

**Untersuchungen zur
funktionellen Bedeutung
von Gangliosiden
bei der E-Selektin-vermittelten
Zell-Zell-Adhäsion**

Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Biol. Andreas Werner
geb. in Lemgo

2001

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. März 1998 bis 21. Mai 2001 am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld unter der Leitung von Herrn PD Dr. J. Müthing angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, seine vielfältige Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herrn PD Dr. J. Müthing danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, seine konstruktive Diskussionsbereitschaft, die vielfältige Unterstützung und das Engagement bei der Erstellung von Veröffentlichungen sowie für das Überlassen der Gangliosidpräparationen.

Herrn Prof. E. Flaschel, Leiter des Lehrstuhls Fermentationstechnik, möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Dr. D. Lütkemeyer, Frau Dipl.-Ing. (FH) I. Poggendorf und Frau cand. Dipl.-Biochem. H. Haßelmann danke ich für die Unterstützung bei der 100 L-Kultivierung und bei der Aufarbeitung des Überstandes.

Frau cand. Dipl.-Biol. A. Alici danke ich für die Kultivierung der humanen Endothelzellen und die Durchführung zahlreicher Adhäsionstests im Rahmen ihrer Diplomarbeit, die ich anleiten durfte.

Herrn Dipl.-Chem. S. Kemminer danke ich für die Aufarbeitung der humanen Granulocytenganglioside, die vielen Anregungen und seinen Humor.

Frau Dipl.-Biochem. A. Olbrich danke ich für die Durchführung der in dieser Arbeit dargestellten HPTLC-Overlays.

Frau Dipl.-Chem. R. Lümen möchte ich für die Bereitstellung der aus der Massenspektrometrie und den HPTLC-Analysen gewonnenen Daten danken.

Herrn Dipl.-Phys. W. Metelmann danke ich für die Durchführung der an dem Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster unter der Leitung von Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić erstellten massenspektrometrischen Untersuchungen.

Frau Dipl.-Biol. N. Ameskamp möchte ich für die Einarbeitung in die chromatographischen Methoden danken.

Herrn H. Brinkmann danke ich für die präzise Anfertigung der Fließkammer sowie der baulichen Teile für den 10 L-Spinner.

Frau Dipl.-Biol. U. Brommund danke ich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Solveig für ihre pausenlose Unterstützung und ihr Verständnis während der vielen Abende und Wochenenden im Labor.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorab wie folgt publiziert bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

A. Werner, A. Schemel, J. Müthing (1999)

E-selectin mediated adhesion of HL-60 to CHO-cells under static conditions.

1st International Workshop on the SFB 549 on Macromolecular Processing and Signalling in the Extracellular Matrix, Bielefeld, Deutschland

A. Werner, J. Müthing (2000)

Involvement of gangliosides in selectin mediated adhesion of HL-60 to E-selectin transfected CHO-E cells.

20th International Carbohydrate Symposium – ICS, Hamburg, Deutschland

A. Werner, A. Olbrich, W. Metelmann, J. Peter-Katalinić, J. Müthing (2000)

Gangliosides from Human HL-60 cells: Their involvement in adhesion of HL-60 to E-selectin transfected CHO-E cells.

2nd Symposium on Vascular Biology, Münster, Deutschland

A. Werner, D. Lütkemeyer, I. Poggendorf, H. Haßelmann, J. Müthing, D. Vestweber, J. Lehmann (2001)

Pilot scale production and purification of a soluble E-selectin-IgG chimeric-protein.

Proc. 17th ESACT Meeting, From Target to Market (im Druck)

A. Werner, D. Lütkemeyer, I. Poggendorf, J. Müthing, J. Lehmann (2001)

Serum-free production of a chimeric E-selectin-IgG protein from 1 to 100 L scale: Repeated batch cultivation versus continuous spin filter perfusion.

Cytotechnology (zur Veröffentlichung eingereicht)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet habe und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

Andreas Werner

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkungen

Erklärung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Rolle des Immunsystems..... | 1 |
| 1.2 Das Hämatopoetische System..... | 2 |
| 1.3 Entzündung..... | 9 |
| 1.4 Blut als Transportmittel der zellulären Abwehr..... | 10 |
| 1.5 Die Wechselwirkung von Endothel und Leukocyten..... | 13 |
| 1.5.1 Nachahmung der inflammatorischen Wechselwirkungen <i>in vitro</i> | 22 |
| 1.6 Der Aufbau eukaryotischer Plasmamembranen..... | 25 |
| 1.7 Glykosphingolipide (GSL)..... | 28 |
| 1.7.1 Biosynthese der GSL..... | 29 |
| 1.7.2 Vorkommen und Bedeutung von GSL..... | 31 |
| 1.8 Glykoproteine..... | 33 |
| 1.8.1 Biosynthese von Proteinglykanen..... | 34 |
| 1.9 Zielsetzung der Arbeit..... | 34 |
| 1.9.1 Strategien zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens..... | 35 |

2. Material und Methoden

| | |
|--|----|
| 2.1 Die verwendeten Zelllinien..... | 36 |
| 2.1.1 HL-60..... | 36 |
| 2.1.2 K-562..... | 36 |
| 2.1.3 CHO-K1..... | 37 |
| 2.1.4 CHO-E..... | 37 |
| 2.1.5 CHO-P..... | 37 |
| 2.1.6 HUVEC..... | 37 |
| 2.1.7 CSLEX..... | 38 |
| 2.1.8 CHO-IE..... | 38 |
| 2.2 Cryolagerung der Zellen..... | 39 |
| 2.3 Kulturmedien..... | 41 |
| 2.4 Die Kultivierungssysteme..... | 43 |
| 2.4.1 T-Flaschen..... | 43 |
| 2.4.2 Die Spinner..... | 43 |
| 2.4.3 Die SuperSpinner..... | 44 |
| 2.4.4 Der 10 L-Spinner..... | 45 |
| 2.4.5 Der 5 L- und 100 L-Bioreaktor..... | 45 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 2.4.6 | Der 2 L-Perfusionsbioreaktor..... | 46 |
| 2.5 | Die Prozeßführungen..... | 47 |
| 2.5.1 | Der Batch-Prozeß..... | 47 |
| 2.5.2 | Der Perfusions-Prozeß..... | 48 |
| 2.6 | Aufreinigung der produzierten Proteine..... | 49 |
| 2.6.1 | CSLEX-Antikörper..... | 49 |
| 2.6.2 | E-Selektin-IgG-Protein..... | 50 |
| 2.7 | Humane Ganglioside..... | 50 |
| 2.7.1 | Extraktion und Isolierung von Gangliosiden..... | 51 |
| 2.7.2 | Dünnschichtchromatographie (HPTLC)..... | 52 |
| 2.7.3 | Massenspektrometrie..... | 52 |
| 2.7.4 | Insertion von Gangliosiden in Liposomen..... | 53 |
| 2.7.5 | Präparation von Gangliosid-BSA-Komplexen..... | 53 |
| 2.7.6 | Inhibition der HL-60 E-Selektin-Liganden-Biosynthese..... | 54 |
| 2.7.7 | Enzymatischer Verdau von E-Selektin-Liganden..... | 55 |
| 2.8 | Das Adhex Zellzählssystem..... | 56 |
| 2.8.1 | Das statische Adhäsionssystem in 96well Mikrotiterplatten..... | 57 |
| 2.8.2 | Das dynamische Adhäsionssystem in der Fließkammer..... | 59 |
| 2.8.3 | Berechnungsgrundlagen der Fließkammer..... | 62 |
| 2.9 | Analytik zur Zellkultur..... | 64 |
| 2.9.1 | Bestimmung der Zellzahl..... | 64 |
| 2.9.2 | Bestimmung des Zelldurchmessers mit CASY..... | 65 |
| 2.9.3 | Bestimmung der LDH-Aktivität..... | 66 |
| 2.9.4 | Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentrationen..... | 68 |
| 2.9.5 | Quantitative Bestimmung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen..... | 69 |
| 2.9.6 | Antikörpernachweis mit der ELISA-Methode..... | 70 |
| 2.9.7 | Gelelektrophorese zur Kontrolle der Proteinexpression..... | 75 |
| | 2.9.7.1 Native Gelelektrophorese..... | 76 |
| | 2.9.7.2 SDS-Gelelektrophorese..... | 77 |
| 2.9.8 | Berechnung der zellspezifischen Parameter..... | 78 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion..... | | 80 |
| 3.1 | Produktion des CSLEX-Antikörpers..... | 80 |
| 3.2 | Aufarbeitung des CSLEX-Antikörpers..... | 84 |
| 3.3 | Produktion des E-Selektin-IgG-Proteins..... | 86 |
| 3.4 | Aufarbeitung des E-Selektin-IgG-Proteins..... | 99 |
| 3.5 | Humane Hirn-, Granulocyten- und HL-60-Ganglioside..... | 100 |
| 3.5.1 | Massenspektrometrische Analyse der Gangliosidfraktionen..... | 101 |
| 3.5.2 | Detektion der E-Selektin-bindenden Ganglioside..... | 104 |
| 3.6 | Das statische Adhäsionssystem..... | 107 |
| 3.6.1 | Etablierung des Systems..... | 107 |

