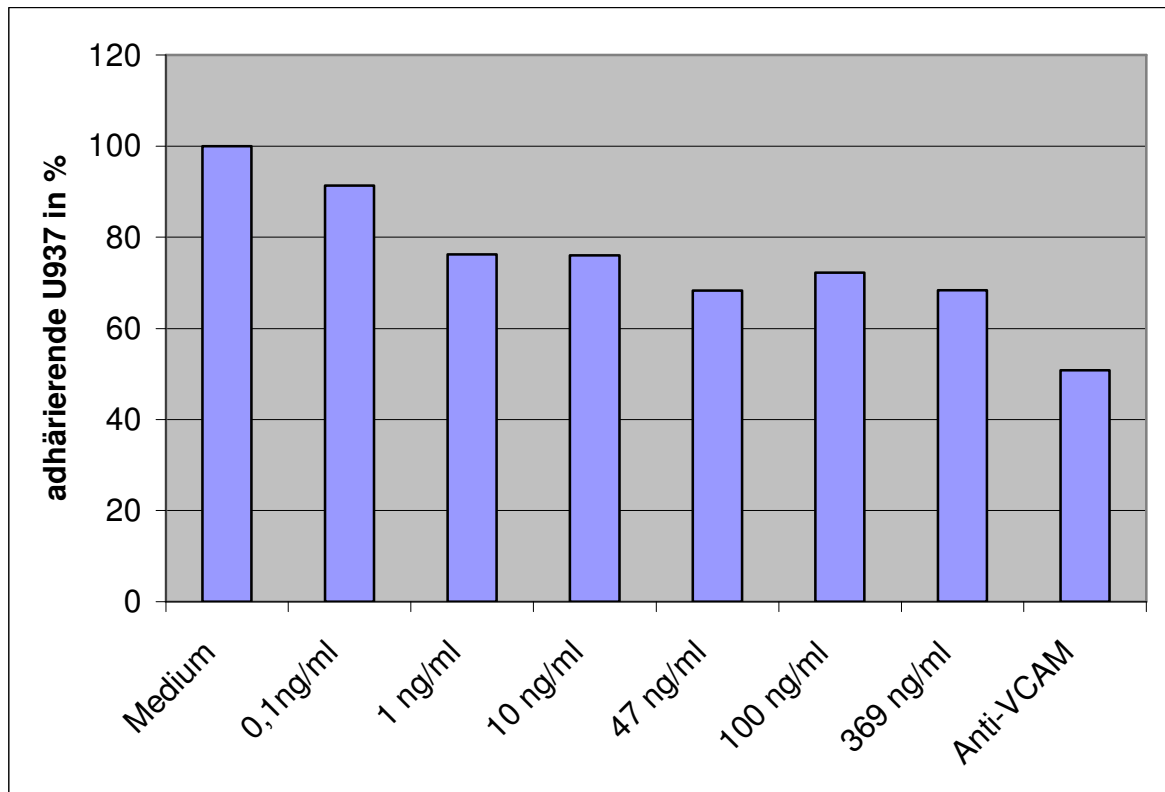


Abbildung 5: Adhäsionsassay mit unterschiedlichen hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen

Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-Test. Als signifikante Adhäsionshemmung wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ gewertet. Die maximale Bindung, daher 100%, von U937 Zellen wurde an TNF α stimulierten HUVEC Zellen erreicht. Als Positivkontrolle wurde Anti-VCAM-1-Antikörper verwendet. Hierbei zeigte sich eine signifikante Zelladhäsionsverminderung von 49,09% mit einem p-Wert von 0,0009. Die Zelladhäsionshemmung durch unterschiedliche hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen ist ab 1 ng/ml mit einem p-Wert von 0,017 signifikant. Bei höheren hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen bleibt die Signifikanz erhalten.

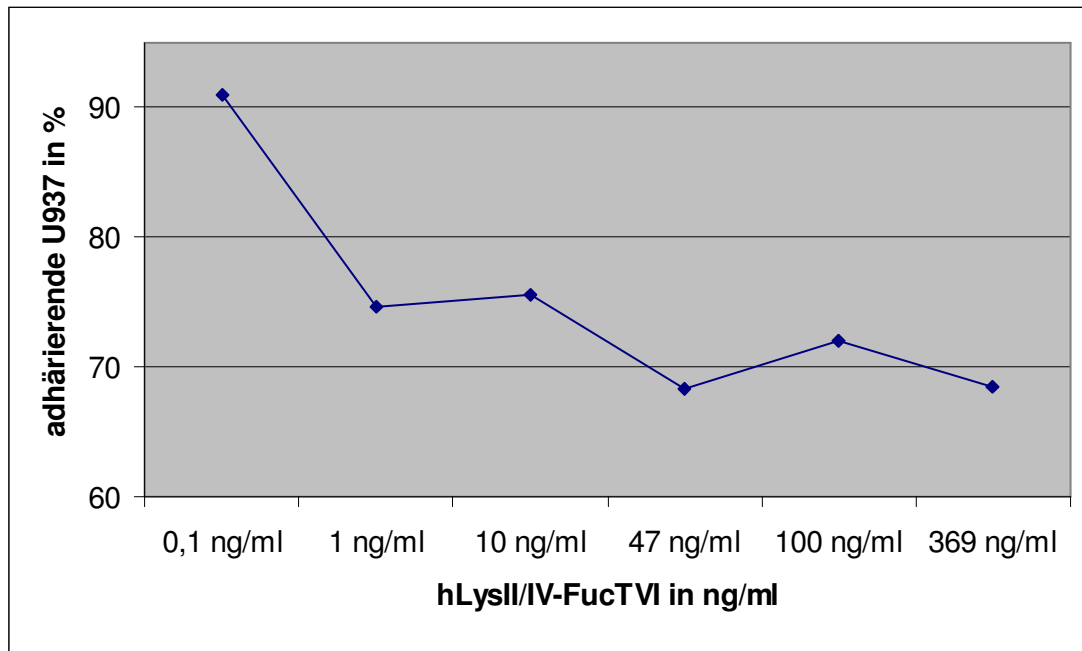


Abbildung 6: Durchschnittliche prozentuale Adhäsion von hLysII/IV-FucTVI in ansteigenden Konzentrationen

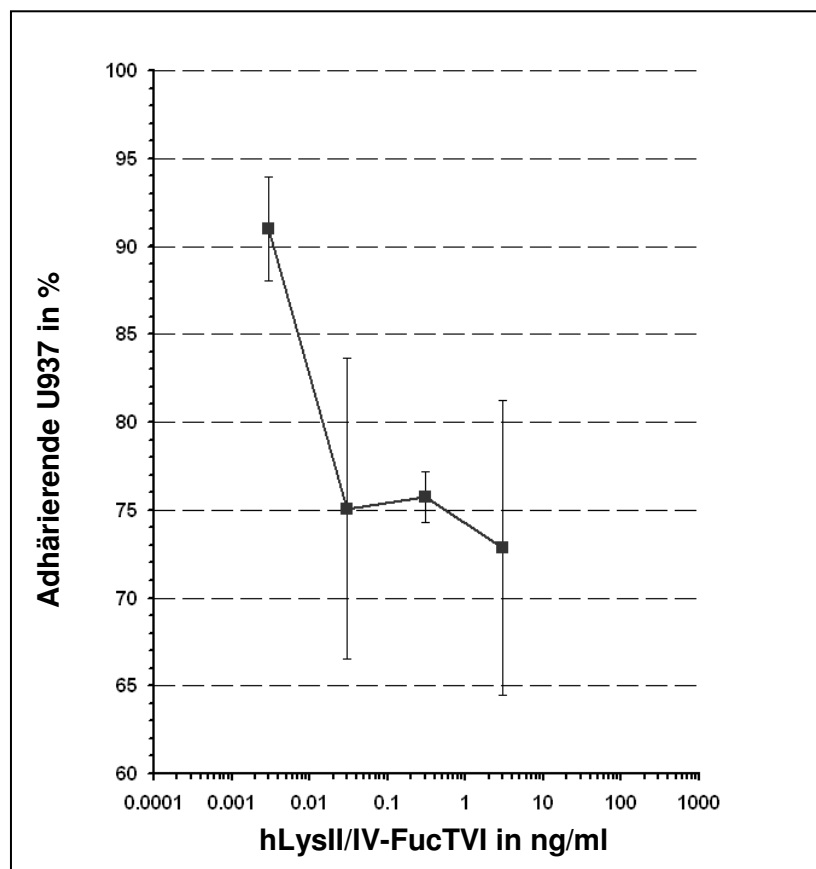


Abbildung 7: durchschnittliche prozentuale Adhäsionshemmung von unterschiedlichen hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen

3.3.2. Nichtlineare Regression

Durch eine nichtlineare Regression konnte der Kurvenverlauf der Adäsionshemmung durch hLysII/IV-FucTVI mit zunehmender Konzentration berechnet werden (siehe Formel in Abb. 8). Die Berechnungen wurden mit SigmaPlot, von der Firma SYSTAT, durchgeführt und sind in Abb. 9 und 10 logarithmisch dargestellt.