| | | |
|---------------------------------|---|------------|
| 3.6.2 | Zell-Zell-Adhäsion..... | 117 |
| 3.6.3 | Enzymatische Hydrolyse von E-Selektin und seinen Liganden..... | 128 |
| 3.6.4 | Maskierung der Leukocytinganglioside..... | 133 |
| 3.6.5 | Inhibition der leukocytären E-Selektin-Ligandenbiosynthese..... | 140 |
| 3.6.6 | Maskierung des E-Selektins..... | 145 |
| 3.7 | Das dynamische Adhäsionssystem..... | 153 |
| 3.7.1 | Etablierung des Systems..... | 153 |
| 3.7.2 | Zell-Zell-Adhäsion..... | 157 |
| 3.7.3 | HL-60 Rolling bei hypo-physiologischer Wandschubspannung von $0,15 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ | 157 |
| 3.7.4 | HL-60 Rolling bei physiologischer Wandschubspannung von $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ | 171 |
| 4. | Zusammenfassung..... | 185 |
| 5. | Fazit..... | 189 |
| Literaturverzeichnis | | |
| Lebenslauf | | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABTS | 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Ak | Antikörper |
| Ala | L-Alanin |
| Arg | L-Arginin |
| Asn | L-Asparagin |
| Asp | L-Aspartat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bas | Basophiler |
| BCIP | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat |
| bFGF | Basic fibroblast growth factor (engl.) |
| BFU | Burst forming unit (engl.) |
| BSA | Bovine serum albumin (engl.) |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Chloroform |
| ca. | circa |
| CAM | Cell adhesion molecule (engl.) |
| CASY | Counter and analyser system (engl.) |
| Cer | Ceramid |
| CD | Cluster of differentiation (engl.) |
| CFU | Colony forming unit (engl.) |
| CHO | Chinese Hamster Ovary (engl.) |
| CHO-E | E-Selektin transfizierte CHO Zelllinie |
| CHO-IE | E-Selektin-IgG transfizierte CHO Zelllinie |
| CMC | Critical micelle concentration (engl.) |
| CMF-PBS | Calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline (engl.) |
| Da | Dalton |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DIG | Detergent-insoluble glycolipid-enriched complex (engl.) |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium (engl.) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleic acid (engl.) |
| DRM | Detergent-resistant membrane (engl.) |
| E | Erythroid precursor (engl.) |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Epidermal growth factor (engl.) |
| ELAM | Endothelial leukocyte adhesion molecule |

| | |
|------------------|---|
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay (engl.) |
| Eo | Eosinophiler |
| E-Selektin | Endothelzell-Selektin |
| ESL | E-selectin ligand (engl.) |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| et al. | et alias (lat.) |
| F12 | Ham's F12 medium (engl.) |
| F _{ab} | Fraction antigen binding (engl.) |
| F _c | Fraction crystallizing (engl.) |
| FCS | Fetal calf serum (engl.) |
| FGF | Fibroblast growth factor (engl.) |
| Fuc | L-Fucose |
| G | Granulocyte (engl.) |
| Gal | D-Galactose |
| GalNAc | N-Acetyl-D-Galactosamin |
| Gb | Globo |
| GEMM | Granulocyte-Erythroid-Megakaryocyte-Monocyte common precursor (engl.) |
| Glc | D-Glucose |
| GlcNAc | N-Acetyl-D-Glucosamin |
| G _{D1a} | IV ³ Neu5Ac-II ³ Neu5Ac-Gg ₄ Cer |
| G _{D1b} | II ³ (Neu5Ac) ₂ -Gg ₄ Cer |
| Gln | L-Glutamin |
| Glu | L-Glutamat |
| Gly | L-Glycin |
| GlyCAM | Glycosylation-dependent cell adhesion molecule (engl.) |
| GM | Granulocyte-Monocyte common precursor (engl.) |
| G _{M1} | II ³ Neu5Ac-Gg ₄ Cer |
| G _{M3} | II ³ Neu5Ac-LacCer |
| GMP | Granule membrane protein (engl.) |
| GP | Glykoprotein |
| GSD | Glycosignaling domain (engl.) |
| GSL | Glykosphingolipide |
| GST | Gluthation-S-Transferase |
| G _{T1b} | IV ³ Neu5Ac,II ³ (Neu5Ac) ₂ -Gg ₄ Cer |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HDL | High density lipoprotein (engl.) |
| HEV | High endothelial venules (engl.) |
| His | L-Histidin |
| HL-60 | Promyelocytische Leukämiezelllinie |
| HPLC | High performance liquid chromatography (engl.) |
| HPTLC | High performance thin layer chromatography (engl.) |
| HUVEC | Human umbilical vein endothelial cells (engl.) |

| | |
|-----------------------|--|
| ICAM | Intercellular adhesion molecule (engl.) |
| i.d.R. | in der Regel |
| IFN | Interferon |
| IgA | Immunglobulin A |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| IL | Interleukin |
| Ile | L-Isoleucin |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| LacCer | Lactosylceramid |
| LAD | Leukocyten Adhäsionsdefizienz |
| LAM | Leukocyte adhesion molecule (engl.) |
| Lc | Lacto |
| l _c -Phase | Conventional liquid phase (engl.) |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| Le | Lewis |
| LECAM | Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule (engl.) |
| Leu | L-Leucin |
| LFA | Lymphocyte function-associated antigen (engl.) |
| l _o -Phase | Ordered liquid phase (engl.) |
| LMW | Low molecular weight (engl.) |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| L-Selektin | Leukocyten-Selektin |
| Lsg. | Lösung |
| LT | Leukotrien |
| Lys | L-Lysin |
| M | Methanol |
| MAC | Macrophage-associated antigen (engl.) |
| MadCAM | Mucosal addressin cell adhesion molecule (engl.) |
| max. | maximal |
| Meg | Megacaryocyte (engl.) |
| MEM | Minimal essential medium (engl.) |
| Met | L-Methionin |
| MHC | Major Histocompatibility Complex (engl.) |
| MPS | Mononucleäres Phagocytosesystem |
| MW | Molecular weight (engl.) |
| NAD | Nicotinamidadenindinucleotid (oxidiert) |
| NADH | Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert) |
| NADP | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidiert) |
| NADPH | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziert) |
| NCS | Newborn calf serum (engl.) |
| Neu5Ac | N-Acetylneuraminsäure |
| Neu5Gc | N-Glykolyneuraminsäure |

| | |
|------------------------|---|
| NGF | Nerve growth factor (engl.) |
| NK | Natural Killer (engl.) |
| NL | Normliter |
| nLc | Neolacto |
| OPA | ortho-Phthaldialdehyd |
| P | Phosphat |
| PADGEM | Platelet activation-dependent granule external membrane protein (engl.) |
| PAF | Platelet-activating factor (engl.) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphate buffered saline (engl.) |
| PDGF | Platelet derived growth factor (engl.) |
| PG | Prostaglandin |
| Phe | L-Phenylalanin |
| PKC | Proteinkinase C |
| P-Selektin | Platelet-selectin (engl.) |
| PSGL | P-selectin glycoprotein ligand (engl.) |
| RT | Raumtemperatur |
| SCR | Short consensus repeats (engl.) |
| SDS | Sodium-Dodecylsulfate (engl.) |
| Ser | L-Serin |
| sLe ^a | sialyl-Lewis ^a |
| sLe ^x | sialyl-Lewis ^x |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-cell receptor (engl.) |
| T _H -Zellen | T-Helfer-Zellen |
| Thr | L-Threonin |
| TNF | Tumor necrosis factor (engl.) |
| tPA | Tissue plasminogen activator (engl.) |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol |
| Trp | L-Tryptophan |
| Tyr | L-Tyrosin |
| UDP | Uridinphosphat |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| ü.N. | über Nacht |
| uPA | Urokinaseplasminogenaktivator |
| UV | Ultraviolett |
| Val | L-Valin |
| VCAM | Vascular cell adhesion molecule (engl.) |
| V. cholerae | Vibrio cholerae |
| vgl. | vergleiche |
| VLA | Very late antigen (engl.) |
| W | Wasser |

| | |
|------|-----------------------|
| w/v | weight/volume (engl.) |
| w/w | weight/weight (engl.) |
| z.B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Die Rolle des Immunsystems

Die Evolutionsstrategie basiert auf dem Überleben der am besten Angepaßten. Im Laufe der zeitgeschichtlichen Entwicklung brachte die Natur eine Fülle von Organismen hervor, die in einem engen Beziehungsgeflecht in Form von Nahrungsketten zueinander stehen. Die Nahrungsketten werden in drei Glieder unterteilt: die autotrophen Pflanzen als Produzenten, die Tiere als Konsumenten und die Bakterien als Destruenten. Außer dem klassischen Räuber/Beute-Verhältnis entwickelten sich Kommensalismus („Tischgenossenschaft“), Mutualismus (Symbiose) und Parasitismus. Während eine Symbiose mit Darmbakterien für Säugetiere zwecks Aufschlusses der Nahrungsbestandteile und der B₁/B₁₂/K₂-Vitaminsynthese (Penzlin, 1991) sinnvoll ist, sind pathogene parasitäre Invasoren, die den Körper als Nahrungsreservoir nutzen, gesundheitsschädlich, da sie die Körperzellen durch freigesetzte Toxine nekrotisch oder apoptotisch abtöten.

Der humane Organismus lebt in einem ständigen Kampf mit einem breiten Spektrum infektiöser Mikroorganismen unterschiedlicher Gestalt, Größe, Struktur und Funktion. In diesem Konkurrenzkampf ist der mikrobiellen Strategie der Massenreproduktion das Immunsystem mit seinen vergleichbar raffinierten Abwehrmechanismen entgegengesetzt. Zunächst muß ein Erreger bzw. dessen Toxine die äußere Barriere der Haut, des Gastrointestinaltrakts oder der Lunge durchdringen. Das Hautepithel ist geschützt durch Barrieren aus Schweiß und Schleim, die die Adhärenz der Mikroorganismen verhindern, sowie einem Säurefilm aus Milch- und Fettsäuren, der einen niedrigen pH-Wert zur Folge hat. Der Magen besitzt mit einem sauren pH-Wert ebenfalls eine wachstumsfeindliche Umgebung. Zugleich hemmt der mikrobielle Antagonismus der normalen Bakterienflora des Menschen auf der Haut und im Darm das Wachstum vieler potentiell pathogener Bakterien und Pilze. Dem Lungenepithel sind außer den schleimigen Sekreten noch vorgelagerte Zilien inhärent, die zusätzlich zum Husten Mikroorganismen und Fremdkörper mechanisch nach außen befördern. Ergänzend sind die Sinnesorgane von antimikrobiell wirkenden Schutzschichten überzogen. Die Tränenflüssigkeit und der Nasenschleim enthalten Antikörper der Immunglobulin-Klasse A (IgA) und die N-Acetyl-Muramidase Lysozym, die den Mureinsacculus der Bakterienzellwände spaltet. Eine Infektion wird somit meist über Verletzungen hervorgerufen, durch die der Erreger in den Körper eindringen kann. Das Spektrum infektiöser Mikroorganismen, die vom Immunsystem bekämpft werden, reicht dabei von Würmern (Bandwurm, Guineawurm, Schistosomen, Filarien) über Protozoen (Amöben, Leishmanien, Trypanosomen, Malariaerreger) und Pilzen (Aspergillus, Candida) sowie Bakterien (Kokken, Stäbchen, gekrümmte Stäbchen, Rickettsien, Chlamydien, Mykoplasmen) bis zu DNA- (Pocken-, Herpes-, Adenoviren) und RNA-Viren (Picorna-, Reo- und Myxoviren). Als Abwehrstrategie werden unspezifische antimikrobielle Systeme, die unabhängig von einem früheren Kontakt mit dem Erreger reagieren, und spezifisch erworbene Immunmechanismen eingesetzt, die den Eindringling im Idealfall unschädlich machen.

Handelt es sich um einen für das Immunsystem unbekannten Erreger, so tritt zunächst die unspezifische angeborene Abwehr in Kraft. Dabei werden zwei Hauptstrategien eingesetzt: zum einen die antimikrobielle Wirkung löslicher chemischer Substanzen der humoralen Immunantwort (bakterizide Enzyme, Sauerstoffradikale, Complementproteine), und zum anderen der - der zellulären Immunantwort zugehörige - Mechanismus der Phagozytose, dem „Auffressen“ und Verdau der Gegner. Ist der Erreger bereits durch einen früheren Antigenkontakt bekannt, werden ebenfalls eine humorale und eine zelluläre Immunreaktion ausgelöst. Diese Immunreaktion ist jedoch spezifisch und somit wird die Gesamtreaktion durch lösliche Antikörper und dem Wechselspiel der Immunzellen nach Antigenkontakt membranständiger Antikörper wesentlich effektiver, da die spezifische und unspezifische Abwehr additiv wirken (Roitt, 1993). Neben der Bekämpfung von Infektionen besteht die zweite Hauptaufgabe des Immunsystems darin, den Organismus vor entarteten Tumorzellen zu schützen. Eine unkontrollierte Proliferation solcher Zellen hätte eine Verdrängung gesunder Zellen und damit letztendlich ein Versagen essentieller Organfunktionen zur Folge.

1.2 Das Hämatopoetische System

Das Immunsystem muß seine Aufgaben hochflexibel erledigen können. Um dies zu bewältigen, ist eine Vielzahl von Zelltypen sowie eine Kommunikation zwischen den individuellen Zellen notwendig. Die Zellen des Blut- und Immunsystems werden durch Hämatopoese (griech.: haima = Blut; poiesis = Produktion) mittels Stammzellen produziert (Klein, 1991). Diese haben beim humanen Embryo ihren Ursprung ab der dritten Entwicklungswoche in der Wand des sekundären Dottersackes. Im zweiten Monat verlagert sich die Blutbildung in die embryonale Leber und ab dem dritten Monat in geringem Umfang in die Milz, die jeweils von Stammzellpopulationen besiedelt werden. Im fünften Monat lassen sich die Stammzellen endgültig im Knochenmark nieder und die Blutbildung in Leber und Milz wird bis zur Geburt beendet. Die Stammzellen vermögen sich zu teilen und weitere Tochterstammzellen zu bilden, die entweder in einem Prozeß der Erneuerung wiederholt ihresgleichen bilden oder sich differenzieren können. Sie produzieren alle verschiedenen Zelltypen des Blutes und werden deshalb als pluripotent bezeichnet. An dem Prozeß der Differenzierung sind mehrere Zellgenerationen beteiligt. Zunächst entstehen Stammzellen mit eingeschränktem Potential: die direkten Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen (Erythrocyten), die den Sauerstoff transportieren, der Blutplättchen (Thrombocyten), die in verletzten Geweben die Blutgerinnung auslösen sowie der beiden Hauptgruppen der farblosen „weißen“ Blutzellen (Leukocyten), der Lymphocyten und Granulocyten. Der Differenzierungsprozeß endet mit dem Entstehen der reifen Blutzelle, die nur eine begrenzte Zeit lebt, ihre Aufgaben erfüllt und schließlich stirbt. Die Differenzierungsstadien einer Zelle auf ihrem Weg von einer Vorläuferzelle zur reifen Zelle werden anhand von phänotypischen Merkmalen festgelegt. Die Genprodukte ändern Form und Größe der Zelle, das Verhältnis zwischen dem Volumen des Nucleus und dem des Zytoplasmas, das Färbeverhalten der einzelnen Zellorganellen, morphologische Merkmale sowie Zelloberflächenproteine,

die durch Antikörper erkannt werden und Rückschlüsse auf die Genaktivität zulassen. Aufgrund der morphologischen Merkmale und der Antigenmarker wird der Differenzierungsgrad der Zelle in unterschiedliche Stadien eingeteilt. Die jeweils aktuelle Auflistung der CD-Oberflächenmarker (engl.: cluster of differentiation) kann im Internet unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prov> eingesehen werden.