$$y = 70,9 + \frac{29,1}{1 + \left(\frac{x}{0,21}\right)^{0,89}}$$

Abbildung 8: Formel zur Bestimmung der nichtlinearen Regression

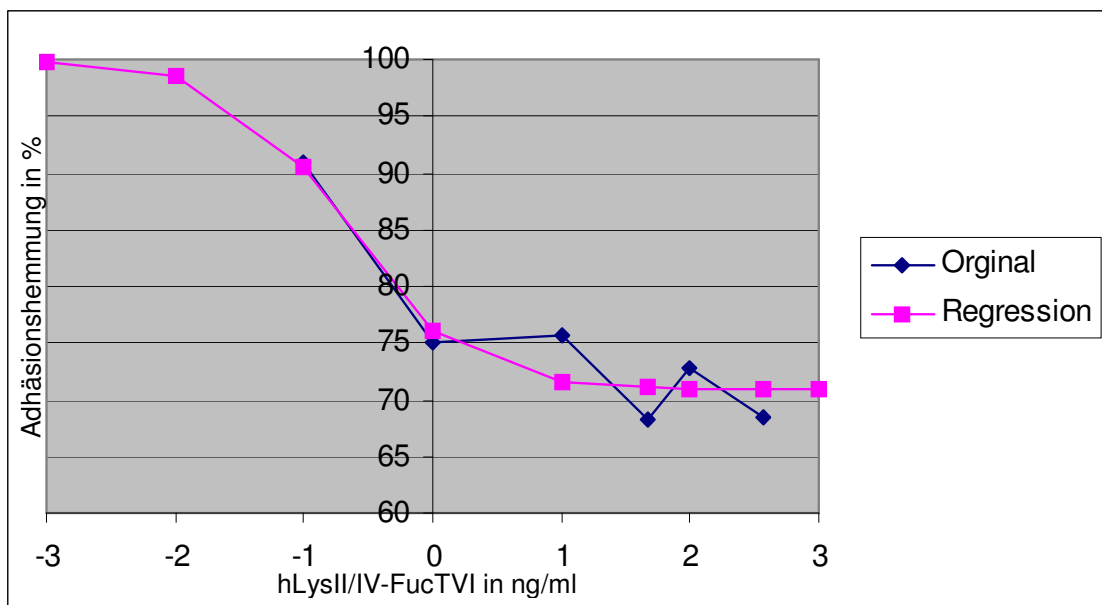


Abbildung 9: Nichtlineare Regressionskurve im log10

3.3.3. Mittlere Hemmkonzentration (IC50)

Nimmt man eine maximale Adhäsionshemmung von 29,1% an, so beträgt die mittlere Hemmkonzentration $29,1:2 = 14,55\%$. Um die Menge hLysII/IV-FucTVI die für die Hemmung benötigt wird zu ermitteln, setzt man 14,55 in die ermittelte Gleichung (s. Abbildung 9) ein und erhält 0,21 ng/ml. Das Molekulargewicht für doppelt glykosyliertes Lysozym beträgt ca. 30 kDa, so dass die mittlere Hemmkonzentration $7 \cdot 10^{-12} \text{ M} = 7 \text{ pM}$ (s. Tabelle 5) beträgt.

30.000 g/l Lysozym	=	1M
30 g/l Lysozym	=	1mM
30 mg/ml Lysozym	=	1mM
30 µg/ml Lysozym	=	1µM
30 ng/ml Lysozym	=	1nM
0,21 ng/ml Lysozym	=	7pM

Tabelle 5: Bestimmung der mittleren Hemmkonzentration in M

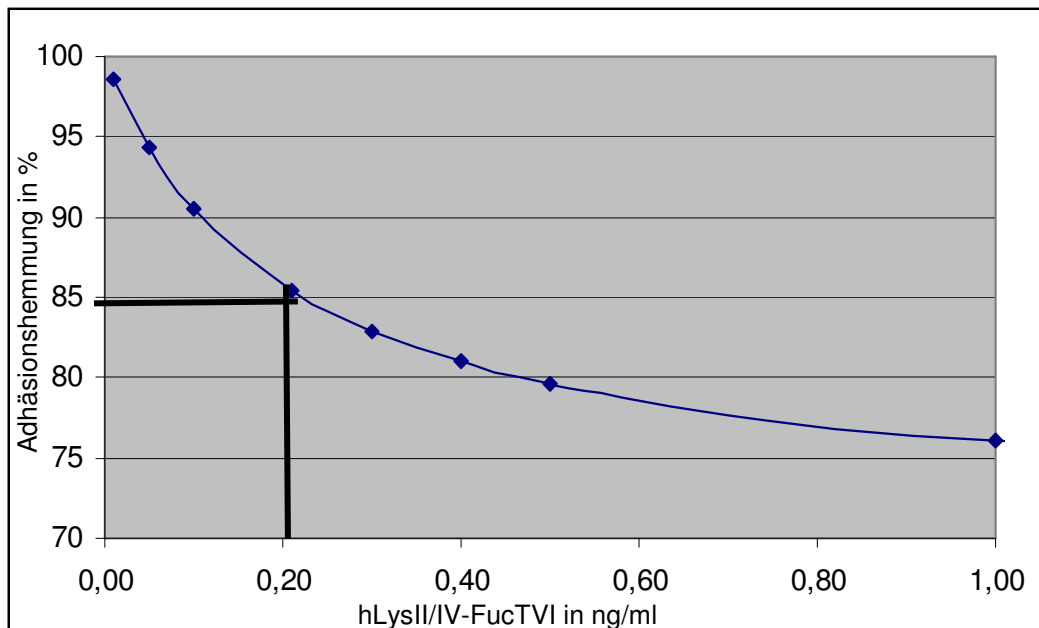


Abbildung 10: Bestimmung der mittleren Hemmkonzentration

3.4. Western-Blot von hLysII/IV-FucTVI

Im Western-Blot konnten die verschiedenen glykosylierten Lysozymformen dargestellt werden (s. Abbildung 12). Nicht glykosyliertes Lysozym wird in der Bande bei 14,4 kDa gezeigt. Bei etwa 18 kDa stellen sich mannosereiche Lysozymformen dar. Einfach glykosyliertes Lysozym findet sich zwischen 19 und 25 kDa und doppelt glykosyliertes Lysozym zwischen 25 und 37 kDa. Je langsamer das Laufverhalten der Bande ist, desto mehr Laktosamineinheiten sind vorhanden.

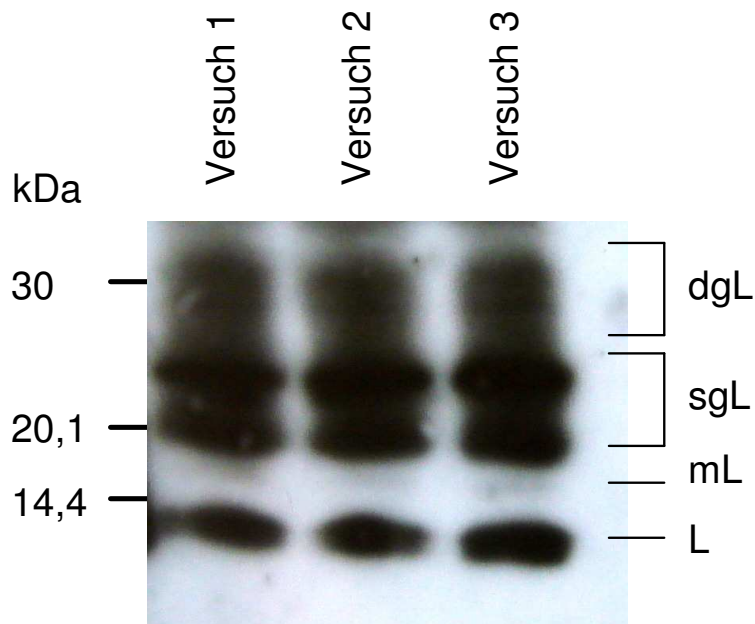


Abbildung 11: Western-Blot von Lysozym im CHO-FucTVI Medium

10 ml Medium der Versuche 1,2,3 wurden gesammelt, der pH auf 7,4 eingestellt und auf eine Immunitätsäule aufgetragen. Das Lysozym II/IV(Thr51) wurde mit 0,1 M Glycin/HCl pH2,8 eluiert, mit Ultrafiltrationseinheiten aufkonzentriert und im Western-Blot dargestellt. Die präzipitierten Lysozymmutanten sind mit L (unglykosyliertes), mL (glykosyliertes vom mannosereichen Typ), sgL (einfach glykosyliertes), dgL (doppelt glykosyliertes Lysozym) bezeichnet.

4. Diskussion

4.1. Überexpression und Aufreinigung von hLysII/IV-FucTVI

Durch Transfektion wurde der Plasmidvektor pMCI/hLysII/IV(Thr51) in CHO-FucTVI Zellen integriert und stabile Klone durch die Selektionierung mit Puromycin gewonnen. Das überexprimierte hLysII/IV-FucTVI konnte durch den Lysozymtest nach Osserman und Lawlor und einem Lysozym-ELISA im Medium nachgewiesen und die unterschiedlichen glykosylierten Lysozymformen im Westernblot dargestellt werden. Durch Immunaффinitätschromatographie und Ultrafiltration wurde hLysII/IV-FucTVI aufgereinigt und konzentriert. Die weiterführenden Versuche konnten auf diese Weise problemlos durchgeführt werden. Obwohl nur 10 ml Medium der stabil transfizierten Zellklone weiter aufgereinigt wurden, war die Kapazitätsgrenze der Immunaффinitätschromatographie- und Ultrafiltrationsäulen damit schon überschritten. Ein enzymatischer Aktivitätsverlust der aufgereinigten Lysozymformen ist beschrieben worden (Melcher, 2000, Doktorarbeit), konnte allerdings durch einen zusätzlich durchgeführten ELISA-Test ausgeschlossen werden. Eine Erklärung für die (scheinbar) geringe Kapazität der Säulen kann die relativ hohe Lysozymüberexpression der Klone sein. In 10 ml Medium befindet sich 3-6 µg hLysII/IV-FucTVI. Das Molekulargewicht von IgG-Antikörpern liegt mit 150000 mehr 5-10-mal so hoch wie die verschiedenen Lysozymformen. Bei den an die Säule gebundenen 200 µg Antikörper liegt die maximale Bindungskapazität damit zwischen 20-40 µg. Da von einer nicht 100% Bindung auszugehen und die Bindung nicht immer effektiv ist, liegt eine Bindungskapazität um 5-10 µg im erwarteten Bereich. Es wurde ca. 1000 ml Medium gesammelt, die Gesamtmenge an hLysII/IV-FucTVI liegt damit ca. bei 5 mg und es würden ca. 100 Säulenläufe notwendig sein, um eine Aufreinigung des Gesamtlysozyms durchzuführen. Da dies vom Arbeitsablauf und von der Eluatmenge nicht sinnvoll durchführbar ist, muß eine Säule mit größerer Kapazität erstellt oder ein anderes Aufreinigungsverfahren durchgeführt werden.

Im Rahmen einer weiterführenden Studie ist geplant, durch ein 5'-His-Tag die Aufreinigung effektiver und kostengünstiger gestalten zu können.

4.2. Adhäsionsblockade mit hLysII/IV-FucTVI

Bei dem Adhäsionsversuch wurden 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml aufgereinigtes hLysII/IV-FucTVI verwendet. Zusätzlich wurden zur Auswertung noch 47 ng/ml und 369 ng/ml hLysII/IV-FucTVI aus Versuchen von D. Möller 2006 hinzugezogen. Durch hLysII/IV-FucTVI kann ab einer Konzentration von 1 ng/ml die Adhäsion an TNF- α stimulierten Endothel signifikant reduziert werden.

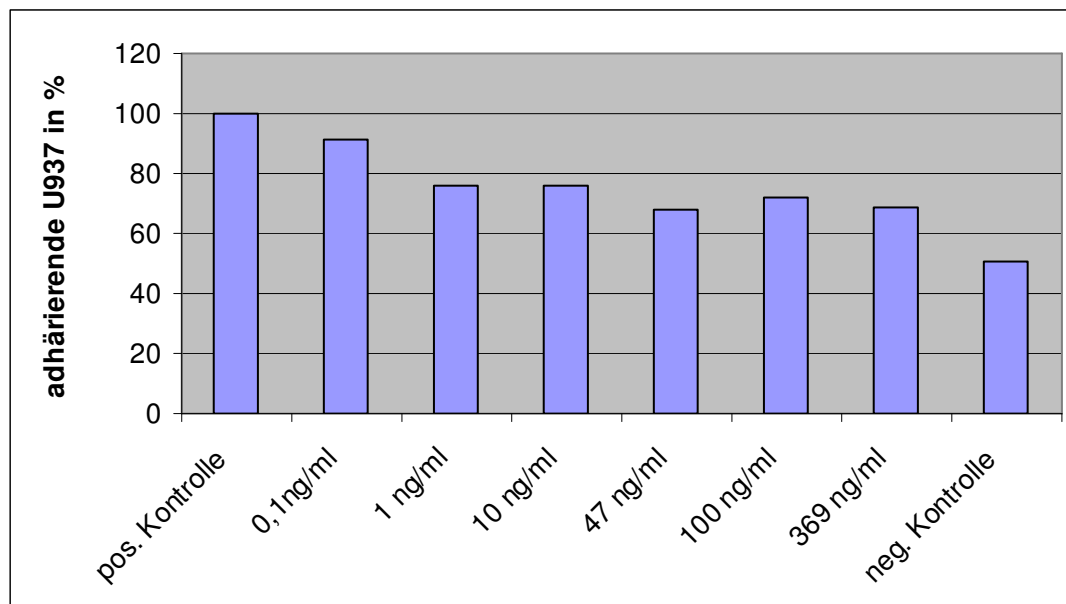


Abbildung 12: Adhäsionsassay mit unterschiedlichen hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen

Die maximale Adhäsionshemmung liegt bei ca. 30 %. Dieser Wert (30 %) konnte von Möller 2006 auch mit einem E-Selektin Antikörper im Vergleich zu hLysII/IV-FucTVI erreicht werden. Eine Wirkung über eine E-Selektin-Blockade ist damit wahrscheinlich und sollte über die terminalen sLex-Reste auf den Polylaktosaminketten von hLysII/IV-FucTVI vermittelt werden. Die mittlere Hemmkonzentration beträgt $7 \cdot 10^{-12}$ M hLysII/IV-FucTVI. Dies entspricht 0,21 ng/ml hLysII/IV-FucTVI.

Die Wirkung verschiedener Selektin Inhibitoren ist sehr unterschiedlich und abhängig von ihrer Struktur. Es konnten für sLe^x –Oligosaccharide oder Substanzen mit ähnlichen strukturellen Eigenschaften bisher nur mäßige Selektin Blockaden erreicht werden. So konnte mit Efomycine M und sLe^x mit einem Lipidschwanz lediglich eine mittlere Hemmkonzentration (IC₅₀) von 3*10⁻⁶ M erreicht werden (Kim et al., 1998, Schön et al., 2002). Tsukida et al. konnte 1998 für das sLe^x Analogon L-Ser-D-Glu eine IC₅₀ von 3*10⁻⁷ M ermitteln. Durch rekombinante Glykoproteine konnte die Adhäsionsblockade weiter gesteigert werden. Ein löslicher Komplementrezeptor mit sLe^x an den Zuckerseitenketten (sCr1sLe^x) erlaubte eine IC₅₀ von 5*10⁻⁹ M. Durch die Verwendung von ST3Gal-III und humaner Fucosyltransferase VI in CHO-Zellen von sCr1sLe^x entstand sCR1-F/S mit einer IC₅₀ von 4*10⁻¹⁰ M. In den hiesigen Versuchen konnte für den doppelt glykosylierte Lysozymmutanten mit N-Glykosylierung und langen Poly-laktosaminseitenketten hLysII/IV-FucTVI eine IC₅₀ von 7*10⁻¹² M erreicht werden.

Substanz	Mittlere Hemmkonzentration (IC₅₀)
Efomycin M	3*10 ⁻⁶ M
sLe ^x mit einem Lipidschwanz	3*10 ⁻⁶ M
L-Ser-D-Glu	3*10 ⁻⁷ M
sCR1sLe ^x	5*10 ⁻⁹ M
sCR1-S/F	4*10 ⁻¹⁰ M
hLysII/IV-FucTVI	7*10 ⁻¹² M

Tabelle 6: mittlere Hemmkonzentration unterschiedlicher Selektin-Inhibitoren

4.3 hLysII/IV-FucTVI als Adhäsionsinhibitor

Mit einer mittleren Hemmkonzentration (IC₅₀) von 7*10⁻¹² M ist hLysII/IV-FucTVI der bisher wirksamste Selektin Adhäsionsinhibitor. Die bessere Wirksamkeit kann zum einen mit den langen Poly-laktosaminketten und auch mit einer effektiven sLex-Synthese auf den terminalen Enden dieser Ketten zusammenhängen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der sLe^x-

Gruppen mit der Wirksamkeit korreliert (Thomas et al. 2004). Möller konnte 2006 zeigen, dass die Adhäsionsblockade vermutlich über eine E-Selektin-Hemmung verursacht wird. Die Wirkung vom E-Selektin-Antikörpern und hLysII/IV-FucTVI war nahezu gleich effektiv. Es war allerdings nicht möglich terminale sLe^x-Strukturen im Western-Blot nachzuweisen, so dass eine sLe^x-E-Selektin-Interaktion bisher noch nicht direkt bewiesen ist. In einer Diplomarbeit von 1999 konnte Kraus im Rahmen einer Untersuchung der Zuckerseitenketten von hLysII/IV(Thr51) in CHO-FucTIII-VII aber bereits entsprechende Strukturen durch einen Glykosidaseverdau (indirekt) nachweisen.