Die Differenzierungswege

Die pluripotente Stammzelle schlägt mit der ersten Differenzierung den myeloiden oder den lymphoiden Weg ein (siehe Abbildung 1.1).

Lymphocyten

Das erste lymphoide Entwicklungsstadium ist die lymphoide Stammzelle, die sich entweder zur B- oder T-Lymphocyten-Reihe weiterdifferenzieren kann. Traditionell werden die beiden Zellgruppen nach dem Ort ihrer hauptsächlichlichen Differenzierung, dem Knochenmark und der Thymusdrüse, mit B- (engl.: bone marrow) bzw. T- (lat.: glandula thymus; griech.: thymos = „Lebenskraft“) benannt. Neun Hauptstadien der B-Zellreihe werden bisher anhand von Zelloberflächenmarkern eingeteilt. Die Vorläufer-B-Zellen (pro-B-cell), die Übergangsstadien (engl.: pre-pre-B-cell, pre-B-cell) und die unreifen B-Zellen (engl.: early B-cell) befinden sich noch im Knochenmark. Letztere synthetisieren bereits Antikörpermoleküle, die membranständig arrangiert sind. Wandern die Zellen in die Blutbahn, so entwickeln sie sich über ein Zwischenstadium (engl.: intermediate B-cell) zu den reifen B-Zellen (engl.: mature B-cell), die insgesamt in einer Konzentration von $1-3,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL Blut zu finden sind. Nach dem Wechsel in die Lymphbahn findet eine Differenzierung zu Immunoblasten statt. Anschließend entstehen über ein Zwischenstadium (engl.: lymphoplasmacytoid cell) letztendlich die Plasmazellen, die die löslichen Antikörper sezernieren.

Die T-Lymphocyten-Reihe beginnt mit einem als CFU-T (engl.: colony forming unit – thymocyte) bezeichneten Zelltyp im Knochenmark eines Menschen. Diese Zelle oder eine ihrer Nachkommen wandert dann in den Thymus und macht dort den größten Teil der Entwicklung durch. Die intrathymische Differenzierung wird in drei Stadien unterteilt: subcorticale frühe Thymocyten, die CD4- und CD8-positiv sind und bereits den T-Zell-Rezeptor exprimieren, corticale allgemeine Thymocyten, bei denen eine CD3-Expression nachweisbar ist, und medullare reife bzw. späte Thymocyten. Am Ende dieses Stadiums verlassen die Zellen den Thymus als reife periphere T-Lymphocyten. Mit einem Verlust der CD4-Expression erwerben sie die cytotoxische Funktion, mit der durch Erkennung von MHC I (engl.: major histocompatibility complex) präsentierten Antigenen Virus-infizierte oder entartete somatische Zellen abgetötet werden. Ein Verlust der CD8-Expression dagegen ist mit dem Erwerb der Helfer-Funktion verbunden. Diese Zellen sind entweder in der Lage, durch das Cytokin Interferon- γ (IFN- γ) und den CD40-Liganden phagozytierende Makrophagen zu stimulieren (T_H1-Zellen), oder über den T-Zellrezeptor/CD3 Komplex und den Co-Rezeptor CD4 eine Wechselwirkung mit dem MHC II von antigenpräsentie-

renden Zellen einzugehen und B-Zellen zur Synthese von Antikörpern zu aktivieren (T_H2-Zellen).

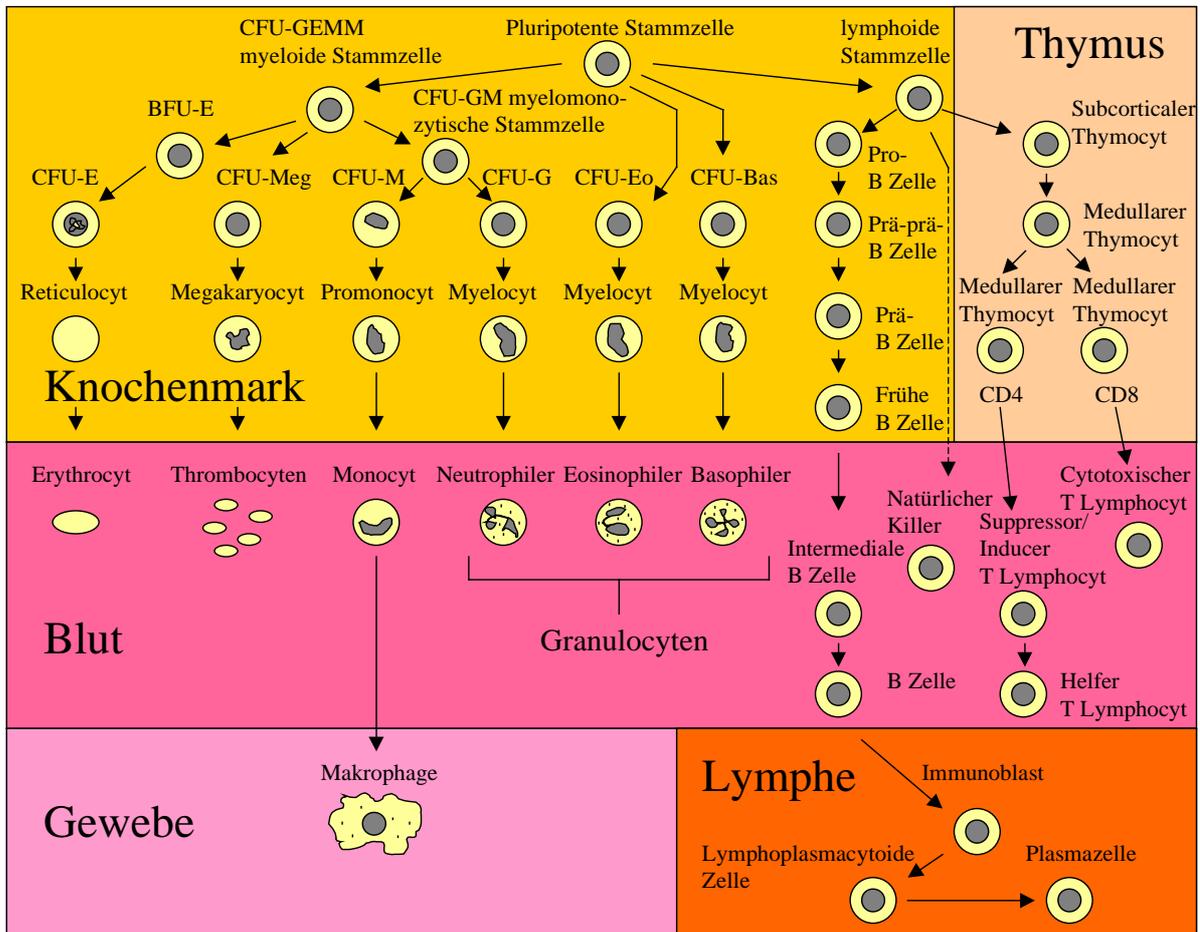


Abbildung 1.1: Das Hämatopoetische System.

Erythrocyten und Thrombocyten

Aus den myeloiden CFU-GEMM (engl.: colony forming unit – granulocyte-erythroid-megakaryocyte-monocyte common precursor) Stammzellen können sich die Reihen der Erythrocyten und Thrombocyten bilden, aber auch die granulocytären und monocytären Reihen, die mit der CFU-GM Stammzelle (engl.: colony forming unit – granulocyte-monocyte common precursor) beginnen.