Für eine mögliche therapeutische Anwendung von hLysII/IV (Thr51)-FucTVII gibt es zu beachten, dass Lysozym in größeren Mengen einen negativen Effekt auf den systemischen Blutdruck, die glomeruläre Filtrationsrate und den Nierenblutfluß haben kann. Da dies allerdings erst bei Mengen größer als 15 mg/kg/h auftritt (Haas et al., 2002), sollte dies in diesem Fall unproblematisch sein, da bei einer mittleren Hemmkonzentration in-vitro von 0,2 ng/ml solche Mengen in-vivo nicht erreicht werden sollten. Lysozym ist mit 14,4 kDa ein Protein mit einem sehr geringen Molekulargewicht. Alle Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht als 30 kDa werden in der Niere frei aus dem Glomerulum, und damit aus dem Blutkreislauf, gefiltert. Der doppelt glykosylierte Lysozymmutant mit N-Glykosylierung und langen Polylaktosaminseitenketten hLysII/IV-FucTVI hat ein Molekulargewicht bis 37 kDa und ist damit wesentlich größer und wird nicht mehr frei gefiltert. Jedoch werden erst Substanzen von mehr als 68 kDa von der Basalmembran am Durchtritt gehindert. Zusätzlich werden anionische Proteine durch die negative geladene Basalmembran erschwert filtriert. Da hLysII/IV-FucTVI ein anionisches Protein ist, sollten die hochmolekularen Formen, die auch die langen Polylaktosaminseitenketten und die sLe^x-Antigene tragen, länger im Blutkreislauf bleiben und damit auch länger als Wirkstoff zur Verfügung stehen. Es müssen aber erst in-vivo (Tier-)Versuche durchgeführt werden, um nähere Aussagen zur Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit machen zu können.

4.4. Blockierung Lewis-Antigen abhängiger Adhäsion

Durch die Blockierung der Lewis- Antigene, vor allem sLe^x, kann sowohl die Entzündungsreaktion, Arteriosklerose, als auch die Metastasierung verschiedener Tumoren beeinflusst werden. Lösliches sLe^x ist ein schwacher Inhibitor von E-Selektin in vivo (Norman et al, 1998). Um einen stärkeren inhibitorischen Effekt zu erzielen wurden bis jetzt verschiedene Ansatzpunkte angewendet. Um die Adhäsion der Selektine zu vermeiden wurden sLe^x tragende Glykoproteine, sLe^x-Oligosaccharide und Substanzen mit sLe^x Analoga verwendet. Desweiteren wurden Substanzen zur Verhinderung der sLe^x Exprimierung eingesetzt. 1999 wiesen sowohl Mulligan et al. und Rittershausen et al. für einen verkürzten löslichen Komplementrezeptor mit sLe^x an den Zuckerseitenketten, sCR1[desLHR-A]sLe^x, die Fähigkeit zur E-Selektin Blockade nach und zeigten, das sLe^x tragende Inhibitoren einen antiinflammatorischen Effekt haben und am aktivierten Gefäßendothel lokalisiert werden. Gleichzeitig konnte auch für sCR1sLe^x diese Wirkung nachgewiesen werden. Es wirkt zugleich als Komplement Inhibitor und Selektin Antagonist, was bei vielen Erkrankungen vorteilhaft ist. Beides zusammen zeigt eine verstärkende Wirkung. sCR1sLe^x hat einen protektiven Effekt. Seine positive Wirkung konnte für folgende Erkrankungen durch die Reduktion krankheitsspezifischer Komponenten nachgewiesen werden: in Tiermodellen bei der Herzinfarktgröße und dem myokardiale Troponin T (Zacharowski et al., 1999), bei Ischämie-/ Reperfusionverletzungen bei Lungentransplantationen (Schmid et al, 2001), bei cerebralen Infarkt volumen (Huang et al., 1999), bei Skelettmuskel- Reperfusion- Verletzungen (Kyriakidus et al., 2001a) und bei säure Aspirations- Verletzungen (Kyriakidus et al., 2001b). Thomas et al. konnte 2004 in vitro die Wirksamkeit von sCR1sLe^x steigern, indem er es in CHO-Zellen mit löslichem rekombinanten Ratten ST3Gal-III und humaner Fucosyltransferase VI behandelte, wodurch doppelt soviel sLe^x gebildet wurde. Diese neue Substanz wurde von ihm sCR1-S/F genannt. Sowohl die Pharmakokinetik, als auch die Bindung an E-Selektin, wurde hierdurch verbessert. Insgesamt konnte jedoch noch nicht der genaue Mechanismus der

Wirkung von sCR1sLe^x erklärt werden und die Ergebnisse zwischen in vitro und in vivo Versuchen variieren stark.

Zeisig et al. konnte 2004 durch ein sterisch stabilisiertes Liposom mit einem sLe^x Liganden am Ende einer Polyethylenglycol (PEG) Seitenkette (sLe^x-PEG-Liposom E) eine in vitro Adhäsionshemmung von HT29 Kolon- und Lewis Lungen Karzinomzellen um 60-80% erreichen. Der Vorteil von Liposomen ist ihre hohe Flexibilität. Hierdurch können sie an ihrer Oberfläche Cluster ausbilden und multivalente Liganden Interaktionen ausbilden.

Eine ökonomischere Form der sLe^x Synthese durch Bildung des Lactosamin-Hauptgerüsts als erstes und mittels eines Wechsels von der Benzyl- auf eine Acetylschutzgruppe wurde von Filser et al 2007 entwickelt. Durch Verwendung eines Glykopeptides mit einer (S)-cyclohexyl Milchsäure, anstelle einer Salinsäure, konnte trotz der Verwendung einer stabilen L-Galaktose die E-Selektin Hemmung gesteigert werden.

Verschiedenste Arbeitsgruppen entwickelten sLe^x-Analoga. Girard et al. und Kaila et al. erstellten -unabhängig voneinander- 2005 Kohlenhydrat unabhängige sLe^x-Analoga her, basierend auf Chinasäure anstelle von Fucose. Die Herstellung ist weniger aufwendig und es findet eine E- und P-Selektin Adhäsionshemmung statt. Kaila et al. konnte zusätzlich noch eine Reduktion von maximal 49% des Leukozyten Rollings im Mausmodell nachweisen. Ein weiteres nicht Kohlenhydrat sLe^x-Analoga ist Efomycin M (Schön et al., 2002), welches sich in präklinischen Studien befindet. Im Tiermodell konnte eine signifikante Leukozyten Adhäsionshemmung erreicht werden und in experimentellen Studien zeigten sich gute Resultate. Nicht Kohlenhydrat Strukturen wirken über eine Imitierung der räumlichen Struktur von sLe^x.

Für das sLe^x-Analogon TBC1269, ein mannosyliertes Diphenyldimer, konnte bei totaler Leberischämie und Reperfusion in Ratten ein protektiver Effekt nachgewiesen werden (Palma-Vargas et al., 1997). Es hemmt die Bindung aller Selektine, was von Vorteil ist, da es so an allen Punkten der Selektin vermittelten Adhäsion einwirken kann. Seine gute Wirksamkeit wird durch additive Bindungsinteraktionen mit einer einzelnen Selektin-lectin Domäne

verursacht (Kogan et al., 1998). Es wird momentan in einer Phase II Studie unter dem Namen Biomanosis für die Behandlung von Asthma und Psoriasis getestet (Aydt und Wolff, 2002). In ersten klinischen Studien konnte bei Psoriasis Patienten eine Reduktion der epidermalen Verbreiterung und der Lymphozyteninfiltration nachgewiesen werden (Friedrich et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit sLe^x abhängige Selektin Adhäsion zu verhindern ist die Unterbrechung der sLe^x Synthese. Da einige Tumore sLe^x an ihrer Zelloberfläche exprimieren, ist dies eine Möglichkeit Metastasierung im weiteren Verlauf der Erkrankung zu verhindern. Sarkat et al gelang es 1997 durch GlcNac β 1-3Gal-NM die Expression von sLe^x auf der Zelloberfläche von Glykokonjugaten um bis zu 50% zu hemmen und Zerfoui et al. gelang dies 2000 durch eine H-Typ α (1,2) Fucosyltransferase, wodurch eine Hemmung der E-Selektin Adhäsion auftrat. Die Behandlung von Adenokarzinomzellen mit dem preacetylierten Disaccharid AcGnG-NM bewirkt eine Reduktion von Lungenmetastasen im Mausmodell (Fuster et al., 2003).

4.5. Ausblick

Die Wirksamkeit von hLysII/IV-FucTVI sollte in weiteren in-vitro Versuchen, z.B. einem Flußassay, bestätigt und danach in in-vivo Tests in Tierversuchen, z.B. an einem orthotopen Magentumormodell und an Mäusen mit induzierter Colitis ulcerosa getestet werden. Die unterschiedlichen Glykosylierungsstellen der Lysozymmutanten und das Lysozym sollten auf ihre Eigenschaften und Effektivität bei der Selektinblockade untersucht werden. Dies kann durch FACE, MALD-TOF Analyse und Adäsionsassays überprüft werden. Des weiteren sollte die Expression von hLysII/IV-FucTVI gesteigert und das Aufreinigungsverfahren verbessert werden. Durch die Verwendung eines 3' oder 5'His-Tags könnte die Aufreinigung vereinfacht und effektiviert werden.

5. Zusammenfassung

In CHO-FucTVI- Zellen wurde hLysII/IV stabil transfiziert, mit Puromycin selektioniert und hLysII/IV-FucTVI von den stabil transfizierten CHO-FucTVI-Zelle überexprimiert. Durch Immunaффinitätschromatographie und Ultrafiltration wurde das überexprimierte hLysII/IV-FucTVI aufgereinigt und aufkonzentriert. Durch den Lysozymtest nach Osserman und Lawlor und einen ELISA konnte die Lysozymmenge in den unterschiedlichen Schritten bestimmt werden. Im anschließenden Zelladhäsionsassay konnten bei Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml hLysII/IV-FucTVI signifikante Reduktionen der Zelladhäsion von U937- Zellen an HUVEC- Zellen festgestellt werden. Die ermittelte mittlere Hemmkonzentration (IC₅₀) von hLysII/IV-FucTVI liegt bei $7 \cdot 10^{-12}$ M. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 30 kDa der Menge von 0,21 ng/ml und hLysII/IV-FucTVI wäre damit der stärkste bisher bekannte E-Selektin-Antagonist. In dieser Funktion könnte hLysII/IV-FucTVI im Rahmen einer antiinflammatorischen oder antineoplastischen Therapie eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abbitt, K., Nash, G. (2003) Rheological properties of the blood influencing selectin-mediated adhesion of flowing leukocytes. *AJP- Heart* 285:H229-H240

Alon, R., Feizi, T., Yuen, C.-T., Fuhlbrigge, Springer, T. (1995) Glycolipid Ligands For Selectins Support Leukocyte Tethering and Rolling Under Physiologic Flow Conditions. *J. Immunol.* 154: 5356-5366

Alon, R., Kassner, P., Carr, M., Finger, E., Hemler, M., Springer, T. (1995) The Integrin VLA-4 Supports Tethering and Rolling in Flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* 128: 1243-1253

Alon, R., Fuhlbrigge, R., Finger, E., Springer, T. (1996) Interactions through L-selectin between Leukocytes and Adherent Leukocytes Nucleate Rolling Adhesions on Selectins and VCAM-1 in Shear Flow. *J. Cell Biol.*, 135: 849-865

Aydt, E., Wolff, G. (2003) Development of Synthetic Pan-Selectin Antagonists: A New Treatment Strategy for Chronic Inflammation in Astma. *Pathobiology* 70: 297-301

Battaglia, A., Tirasacchi, A.: Modificazioni ematologiche nelle neoplasie maligne trattate con lisozima. (1964) In: „Atti del III Simposium Internazionale sul Lisozima di Leming“, Vol I, sez IV, p84, Societa Prodotti Antibiotici ed.

Becker, D.J., Lowe, J.B. (1999) Leukocyte adhesion deficiency type II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1455: 193-204

Ben- Baruch, A., Michiel, D., Oppenheim, J. (1995) Signals and Receptors Involved in Recruitment of Inflammatory Cells. *J. Biol. Chem.* 270: 11703-11706

Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone Jr. M.A., Seed, B. (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243 (4895): 1160-1165

Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M. (1993) Selectins. *J Clin Invest* 91: 379-387

Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., Sarma, V. R. (1965) Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* 206: 757-761

Booth, D.R., Pepeys, M.B., Hawkins, P.N. (2000) A novel variant of human lysozyme (T70N) is common in the normal population. *Hum. Mutat.* 16: 180

Bordin, S., Young, E. T. T. (1980) Transient lysozymuria during sarcoma I tumor rejection. *Cell. Immunol.* 54: 87-97

Briskin, M. J., McEvoy, L. M., Butcher, E. C. (1993) MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* 363: 461-464

Bunting, M., Harris, E.S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. (2002) Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving β_2 integrins and selectin ligands. *Curr. Opin. Hematol.* 9: 30-35

Carlsson, S.R., Roth, J., Piller, F., Fukuda, M. (1988) Isolation and Characterization of Human Lysosomal Membrane Glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* 263: 18911-18919

Castellari, S., Gardini, G. F. (1964) Azione del lisozima nei processi neoplastici associati a necrosi. In: „Atti del III Simposium Internazionale sul Lisozima di Leming“, Milano, Vol I, sez IV, p84, Societa Prodotti Antibiotici ed.

Chandrasekaran, E.V., Davilo, M., Nixon, D., Mendicino, J. (1984) Structures of the Oligosaccharide Chain of Two Forms of α_1 -Acid Glycoprotein purified from Liver Metastases of Lung, Colon, and Breast Tumors. *Can. Research* 44: 1557-1567

Chen, W.-S., Chang, H.-Y., Li, C.-P., Liu, J.M., Huang, T.-S. (2005) Tumor β -1,4-Galactosyltransferase IV Overexpression Is Closely Associated with Colorectal Cancer Metastasis and Poor Prognosis. *Clin. Cancer Res.* 11: 8615-8622

Childs, R.A., Feizi, T., Fukuda, M., Hakomori, S.I. (1978) Blood-group-I activity associated with band 3, the major intrinsic membrane protein of human erythrocytes. *Biochem. J.* 173: 333-336

Childs, R.A., Dalchau, R., Scudder, P., Hounsell, E.F., Fabre, J.W., Feizi, T. (1983) Evidence for the Occurrence of O-Glycosidically linked Oligosaccharides of Poly-N-Acetyllactosamine Type on the Human Leucocyte Common Antigen. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 110: 424-431

Cole, B.C., Araneo, B., Sullivan, G. (1986) Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from mycoplasma arthritidis. IV. Murine T hybridoma cells exhibit differential accessory cell requirements for activation by M. arthritidis T cell mitogen, concanavalin A, or hen egg-white lysozyme. *J. Immunol.* 136: 3572-3578

Cummings, R. D., Kornfeld, S. (1984) The distribution of repeating (Gal β 1,4GlcNAc β 1,3) sequences in asparagine-linked oligosaccharides of the mouse lymphoma cell lines BW5147 and PHAR 2.1. *J. Biol. Chem.* 259: 6253-6360

Demetriou, M., Nabi, I. R., Coppolino, M., Dedhar, S., Dennis, J. W. (1995) Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J. Cell. Biol.* 130: 383-392

Dennis, J.W., Laferte, S. (1989) Oncodevelopmental Expression of – GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β 1- Branched Asparagine-linked Oligosaccharides in Murine Tissues and Human Breast Carcinomas. *Cancer Res.* 49: 945-950

Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougères, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., Springer, T.A. (1990) ICAM-1 (CD54): A Counter-Receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* 111: 3129-3139

DiVietro, J.A., Smith, M.J., Smith, B.R.E., Petruzzelli, L., Larson, R.S., Lawrence, M.B. (2001) Immobilized IL-8 Triggers Progressive Activation of Neutrophils Rolling In Vitro on P-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1. *J. Immunol.* 167: 4017-4025

Duncan, G.S., Andrew, D.P., Takimoto, H., Kaufman, S., Yoshida, H., Spellberg, J. (1999) Genetic Evidence for Functional Redundancy of Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1): CD31-Deficient Mice Reveal PECAM-1-Dependent and PECAM-1-Independent Functions. *J. Immunol.* 162: 3022-3030

Dunne, J.L., Ballantyne, C.M., Beaudet, A., Ley, K. (2002) Control of leukocyte rolling velocity in TNF- α -induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 99: 336- 341

Fahlgren, A., Hammarström, S., Danielsson, A., Hammarström, M.-L. (2003) Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 131: 90-101

Filser, C., Kowalczyk, D., Jones, C., Wild, M.K., Ipe, U., Vestweber, D., Kunz, H. (2007) Synthetic Glycopeptides from the E-Selectin Ligand 1 with Varied Sialyl Lewis^x Structure as Cell-Adhesion Inhibitors of E-Selectin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46: 2108-2111

Fleming, A. (1922) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. B* 93: 306

Friedrich, M., Bock, D., Philipp, S., Ludwig, N., Sabat, R., Wolk, K., Schroeter-Maas, S., Aydt, E., Kang, S., Dam, T.N., Zahlten, R., Sterry, W., Wolff, G. (2006) Pan-selectin antagonism improves psoriasis manifestation in mice and man. *Arch. Dermatol. Res.* 297: 345-351

Fukuda, M., Dell, A., Oates, J.E., Fukuda, M.N. (1984) Structure of Branched Lactosaminoglycan, the Carbohydrate Moiety of Band 3 Isolated from Adult Human Erythrocytes. *J. Bio. Chem.* 259: 8260-8273