In der erythrocytären Reihe werden die Stadien wie folgt benannt: BFU-E (engl.: burst forming unit – erythroid precursor) => CFU-E (engl.: colony forming unit - erythroid precursor) => Proerythroblast (große Zelle mit großem Nucleus und einem kleinen Cytoplasma) => Erythroblast I (kleinere, Hämoglobin-produzierende Zelle) => Erythroblast II (kleiner, in der Giemsa-Färbung dunkelblau) => polychromatophiler Erythroblast (in der Giemsa-Färbung hellblau) => acidophiler Erythroblast (rosagefärbte Zelle) => Retikulozyt (ohne Zellkern, anfärbbare präzipitierende Ribosomen) => Erythrocyt (hämoglobinhaltige, im Querschnitt hantelförmige Zelle). Die Erythrocytenkonzentration im Blut eines Erwachsenen beträgt etwa $5 \cdot 10^9$ Zellen/mL. Pro Minute werden etwa $1,6 \cdot 10^8$ neue

Erythrocyten gebildet. Die Lebensdauer der für den Sauerstofftransport verantwortlichen Zellen im Blut beträgt 100-120 Tage (Schmidt, 1987).

In der thrombocytären Reihe wird aus der CFU-Meg-Vorläuferzelle ein Megakaryocyt. Dieser Zelltyp nimmt an Größe zu und vervielfältigt gleichzeitig seine Chromosomenzahl, ohne sich dabei zu teilen, bis sich das Cytoplasma in etwa 1000-4000 mit einer Membran umhüllte Thrombocyten zergliedert. Die für einen Wundverschluß verfügbare Thrombocytenkonzentration im Blut eines Erwachsenen beträgt $1,5-3,5 \cdot 10^8$ Zellen/mL mit einer Lebensdauer von 5-11 Tagen.

Granulocyten und Monocyten

Die Granulocytenreihe beinhaltet drei Zellarten, die anhand der Anfärbbarkeit der Granula in Neutrophile, Basophile und Eosinophile eingeteilt werden. Zusätzlich zu dieser Gruppe patrouillieren im Blut noch weitere weiße Abwehrzellen, die Monocyten. Die Entwicklung von Neutrophilen und Monocyten, die bereits 1882 von Metschnikow als zwei prinzipiell verschiedene Zelltypen, die er als Mikro- und Makrophagen beschrieb, identifiziert wurden, beginnt mit der CFU-GM. In der Monocytenreihe folgt die CFU-M, die auch als Monoblast bezeichnet wird, und durch ihr fein verteiltes nucleäres Chromatin charakterisiert ist. Der Promonocyt hat bereits, wie die reife Zelle, die Fähigkeit zur Phagocytose und besitzt einen tief gezähnten, unregelmäßig begrenzten Nucleus und gebündelte Filamente im Cytoplasma. Mit der weiteren Differenzierung ist der Übergang vom Knochenmark zum Blut verbunden. Die Monocyten sind die größten aller reifen Zellen im Blut mit reichlich feingranulärem Cytoplasma und einem hufeisenförmigen Kern. Ihre Phagocytosekapazität übertrifft die sämtlicher anderer Blutzellen. Nach dem Übergang ins Gewebe differenzieren sie zu Makrophagen mit einem kugelförmigen Kern und bilden dort das sogenannte mononucleäre Phagocytosesystem (MPS). Sie sind überall in den Bindegeweben, entlang der Basalmembranen der kleinen Blutgefäße, sowie an strategisch wichtigen Stellen in der Lunge, der Leber, den Milzsinusoiden und den zentralen Regionen der Lymphknoten zu finden. Die Entwicklungsdauer im Knochenmark beträgt etwa 60 Stunden, das monocytäre Stadium mit einer Konzentration von $4,5 \cdot 10^5$ Zellen/mL im Blut währt 8 Stunden, und die Lebensdauer im Gewebe beträgt mehrere Monate.

Die Reihen der eosinophilen und basophilen Granulocyten beginnen jeweils mit eigenen Vorläuferzellen CFU-Eo und CFU-Bas, die sich direkt von den pluripotenten Stammzellen ableiten. Über Myelocyten-Zwischenstadien entstehen schließlich die Eosinophilen, deren argininreiche Granula sich mit dem sauren Farbstoff Eosin leuchtend orange färben lassen, und die Basophilen mit einer Granula, die sich mit basischen Reagenzien dunkelblau bis violett färbt. Dabei spezialisieren sich die Eosinophilen auf das extrazelluläre Abtöten großer Eindringlinge, wie vielzelliger Parasiten, durch Sezernierung von kationischem Eosinophilenprotein und Eosinophilen-Peroxidase, während die Basophilen mit ihnen in Wechselwirkung treten können und nach einer Aktivierung durch das sogenannte „major basic protein“ ebenfalls degranulieren. Zusätzlich exponieren die Basophilen Immunglobulin E-Rezeptoren an ihrer Oberfläche, die nach Bindung und Antigenkontakt eine Histaminfreisetzung auslösen, wodurch auch eine allergische Reaktion auf harmlose Antige-

ne folgen kann. Allerdings ist die Konzentration dieser beiden Granulocytenarten im Blut gering, sie beträgt $1-3,5 \cdot 10^5$ Eosinophile/mL und etwa $5 \cdot 10^4$ Basophile/mL mit einer durchschnittlichen Verweildauer von 12 Stunden (Schmidt, 1987). Die beiden Zelltypen wandern nach dem Blutaufenthalt in Subepithelien der Atemwege, des Darms und des Urogenitaltraktes ein (Janeway, 1997).

In der neutrophilen Granulocytenreihe folgt nach der CFU-GM die CFU-G bzw. der Myeloblast, eine Zelle mit einem großen runden Nucleus und wenig Cytoplasma, der Promyelocyt mit blauen oder violetten Granula im Cytoplasma, der Myelocyt mit scholligem Chromatin im Nucleus und zahlreichen Granula im Cytoplasma, der Stabkernige mit typischem bogenförmigen Kern und letztendlich der reife Neutrophile mit einem durch tiefe Furchen segmentierten Kern und sehr schwach gefärbten Granula im Cytoplasma. Etwa 50% der intravasalen neutrophilen Granulocyten zirkulieren nicht, sondern haften an der Endothelzellwand insbesondere der Lungen- und Milzgefäße. Diese ruhenden Zellen können in Streßsituationen schnell mobilisiert werden. Im Blut liegt die Konzentration bei etwa $4,5 \cdot 10^6$ neutrophilen Granulocyten/mL. Ihre mittlere Zirkulationsdauer beträgt aufgrund der hohen Auswanderungsrate in die Schleimhautoberflächen 6-8 Stunden, ihre absolute Lebensdauer 1-2 Tage.

Mechanismen der zellulären Abwehr

Alle Leukocyten sind amöboid beweglich. Sie können die Wände der Blutgefäße im Prozeß der Diapedese durchdringen, um Eindringlinge direkt, aber mit je nach Zelltypus unterschiedlichen Mitteln, zu bekämpfen. Phagocyten sind Zellen, die Partikel mit einer Größe von über $1 \mu\text{m}$ Durchmesser aufnehmen und in professionelle und nicht-professionelle Phagocyten unterteilt werden. Nicht-professionelle Phagocyten sind z.B. Epithelzellen der verschiedenen Schleimhäute, Lymphocyten, Thrombocyten, Mastzellen und Fibroblasten, bei denen keine Reaktion mit der Phagocytose einhergeht. Zu den professionellen Phagocyten gehören Neutrophile, Eosinophile, Monocyten und Makrophagen. Häufig werden die Makrophagen als die vorherrschenden „Killer“ von Mikroorganismen bezeichnet. Obwohl sie oft die ersten Zellen des Immunsystems sind, die auf den Erreger stoßen und ihn auch phagocytieren können, ist intrazelluläres Killing nicht ihre Hauptaufgabe. Statt dessen agieren sie als Wachposten, die Alarm schlagen, wenn der Erreger entdeckt wird. Nach der Aufnahme und dem intrazellulären Verdau eines Partikels präsentieren sie den T-Helferzellen MHC II-assoziierte Antigene und sezernieren eine Vielzahl löslicher Substanzen, von denen einige als Cytokine die wirklichen Killer an den Angriffsort rufen. Normalerweise jedoch, ohne Erregerkontakt, dienen ihre Fähigkeiten einer Abfallbeseitigung, indem sie ausgelaugte Zellen oder Zelltrümmer und exogene inerte Partikel phagocytieren. Der professionelle „Killer Nummer eins“ für eingedrungene Mikroorganismen ist der Neutrophile, der zur intrazellulären Verdauung der aufgenommenen Partikel mit hoch entwickelten Mechanismen ausgestattet ist. Seine primäre azurophile Granula enthält Ribonuclease und Desoxyribonuclease sowie saure Phosphatase zum Angriff auf Nucleinsäuren und Nucleotide. Proteine werden durch Phosphoprotein-Phosphatase, Aminopeptidase, Kathepsin, Elastase und Collagenase hydrolysiert. Lipide werden durch saure Triglycerid-Lipase