Fukuda, M., Bothner, B., Ramsamooj, P., Dell, A., Tiller, P.R., Varki, A., Klock, J.C. (1985) Structures of Sialylated Fucosyl Polylactosaminoglycans Isolated from Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *J. Biol. Chem.* 260. 12957-12967

Fukuda, M. (1996) Possible Roles of Tumor-associated Carbohydrate Antigens. *Cancer Res.* 56: 2237-2244

Fuster, M.M., Brown, J.R., Wang, L., Esko, J.D. (2003) A disaccharid precursor of sialyl lewis x inhibits metastatic potential of tumor cells. *Cancer Research* 63: 2775-2781

Futamura, N., Nakamura, S., Tatematsu, M., Yamamura, Y., Kannagi, R., Hirose, H. (2000) Clinicopathologic significance sialyl Le^x expression in advanced gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* 83: 1681-1687

Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E., Lim, Y.-C., Yoshida, M., Ding, H., Gimbrone Jr, M. (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718-723

Girard, C., Dourland, J., Savarin, A., Surcin, C., Leue, S., Escriou, V., Largeau, C., Herscovici, J., Scherman, D. (2005) Sialyl Lewis^x analogs based on a quinic acid scaffold as the fucose mimic. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 3224-3228

Goldsmith, H.L., Spain, S. (1984) Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. *Microvas. Res.* 27: 204-222

Greenberg, A.W., Brunk, D.B., Hammer, D.A. (2000) Cell-Free Mediated by L-Selectin and Sialyl Lewis^x Reveals the Shear Threshold Effect. *Biophysical Journal* 79: 2391-2402

Haas, M., Moolenaar, F., Meijer, D.K.F., de Zeeuw, D. (2002) Specific Drug Delivery to the Kidney. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 16: 489-496

Handerson, T., Pawelek, J.M. (2003) β 1,6-branched Oligosaccharide and Coarse Vesicles: A Common, Pervasive Phenotype in Melanoma and Other Human Cancers. *Cancer Res.* 63: 5363-5369

Handerson, T., Camp, R., Harigopal, M., Rimm, D., Pawelek, J. (2005) β 1,6-branched Oligosaccharides Are Increased in Lymph Node Metastases and Predict Poor Outcome in Breast Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 11: 2969-2973

Hemmerich, S., Bertozzi, C. R., Leffler, H., Rosen, S. D. (1994) Identification of the sulfated monosaccharides of GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin. *Biochemistry* 33: 4820-4829

Henderson, R.B., Lim, L., Tessier, P., Gavins, F., Mathies, M., Perretti, M., Hogg, N. (2001) The Use of Lymphocyte Function-associated Antigen (LFA)-1-deficient Mice to Determine the Role of LFA-1, Mac-1, and $\alpha 4$ Integrin in the Inflammatory Response of Neutrophils. *J. Exp. Med.* 194: 219-226

Hession, C., Osborn, L., Goff, D., Chi-Rosso, G., Vassallo, C., Pasek, M. (1990) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: direct expression cloning and functional interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1673-1677

Hiroshi, S., Yoshiki, S., Masae, A., Nozomi, K., Tomolisa, I. (1980a) Anticancer pharmaceuticals containing lysozyme. *Jpn. Kokai. Tokkio. Koko. Patent* 80. 33, 409 (Cl. A61K37/54), Appl. 78/104, 846

Hiroshi, S., Yoshiki, S., Masae, A., Nozomi, K., Tomolisa, I., Yasuhno, K., Tomiaki, M., Juzaburo, N. (1980b) Pharmaceutical containing lysozyme of immune enhancement. *Jpn. Kokai. Tokkio. Koko. Patent* 80. 33, 408 (Cl. A61K37/54), Appl. 78/104, 845

Holmes, E. H., Hakomori, S.-I., Ostrander, G. K. (1987) Synthesis of Type 1 and 2 Lacto Series Glycolipid Antigens in Human Colonic Adenocarcinoma and Derived Cell Lines Is Due to Activation of a Normally Unexpressed $\square 1$ -3N-Acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 262:15649-15658

Horst, M., Harth, N., Hasilik, A. (1991) Biosynthesis of Glycosylated Human Lysozyme Mutants. *J. Biol. Chem.* 266: 13914-13919

Huang, J., Kim, L.J., Mealey, R., Marsh Jr., H.C., Zhang, Y., Tenner, A.J., Connolly Jr., E.S., Pinsky, D.J (1999) Neuronal Protection in Stroke by an sLex-Glycosylated Complement Inhibitory Protein. *Science* 285: 595-599

Ibrahim, H.R., Aoki, T., Pellegrini, A. (2002) Strategies for New Antimicrobial Proteins and Peptides: Lysozyme and Aprotinin as Model Molecules. *Curr. Phar. Des.* 8: 671-693

Ichikawa, T., Nakayama, J., Sakura, N., Hashimoto, T., Fukuda, M., Fukuda, M.N., Taki, T. (1999) Expression of N-acetyllactosamine and β 1,4-Galactosyltransferase (β 4GalT-I) During Adenoma-Carcinoma Sequence in the Human Colorectum. *J. Histochem. Cystochem.* 47: 1593-1601

Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Fukushi, Y., Palekar, A., Phelps, P., Shamsuddin, A., Trump, B., Hakomori, S.-I., Kim, Y. (1986) Lewis^x- and Sialylated Lewis^x-related Antigen Expression in Human Malignant and Nonmalignant Colonic Tissues. *Cancer Res.* 46: 2627-2632

Jolles, P. (1976) A possible physiological function of lysozyme. *Biomedicine* 25: 275-276

Jongstra-Bilen, J., Janmey, P.A., Hartwig, J.H., Galea, S., Jongstra, J. (1992) The Lymphocyte-specific Protein LSP1 Binds to F-actin and to the Cytoskeleton Through Its COOH-terminal Basic Domain. *J. Exp. Med.* 118: 1443-1453

Jorgensen, T., Berner, A., Kaalhus, O., Tveter, K.J., Danielsen, H., Bryne, M. (1995) Up-Regulation of the Oligosaccharide Sialyl Lewis^x: A New Prognostic Parameter in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* 55: 1817-1819

Kaila, N., Somers, W.S., Thomas, B.E., Thakker, P., Janz, K., DeBernardo, S., Tam, S., Moore, W.J., Yang, R., Wrona, W., Bedard, P., Crommie, D., Keith Jr., J.C. (2005) Quinic Acid Derivates as Sialyl Lewis^x-Mimicking Selectin Inhibitors: Design, Synthesis, and Crystal Structure in Complex with E-Selektin. *J. Med. Chem.* 48: 4346-4357

Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., Kimura, N. (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* 95: 377-384

Kannagi, R. (1997) Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconjugate J.* 14: 577-584

Kim, M.-K., Brandley, B.K., Anderson, M.B., Bochner, B.S. (1998) Antagonism of Selectin-Dependent Adhesion of Human Eosinophils and Neutrophils by Glycomimetics and Oligosaccharide Compounds. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 836-841

Kim, Y.J., Varki, A. (1997) Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate J.* 14: 569-576

Kogan, T.P., Dupre, B., Bui, H., McAbee, K.L., Kassir, J.M., Scott, I., Hu, X., Vanderslice, P., Beck, P., Dixon, R.A.F. (1998) Novel Synthetic Inhibitors of Selectin-Mediated Cell Adhesion: Synthesis of 1,6-Bis[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2-r-D-mannopyranosyloxy)phenyl]hexane (TBC1269). *J. Med. Chem.* 41: 1099-1111

Kooistra, T., Diursma, A. M., Bouma, J. M. W., Graber, M. (1980) Effect of size and charge in endocytosis of lysozyme derivatives by sinusoidal rat liver cells in vivo. *Biochem. Biophys. Acta* 631: 439-450

Koscielak, J., Miller-Podraza, H., Krauze, R., Piasek, A. (1976) Isolation and characterization of poly(glycosyl)ceramides (megaloglycolipids) with A, H and I blood-group activities. *Eur. J. Biochem.* 71: 9-18

Krause, T., Turner, G.A. (1999) Are selectins involved in metastasis? *Clin. Exp. Metastasis* 17: 183-192

Kuijpers, T.W., van Lier, R.A.W., Hamann, D., de Boer, M., Thung, L.Y., Weening, R.S., Verhoeven, A.J., Roos, D. (1997) Leukocytes Adhesion Deficiency Type 1 (LAD-1)/Variant. *J. Clin. Invest.* 100: 1725-1733

Kyriakides, C., Wang, Y., Austen Jr., W.G., Favuzza, J., Kobzik, L., Moore Jr., F.D., Hechtman, H.B. (2001a) Moderation of skeletal muscle reperfusion injury by a sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281: 224-230

Kyriakides, C., Wang, Y., Austen Jr., W.G., Favuzza, J., Kobzik, L., Moore Jr., F.D., Hechtman, H.B. (2001b) Sialyl Lewisx hybridized complement receptor type 1 moderates acid aspiration injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281: 1494-1499

Laferte, S., Dennis, J. W. (1989) Purification of two glycoproteins expression β 1-6 branched Asn-linked oligosaccharides from metastatic tumor cells. *Biochem. J.* 259: 569-576

Lasky, L.A. (1995) Selectin-Carbohydrate Interactions and the Initiation of the Inflammatory Response. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 113-139

Lawrence, M.B., Springer, T.A. (1993) Neutrophils Roll on E-Selectin. *J. Immunol.* 151: 6338-6346

Lee, N., Wang, W.-C., Fukuda, M. (1990) Granulocytic Differentiation of HL-60 Cells Is Associated with Increase of Poly-N- acetyllactosamine in Asn-linked Oligosaccharides Attached to Human Lysosomal Membrane Glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 265: 20476-20487

- Lemaire, S., Derappe, C., Michalski, J.-C., Aubery, M., Neel, D.** (1994) Expression of β 1-6-Branched N-Linked Oligosaccharides Is Associated with Activation in Human T4 and T8 Cell Populations. *J. Biol. Chem.* 269: 8069-8074
- Ley, K., Allietta, M., Bullard, D., Morgan, S.** (2005) Importance of E-Selectin for Firm Leukocyte Adhesion In Vivo . *Circ. Res.* 1998: 287-294
- Ley, K., Gaehtgens, P., Fennie, C., Singer, M.S., Lasky, L. A., and Rosen, S. D.** (1991) Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 77: 2553-2555
- Liao, F., Ali, J., Greene, T., Muller, W.** (1997) Soluble Domain 1 of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) Is Sufficient to Block Transendothelial Migration In Vitro and In Vivo. *J. Exp. Med.* 185: 1349-1357
- Liu, L., Cara, D.C., Kaur, J., Raharjo, E., Mullaly, S., Jongstra-Bilen, J., Jongstra, J., Kubes, P.** (2005) LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration. *J. Exp. Med.* 201: 409-418
- Lühn, K., Wild, M.K., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., Vestweber, D.** (2001) The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nature Genetics.* 28: 69-72
- Majuri, M.-L., Mattila, P., Renkonen, R.** (1992) Recombinant E-selectin-protein mediates tumor cell adhesion via sialyl-Lea and sialyl-Lex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 1376-1382
- Mason, D.Y., Taylor, C.R.** (1975) The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissue. *J. Clin. Path.* 28: 124-132

Mathew, E.C., Shaw, J.M., Bonilla, F.A., Law, S.K.A., Wright, D.A. (2000) A novel point mutation in CD18 causing the expression of dysfunctional CD11/CD18 leucocytes integrins a patient with leukocyte adhesion deficiency (LAD). *Clin. Exp. Immunol.* 121: 133-138

McEver, R. P. (1989) GMP-140, a platelet alpha-granule membran protein, is also synthesized by endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84: 92-99

Melcher, R., Grosch, H.-W., Grosse, O., Hasilik, A. (1998) Increased elongation of N-acetyllactosamine repeats in doubly glycosylated lysozyme with a particular spacing of the glycosylation sites. *Glycoconj. J.* 15: 987-993

Melcher, R., Hillebrand, A., Bahr, U., 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

Melcher, R., Grosch, H.-W., Hasilik, A. (1999) Plasmid vectors with a 5'-hybrid intron facilitates high-level glycoprotein expression in CHO-cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1575: 49-53

Mizoguchi, A., Maeda, S., Shiraishi, N., Yoshima, H., Sugiyama, T. (1986) Cell Surface Asparagin-linked Sugar Chains of Human Early Myeloblastic Leukemic Cells (KG-1a). *Cancer Res.* 46: 29-37

Möller, D. (2006) Zelladhäsionsmodifikation durch doppelt glykosylierte humane Lysozymmutanten. Dissertation. Jul.- Maximilian Univ. Würzburg

Mulligan, M.S., Warner, R.L., Rittershaus, C.W., Thomas, L.J., Ryan, U., Roreman, K.E., Crouch, L.D., Till, G.O., Ward, P.A. (1999) Endothelial Targeting and Enhanced Antiinflammatory Effects of Complement Inhibitors Possessing Sialyl Lewis^x Moieties. *J. Immunol.* 162: 4952-4959

Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matushita, Y., Irimura, T. (1993) Increased Expression of Sialyl Lewis^x Antigen Correlates with Poor Survival in Patients with Colorectal Carcinoma: Clinicopathological and Immunohistochemical Study. *Cancer Res.* 53: 3632-3637

Namba, Y., Hidaka, Y., Taki, K., Morimoto, T. (1981) Effect of oral administration of lysozyme or digested bacterial cell wall on immunostimulation in guinea pigs. *Infect. Immun.* 31: 582-583

Norman, K.E., Anderson, G.P., Kolb, H.C., Ley, K., Ernst, B. (1998) Sialyl Lewis^x (sLe^x) and sLe^x Mimetic, CGP69669A, Disrupt E-Selectin –Dependent Leukocyte Rolling In Vivo. *Blood* 91: 475-483

Ostermann, G., Weber, K., Zerneck, A., Schröder, A., Weber, C. (2002) JAM-1 is a ligand of the β_2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat. Immunol.* 3: 151-158

Palma-Vargas, J.M., Toledo-Pereyra, L., Dean, R.E., Harkema, J.M., Dixon, R.A.F., Kogan, T.P. (1997) Small-Molecule Selectin Inhibitor Protects Against Liver Inflammatory Response After Ischemia and Reperfusion. *J. Am. Coll. Surg.* 185: 365-372

Pearlstein, E., Salk, P.L., Yogeewaran, G., Karpatkin, S. (1980) Correlation between spontaneous metastatic potential, platelet-aggregating activity of cell surface extracts, and cell surface sialylation in 10 metastatic-variant derivatives of rat renal sarcoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4336-4339

Pepys, M. B., Hawkins, P. N., Booth, D. R., Vigushin, D. M., Tennent, G. A., Soutar, A. K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C. C. F., Terry, C. J., Feest, T. G., Zalin, A. M., Hsuan, J. J. (1993) Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362: 553-557

Peters, W.B., Kruse, U., Pollwein, R., Grzeschik, K.-H., Sippel, A.E. (1989) The human lysozyme gene. *Eur. J. Biochem.* 182: 507-516

Piller F., Piller V., Fox R. I., Fukuda M. (1988) Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 263: 15146-15150

Polley, M.J., Phillips, M.L., Wayner, E., Nudelman, E., Singhal, A., Hakomori, S.-I., Paulson, J. (1991) CD62 and endothelial cell-leucocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6224-6228

Ramachandran, V., Yago, T., Epperson, T.K., Kobzdej, M., Nollert, M., Cummings, R., Zhu, C., McEver, R.P. (2001) Dimerization of a selectin and its ligand stabilizes cell rolling and enhances tether strength in shear flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10166-10171

Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E., Golub, T.R. (2002) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *nature genetics* 33: 49-54

Rittershausen, C.W., Thomas, L.J., Miller, D.P., Picard, M.D., Geoghegan-Barek, K., Scesney, S., Henry, L.D., Sen, A., Bertino, A.M., Hannig, G., Adari, H. (1999) Recombinant Glycoproteins That Inhibit Complement Activation and Also Bind the Selectin Adhesion Molecules. *J. Biol. Chem.* 274: 11237-11244

Rubio, C.A. (2003) Colorectal adenomas produce lysozyme. *Anticancer Res.* 23: 5167- 5171

Rubio, C.A. (2002) Lysozyme-rich muciphages surrounding colorectal adenomas. *Anticancer Res.* 22: 879- 881

Saitoh O., Wang W. C., 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

Salton, M.R.J. (1957) The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 21: 82-100

Sarkar, A.K., Rostand, K.S., Jain, R.K., Matta, K.L., Esko, J.D. (1997) Fucosylation of Disaccharide Precursors of Sialyl Lewis^x Inhibit Selectin-mediated Cell Adhesion. *J. Chem. Biol.* 272: 25608-25616

Sava, G. (1996) Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes. *EXS* 75: 433-449

Sawada, R., Tsuboi, S., Fukuda, M. (1994) Differential E-selectin-dependent Adhesion Efficiency in Sublines of a Human Colon Cancer Exhibiting Distinct Metastatic Potentials. *J. Biol. Chem.* 269: 1425-1431

Schmid, R.A., Hillinger, S., Hamacher, J., Stammberger, U. (2001) TP20 Is Superior to TP10 in Reducing Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Lung Grafts. *Transplant. Proc.* 33: 948-949

Schön, M.P., Krahn, T., Schön, M., Rodriguez, M.-L., Antonicek, H., Schultz, J.E., Ludwig, R., Zollner, T., Bischoff, E., Bremm, K.-D., Schramm, M. (2002) Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. *Nat. Med.* 8: 366-372

Scott, J.E. (1994) On the poly lactose nature of chondroitin and keratan sulphates. *Biochem. J.* 298: 221-222