und Phospholipase attackiert und Glykane, Glykoproteine sowie Proteoglykane durch α -Glucosidase, Dextranase, β -N-Acetyl-Glucosaminidase, α -Fucosidase, β -Glucuronidase, Lysozym, β -Galactosidase, N-Acetyl- β -Galactosaminidase, α -Mannosidase und α -Amylase angegriffen. Sulfatester werden durch Arylsulfatase gespalten und terminale Neuraminsäure durch Neuraminidase entfernt. Zusätzlich zu den primären azurophilen Granulasubstanzen enthält die sekundäre spezifische Granula noch Lactoferrin und Vitamin B₁₂-bindendes Protein. Durch diese Attacke von aggressiven Enzymen wird der Erreger im Phagosom letztendlich unschädlich gemacht, indem er bis zu seinen Grundbausteinen, den Aminosäuren, Zuckern, Lipiden und Nucleotiden verdaut wird, die anschließend von somatischen Zellen für den Anabolismus verwendet werden. Auch die sogenannte Natural Killer (NK) Zelle ist in der Lage, Mikroorganismen ohne vorherigen Antigenkontakt zu eliminieren. Ihr Ursprung ist allerdings noch nicht zweifelsfrei geklärt. Sie stammt möglicherweise von den lymphoiden Stammzellen ab und wird aufgrund des Fehlens einiger Marker auch als „Null Zelle“ bezeichnet.

Die Promyelocytische HL-60 Zelllinie als *in vitro*-Granulocytenäquivalent

Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Neutrophilen und Endothelzellen ist aufgrund der geringen Lebensdauer der primären Granulocyten von 1-2 Tagen problematisch da ständig neues Zellmaterial isoliert werden muß und sich die einzelnen Chargen je nach Spender als heterogen erweisen können. Als zusätzliche Schwierigkeit werden Granulocyten bereits durch Glasoberflächenkontakt aktiviert worauf sie degranulieren. Als Ersatz bietet sich die promyelocytische Zelllinie HL-60 (ATCC CCL-240, American Type Culture Collection) an. Diese Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut einer 36jährigen Frau isoliert (Collins *et al.*, 1977). Nach Zwischenpassagen mit von humanen embryonalen Fibroblasten bzw. Lungenzellen konditioniertem Medium wurde die immortalisierte Linie in mit 20% fötalem Kälberserum (engl.: fetal calf serum, FCS) supplementierten RPMI Medium weiterkultiviert und in der 8. Passage von R.C. Gallo der ATCC zur Verfügung gestellt. Genotypisch wurde eine 4-30fache Amplifikation des *c-myc* Gens (Dalla-Favera *et al.*, 1982; Donti *et al.*, 1991) und eine weitgehende Deletion des p53 Gens auf dem Chromosom 17p13 (Isobe *et al.*, 1986; Wolf and Rotter, 1985) festgestellt. Im Phänotyp sind die Zellen heterogen. 90-95% besitzen eine myeloblastische bzw. promyelocytische Morphologie mit einem großen und mehreren kleinen Nuclei im Zellkern und basophilem Cytoplasma mit azurophiler Granula (Birnie, 1988). Diese Zellen sind positiv für Färbetests mit Naphthol ASD Chloracetatesterase und Sudan Schwarz. Sie bestätigen damit den myeloiden Differenzierungspfad (Gallagher *et al.*, 1979). Die restlichen Zellen sind bereits differenziertere Myelocyten, Neutrophile und Monocyten. Die Zelllinie ist also in der Lage, ohne externen Inducer eine Differenzierung durchzuführen. Sie kann aber auch durch Zugabe von polar-planaren Agenzien wie z.B. DMSO (Bohnsack and Chang, 1994) und anderen Substanzen wie z.B. Retinolsäure (Sjogren *et al.*, 2000) und Actinomycin D (Terada *et al.*, 1978) zu einer granulocytären Differenzierung induziert werden. Phorbolster (Prieto *et al.*, 1994; Bohnsack and Chang, 1994; Yang *et al.*, 1996), Natriumbutyrat (Boyd and Metcalf, 1984) oder 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (Brackman *et al.*, 1995) führen dage-

gen zu einer monocytären Differenzierung. Tabelle 1.1 zeigt einige Differenzierungsantigene von HL-60 Zellen im Vergleich zu primären Granulocyten.

Tabelle 1.1: Differenzierungsantigene von unstimulierten HL-60 Zellen und primären humanen neutrophilen Granulocyten.

| Antigen | HL-60 | Granulocyten | Literatur |
|---|---|-----------------------|--|
| CD11a (LFA-1, α_L Integrin) | o | +++ | Miller <i>et al.</i> , 1986 |
| CD11b (MAC-1, α_M Integrin) | - | +++ | |
| CD11c (α_X Integrin) | - | + | |
| CD18 (β_2 Integrin) | o | +++ | |
| CD49d (VLA-4, α_4 Integrin) | ^a o | ^b - | ^a Bohnsack and Chang, 1994 ^b Bochner <i>et al.</i> , 1991; Meisel <i>et al.</i> , 1998 |
| CD29 (β_1 Integrin) | ^a o | ^b - | ^a Bohnsack and Chang, 1994 ^b Spertini <i>et al.</i> , 1991 |
| LPAM-1 ($\alpha_4\beta_7$ Integrin) | - | - | Yang <i>et al.</i> , 1996 |
| CD15s (sialyl Lewis ^x , CSLEX1) | ^a +++ | ^b +++ | ^a Schlossman <i>et al.</i> , 1995; ^b Tu <i>et al.</i> , 1999 |
| CD44 (H-CAM) | ^a o | ^b ++ | ^a Brackman <i>et al.</i> , 1995; Atkins <i>et al.</i> , 1998 ^b Lund-Johansen and Terstappen, 1993 |
| CDw65 (VIM2) | +++ | +++ | Schlossman <i>et al.</i> , 1995 |
| CD62L (L-Selektin) | ^a o | ^b o | ^a Prieto <i>et al.</i> , 1994; ^b Van Eeden <i>et al.</i> , 1997 |
| CD162 (PSGL-1) | ^a +++ (Genetics Institute) ^b - [ATCC] | ^c +++ | ^a (Sackstein and Dimitroff, 2000; Snapp <i>et al.</i> , 1998) ^b [Lenter <i>et al.</i> , 1994] ^c Tu <i>et al.</i> , 1999 |
| CD64 (F _c γ Rezeptor I) | ^a - | ^b o | ^a Trayner <i>et al.</i> , 1998 ^b Leino <i>et al.</i> , 1997; Takano <i>et al.</i> , 2000 |
| CD32 (F _c γ Rezeptor II) | ^a +++ | ^b +++ | ^a Brackman <i>et al.</i> , 1995; ^b Leino <i>et al.</i> , 1997 |
| CD16 (F _c γ Rezeptor III) | ^a +++ | ^b +++ | ^a Brackman <i>et al.</i> , 1995; ^b Leino <i>et al.</i> , 1997 |
| CD71 (Transferrinrezeptor) | ^a +++ | ^b o | ^a Trayner <i>et al.</i> , 1998; ^b Terstappen <i>et al.</i> , 1992 |
| CD15 (Lewis ^x , VIMD5) | +++ | +++ | Schlossman <i>et al.</i> , 1995 |
| CD63 (Plättchen-Aktivierungsantigen) | +++ | +++ | |
| VIM15 | ++ | ++ | |
| VIMD2b, VIMD2 | +++ | - | |
| CD66b (CGM6) | +++ | - | |
| CD87 (uPA Rezeptor) | +++ | +++ | |
| CD88 (C5a Rezeptor) | +++ | - | |
| Mo5, 4B5.F5 | +++ | +++ | |
| BG69 | +++ | - | |