Seelentag, W.K.F., Li, W.-P., Schmitz, S.-F., Metzger, U., Aeberhard, P., Heitz, P.U., Roth, J. (1998) Prognostic Value of β 1,6-Branched Oligosaccharides in Human Colorectal Carcinoma. *Cancer Res.* 58. 5559-5564

Sigal, A., Bleijs, D.A., Grabovsky, V., van Vliet, S., Dwir, O., Figdor, C., van Kooyk, Y., Alon, R. (2000) The LFA-1 Integrin Supports Rolling Adhesions on ICAM-1 Under Physiological Shear Flow in a Permissive Cellular Environment. *J. Immunol.* 165: 442-452

Simon, S.I., Hu, Y., Vestweber, D., Smith, C.W. (2000) Neutrophil Tethering on E-Selectin Activates β ₂ Integrin Binding to ICAM-1 Through a Mitogen – Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *J. Immunol.* 164: 4348-4358

Shrake A., Rupley J. A. (1980) Oxindolealanine-62 lysozyme: equilibrium, calorimetric, and kinetic studies of the reaction with N-acetylglucosamine oligosaccharides. *Biochemistry* 19: 4044-4051

Thomas, L.J., Panneerselvam, K., Beattie, D.T., Picard, M.D., Xu, B., Rittershaus, C.W., Marsh Jr., H.C., Hammond, R., Qian, J., Stevenson, T., Zopf, D., Bayer, R. (2004) Production of a complement inhibitor possessing sialyl Lewis X moieties by in vitro glycosylation technology. *Glycobiology* 14: 883-893

Thompson, R.D., Noble, K., Larbi, K., Dewar, A., Duncan, G., Mak, T., Nourshargh, S. (2001) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leucocyte migration through the perivascular basement membran. *Blood* 97: 1854- 1860

Tsuji, T., Irimura, T., Osawa, T. (1980) The Carbohydrate Moiety of Band-3 Glycoprotein of Human Erythrocyte Membranes. *Biochem. J.* 187: 677-686

Tsukida, T., Moriyama, H., Kurokawa, K., Achiha, T., Inoue, Y., Kondo, H. (1998) Studies on Selectin Blockers. 7. Structure-Activity Relationship by Sialyl Lewis X Mimetic Based on Modified Ser-Glu Dipeptides. *J. Med. Chem.* 41: 4279-4287

Tu, L., Chen, A., Delahunty, M., Moore, K., Watson, S., McEver, R., Tedder, T. (1996) I-Selectin Binds to P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 on Leukocytes. *J. Immunol.* 157: 3995-4004

Ura, H., Denno, R., Hirata, K., Yamaguchi, K., Yasoshima, T., Shishido, T. (1997) Close Correlation between increased Sialyl-Lewis^x Expression and Metastasis in Human Gastric Carcinoma. *World J. Surg.* 21: 773-776

van den Eijnden, D. H., Koenderman, A. H. L., Schiphorst, W. E. C. M. (1988) Biosyntheses of Blood Group i-active Polylactosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 263, 12461-12471

van de Vijver, M.J., He, Y., van't Veer, L., Dai, H., Hart, A., Voskuil, D., Schreiber, G.J., Peterse, J., Roberts, C., Marton, M., Parrish, M., Atsma, D., Wittveen, A. (2002) A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 347: 1999-2009

van't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y., Hart, A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G., Kerkhoven, R., Roberts, C. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *nature* 415: 530-536

Varki, A. (1994) Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7390-7397

Verhamme, I. (1985) Klinisch en farmaceutisch belang van lysozyme. *Farm. Tijdschr. Belg.* 62: 339-346

Warren, G.H., Gray, J., Bartell, P. (1955) The lysis of *Pseudomonas aeruginosa* by lysozyme. *J. Bacteriol.* 70: 614-619

Xia, L., Sperandio, M., Yago, T., McDaniel, J.M., Cummings, R., Pearson-White, S., Ley, K., McEver, R.P. (2002) P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocytes tethering to E-selectin under flow. *J. Clin. Invest.* 109: 939-950

Yan, H., Hancock, R.E.W. (2001) Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1558-1560

Yoshimura K, Toibana A, Nakahama K. (1988) Human lysozyme: sequencing of a cDNA, and expression and secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150: 794-801

Zacharowski, K., Otto, M., Hafner, G., Marsh Jr., H.C., Thiemermann, C. (1999) Reduction of myocardial infarct size with sCr1sLe^x, an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis x. *Br. J. Pharmacol.* 128: 945-952

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. *Biochim. Biophys. Acta.* 1660: 31-40

Zerfaoui, M., Fukuda, M., Sbarra, V., Lombardo, D., El-Battari, A. (2000) $\alpha(1,2)$ -Fucosylation prevents sialyl Lewis x expression and E-selectin-mediated adhesion of fucosyltransferase VII-transfected cells. *Eur. J. Biochem.* 267: 53-60

Zöllner, O., Lenter, M.C., Blanks, J., Borges, E., Steegmaier, M., Zerwes, H.-G., Vestweber, D. (1997) L-Selectin from Human, but Not from Mouse Neutrophils Binds Directly to E-Selectin. *J. Cell Biol.* 136: 707-716

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Asn	Asparagin
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorecein
bp	Basenpaar
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CHO- Zellen	chinese hamster ovary cells
CMV	Cytomegalovirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethalendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
et al	und andere („et aliter“)
FBS	fetal bovine serum
Fuc T	Alpha (1,3)- Fucosyltransferase
Gal	Galaktose
GDP	Glukosediphosphat
GlcNac	N- Acetylglucosamin
HCL	Chlorwasserstoff
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2,ethansäure]
hLys	humanes Lysozym
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
ICAM	intracellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAM	Junctional adhesion molecule
kDa	Kilodalton
LAD	Leukozyten Adhäsion Defizienz
lamp	lysosomal membrane proteins
LFA	leukocyte function-associated antigen
LSP	lymphocyte specific protein
Lys	Lysozym
MEM	modified eagle medium
NAG	N- Acetylglucosamin
NAM	N- Acetylglucosaminsäure
NaPh	Natriumphosphat
PBS	phosphat buffered saline
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PSGL	P-Selektin Glykoprotein Ligand
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and secreted
rcf	relative centrifugal force
SDS	Natriumdodecylsulfat
sLe ^a	syalyl Lewis Antigen a

sLe ^x	syalyl Lewis Antigen x
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit= Enzymeinheit
U937	Humane histocytische Lymphomzelllinie
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	very late Antigen

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktion von Leukozyten am aktivierten Endothel.....	4
Abbildung 2: 3D-Struktur von hLysII/IV, mit den N-Glykosylierungsstellen 49(IV) und 68 (II)	8
Abbildung 3: Plasmidvektor pMCI hLysII/IV	14
Abbildung 4: Vergleich der Konzentration von hLysII/IV-FucTVI nach der Immunaффinitätschromatographie und der Ultrafiltration	27
Abbildung 5: Adhäsionsassay mit unterschiedlichen hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen	29
Abbildung 6: Durchschnittliche prozentuale Adhäsion von hLysII/IV-FucTVI in ansteigenden Konzentrationen	30
Abbildung 7: durchschnittliche prozentuale Adhäsionshemmung von unterschiedlichen hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen	30
Abbildung 8: Formel zur Bestimmung der nichtlinearen Regression	31
Abbildung 9: Nichtlineare Regressionskurve im log ₁₀	31
Abbildung 10: Bestimmung der mittleren Hemmkonzentration	32
Abbildung 11: Western-Blot von Lysozym im CHO-FucTVI Medium	33
Abbildung 12: Adhäsionsassay mit unterschiedlichen hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen	35

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: hLysII/IV-FucTVI Konzentration pro Zellklon.....	26
Tabelle 2: Lysozymkonzentrationen im CHO- Medium, Eluat und Ultrafiltration	27
Tabelle 3: Lysozymkonzentrationsveränderungen zwischen dem Ausgangsmedium, dem Eluat und nach der Ultrafiltration.....	27
Tabelle 4: Adhäsionshemmung mit unterschiedlichen hLysII/IV-FucTVI Konzentrationen	28
Tabelle 5: Bestimmung der mittleren Hemmkonzentration in M.....	32
Tabelle 6: mittlere Hemmkonzentration unterschiedlicher Selektin-Inhibitoren.	36

Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Scheppach für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung in der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg durchführen zu können,

Dr. Melcher für die Betreuung während der ganzen Zeit der Promotionsarbeit,

Herrn Weiler für seine Hilfsbereitschaft mich jederzeit bei meiner Laborarbeit zu unterstützen,

Frau Kelber für ihre tatkräftige Hilfe bei den Adhäsionsversuchen,

Frau Dusel und Frau Kuhn für die Einarbeitung in die Zellkulturen und die Unterstützung bei der Pflege der Zellkulturen,

Frau Backhaus für die Unterweisung beim Western blot

allen Mitarbeitern des gastroenterologischen Labors der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg,

und meinen Eltern für die Unterstützung und die Geduld während meines Studiums und insbesondere bei der Durchführung dieser Doktorarbeit.