+++; 75-100%, ++; 50-75%, +; 25-50%, o; 0-25% positive Zellen, -: negativ

dunkelgrau unterlegt: Potentiell E-Selektin-bindende Antigene; grau unterlegt: Adhäsionsrelevante Antigene; weiß unterlegt: Differenzierungsantigene

Die HL-60 Zellen synthetisieren Myeloperoxidase und saure Phosphatase und besitzen Rezeptoren für Insulin, Transferrin, Complement sowie für das F_c-Fragment (engl.: fraction crystallizing, = konstanter Teil der schweren Ketten) von Immunglobulinen (Tsiftoglou and Robinson, 1985; Collins, 1987). Die HL-60 Zellen weisen viele Neutrophilen-identische Marker auf. Die für diese Arbeit relevanten Merkmale der HL-60 Zellen sind die Expression von CD15s (sialyl Lewis^x) und CDw65 (VIM2) Antigenstrukturen, die potentielle Liganden des endothelialen Adhäsionsmoleküls E-Selektin sind. Von Vorteil ist außerdem die eingeschränkte Expression von Integrinen, die ebenfalls als Adhäsionsmoleküle fungieren. Dadurch ist der Einfluß des E-Selektins auf die Zell-Zell-Wechselwirkung besser determinierbar. Also wurden die HL-60 Zellen im Adhäsionstest statt humaner Granulocyten eingesetzt.

1.3 Entzündung

Meist haben sich die mikrobiellen Eindringlinge bei ihrer Entdeckung durch die Immunabwehr bereits vermehrt. Für eine schnelle Abwehr ist es daher notwendig, durch Botenstoffe weitere Immunzellen herbeizuschaffen.

Cytokine

Cytokine sind induzierbare, wasserlösliche Proteinmediatoren mit einem Molekulargewicht von mehr als 5 kDa, die in Zielzellen oder den sie produzierenden Zellen spezifische, via Rezeptoren vermittelte Wirkungen ausüben (Keller, 1994). Cytokine, die die Phagozyten als Reaktion auf bakterielle Komponenten sezernieren, bewirken eine Reihe von Effekten, die man zusammen als Entzündung (Inflammation) bezeichnet. Das Ziel einer Entzündung ist, den Körper in eine erhöhte Abwehrbereitschaft zu versetzen, schädigende Einflüsse zu neutralisieren und die Integrität des Organismus wiederherzustellen. Eine Inflammation geht einher mit den vier klassischen Symptomen: Wärme (lat.: calor), Schmerz (lat.: dolor), Rötung (lat.: rubor) und Schwellung (lat.: tumor) (Keller, 1994). Die Symptome beruhen auf der Auswirkung einer strukturell unterschiedlichen Gruppe von Cytokinen, zu denen unter anderem die Interleukine 1 (IL-1), IL-6, IL-8 und IL-12 sowie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zählen. IL-1 aktiviert das Gefäßendothel sowie die Lymphocyten und induziert Fieber, IL-6 aktiviert die Lymphocyten, wirkt ebenfalls pyrogen und löst die Bildung von Proteinen der akuten Phase aus. IL-8 ist ein chemotaktischer Faktor für Leukocyten und verbessert den Zugang für Effektorzellen. IL-12 induziert die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T_H1-Zellen, und TNF- α aktiviert das Gefäßendothel und erhöht die Permeabilität der Gefäßwände, was zu einem vermehrten Einstrom von IgG, Complementproteinen und Zellen sowie zu einer verbesserten Lymphdrainage führt. Durch die Vasodilatation wird die Blutstromgeschwindigkeit herabgesetzt, wodurch die Effektorzellen sich einfacher an das Endothel heften und transmigrieren können.

Kontaktstimulation durch Opsonierung mit Complement und Antikörpern

Das Opsonieren mit Complement, einer Gruppe von Proteinen, die sich an Bakterienwände heften und diese perforieren, erleichtert die Phagozytose ebenso wie die Bindung von Immunglobulinen, da phagozytierende Zellen Rezeptoren für die Complementproteine C3b und iC3b sowie für Immunglobuline besitzen. Zusätzlich stimuliert der Kontakt mit opsonierten Erregern bei Phagozyten die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren, wie z.B. des thrombocytenaktivierenden Faktors (engl.: Platelet-activating factor, PAF), der allerdings nicht präformiert ist, sondern nach Stimulation sehr rasch *de novo* synthetisiert wird. Nicht-leukocytäre Zellen wie Mesangiumzellen und glatte Muskelzellen reagieren auf ihn mit einer Freisetzung von Lipidmediatoren (Eicosanoiden), einer Gruppe von biologisch aktiven Metaboliten der Arachidonsäure.

Lipidmediatoren

Dazu gehören die durch die Cyclooxygenase generierten Prostaglandine (PGE₂, PGI₂) und Thromboxan, sowie die Folgeprodukte der Lipoxygenasen, die Leukotriene (LTB₄, LTC₄) und Lipoxine (A, B). Die Prostaglandine E₂ und I₂ verursachen eine Vasodilatation, eine Ödembildung und Hyperalgesie. PGE₂ zeichnet sich noch zusätzlich dadurch aus, daß es das thermoregulatorische Zentrum im Hypothalamus beeinflußt und Fieber erzeugt. Leukotrien B₄ ist ein potentes Chemokin für Neutrophile, wohingegen Leukotrien C₄ für eine spasmogene Aktivität verantwortlich ist. Eicosanoide wirken streng lokal am Ort ihrer Freisetzung und werden schnell zu inaktiven Metaboliten umgewandelt oder nach Eintritt in die Blutzirkulation im Lungengewebe inaktiviert.

All die bisher genannten Mediatoren werden von Phagozyten nach Stimulation freigesetzt. Die Gesamtreaktion wird noch wesentlich verstärkt, wenn Basophile und Mastzellen zur Freisetzung von Histamin angeregt werden, das allein schon zu drei der vier Kardinalsymptome der Entzündung beiträgt, nämlich *rubor*, *tumor* und *dolor*. Es induziert eine Vasodilatation und auch eine Ausbildung von interzellulären Spalten im Endothel (Gemsä, 1991).

1.4 Blut als Transportmittel der zellulären Abwehr

Zu den zahlreichen Aufgaben des Blutes wie der Milieufunktion (Homöostase), dem Schutz vor Blutverlust und der humoralen Abwehrfunktion durch Antikörper und Complement, gehört vor allem die Transportfunktion. Es transportiert außer den physikalisch gelösten und chemisch gebundenen Gasen O₂ und CO₂ ebenso Metabolite und Wirkstoffe, Wärme und letztendlich auch die Zellen der Immunabwehr. Die Blutströmung entsteht durch Druckgradienten zwischen den einzelnen Gefäßabschnitten. Das Druckgefälle liefert dabei die Kraft, die zur Überwindung des Strömungswiderstandes notwendig ist (siehe Abbildung 1.2). Der Strömungswiderstand ist eine zusammengesetzte Größe und hängt von der unterschiedlichen Gefäßarchitektur, d.h. von Zahl, Länge, Durchmesser und mög-

lichen Verzweigungen in den verschiedenen Gefäßabschnitten sowie der Viskosität des Blutes ab. Die Viskosität ist die Eigenschaft einer Flüssigkeit, der tangentialen Verschiebung von Flüssigkeitsschichten im Rahmen einer laminaren Strömung einen Widerstand, die innere Reibung, entgegenzusetzen. Sie stellt eine temperaturabhängige Materialkonstante dar und ergibt sich nach Newton aus dem Quotienten von Schubspannung (Scherstress, engl.: shear stress), also der einwirkenden Kraft pro Fläche und Schergeschwindigkeit (engl.: shear rate), d.h. dem Geschwindigkeitsgradienten zwischen den einzelnen Schichten. Relativ zu Wasser hat Blutplasma eine 2,1fache und Blut eine 3-5fache Viskosität. Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten homogenen Flüssigkeiten, die eine konstante Viskosität zeigen, nimmt die Viskosität des Blutes mit steigendem Hämatokrit zu. Aufgrund der variablen Anzahl suspendierter Zellen verhält sie sich heterogen. Unter physiologischen Bedingungen liegt nahezu in allen Gefäßabschnitten eine laminare Strömung vor. Die Flüssigkeit strömt dabei in coaxialen zylindrischen Schichten, in denen sich alle Teilchen ausschließlich parallel zur Gefäßachse bewegen.

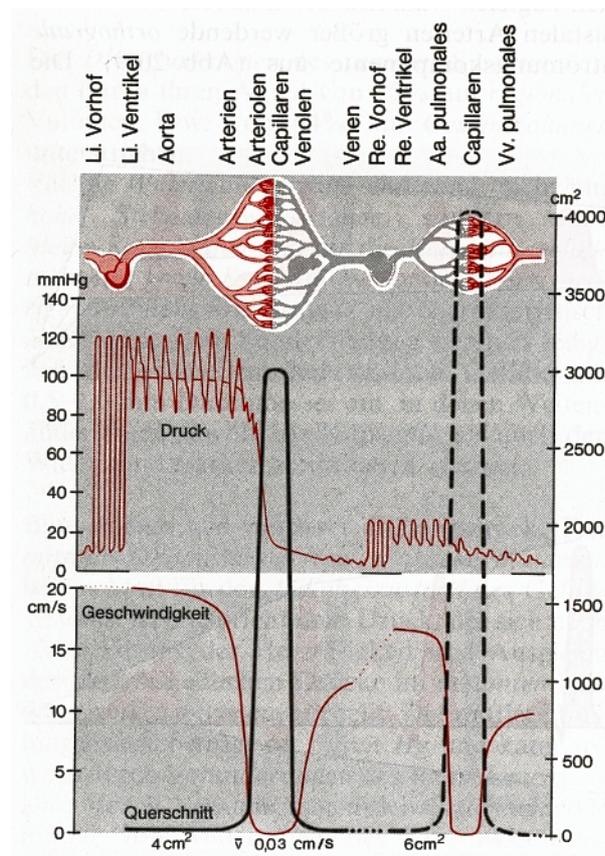


Abbildung 1.2: Beziehung zwischen Gesamtquerschnitt, Druck und mittlerer linearer Strömungsgeschwindigkeit im kardiovaskulären System (aus: Schmidt, 1987).

An der Gefäßwand ist die Strömungsgeschwindigkeit gleich Null, so daß sich ein wie in Abbildung 1.3 dargestelltes parabolisches Geschwindigkeitsprofil ausbildet. Bei erhöhten Strömungsgeschwindigkeiten oder bei reduzierter Blutviskosität kann die laminare in turbulente Strömung übergehen, bei der Wirbel auftreten, in denen sich das Fluid nicht nur parallel, sondern auch quer zur Gefäßachse bewegt. Das Strömungsprofil flacht ab und die bei laminarer Strömung bestehende lineare Beziehung zwischen Volumenstrom und Druckdifferenz wird aufgehoben, weil durch die Wirbelbildung zusätzliche Druckverluste auftreten.

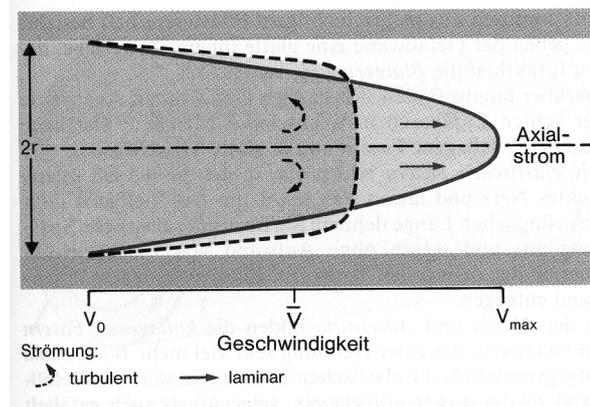


Abbildung 1.3: Geschwindigkeitsprofil bei laminarer und turbulenter Strömung (aus: Schmidt, 1987).

Der Strömungszustand wird durch die dimensionslose Reynolds-Zahl beschrieben, die sich aus dem Verhältnis des Produktes aus einer charakteristischen Länge (Gefäßdurchmesser), der mittleren Strömungsgeschwindigkeit und der Massendichte zur dynamischen Viskosität der Flüssigkeit ergibt und damit den Einfluß der Reibungs- und Trägheitskräfte auf das Strömungsfeld kennzeichnet. Je nach Form und Oberflächenbeschaffenheit des durch- oder umströmten Körpers gibt es eine bestimmte kritische Reynolds-Zahl, die den Wechsel von laminarer in turbulente Strömung bestimmt. Bei Werten über 400 treten an Arterienverengungen oder -abgängen bzw. in starken Gefäßkrümmungen lokale Wirbel in den Randschichten der Strömung auf, während bei Werten zwischen 2000 und 2400 die laminare vollständig in die turbulente Strömung übergeht (Schmidt, 1987).

Aufgrund der reziprok proportionalen Abhängigkeit vom Gesamtquerschnitt nimmt die mittlere Strömungsgeschwindigkeit des Blutes in den distalen Arterien und Arteriolen stark ab und weist in den Kapillaren mit ca. 300 $\mu\text{m/s}$ die niedrigsten Werte auf. Dabei sind die Zellen einer Schubspannung ausgesetzt, die sich aus dem Quotienten des Geschwindigkeitsgradienten und der Viskosität ergibt. Die physiologischen Werte für venösen und arteriellen Scherstress liegen zwischen $1\text{-}5 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ und $6\text{-}40 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ (Bronzino, 1995). In den Gefäßabschnitten der Kapillaren wird er besonders durch die entzündungsbedingte Vasodilatation reduziert. Dort treten die inflammatorisch initiierten Wechselwirkungen von Leukocyten und dem Endothel auf.

1.5 Die Wechselwirkung von Endothel und Leukocyten

Die Position der Entzündung wird den Effektorzellen im vasculären System durch Oberflächenmoleküle auf den Endothelzellen angezeigt. Die im Blutstrom mitgeführten Leukocyten interagieren durch affine Zelloberflächenmoleküle, so daß es zu einer kurzfristigen Adhäsion (engl.: tethering) mit anschließender Rollbewegung (engl.: rolling) auf dem Endothel kommt. Letztendlich führen die Interaktionen zu einem Überwiegen der Reibungskraft gegenüber der Scherkraft und damit zu einer statischen Adhäsion mit anschließender Diapedese durch die Endothelbarriere in das entzündete Gewebe. Dieser Prozeß setzt sich aus einer Kaskade von Interaktionen zusammen und wird durch Selektine, eine spezielle Familie aus drei verschiedenen Zelladhäsionsproteinen, vermittelt. Im Gegensatz zu der Mehrheit anderer Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. die Integrine, die überwiegend für den Gewebeerhalt notwendig sind, fungieren die Selektine des vasculären Systems als Lektine und binden somit Kohlenhydrate als Liganden.

Die Adhäsionskaskade umfaßt vier Schritte

Insgesamt wird die Adhäsionskaskade in vier Schritte eingeteilt, die zur Regulation der Leukocytenwanderung in das Gewebe beitragen. Im ersten Schritt interagieren die Leukocyten transient mit dem Endothel, so daß es durch Tethering und Rolling zu einer Geschwindigkeitsreduktion dieser Zellen im Blutstrom kommt. Der zweite Schritt ist durch die Aktivierung der Leukocyten mittels eines Chemokinsignals auf der Oberfläche der Endothelzellen gekennzeichnet (Kuijpers *et al.*, 1991). Mit dem dritten Schritt kommt es zu einer Festigung der Adhäsion durch weitere Transmembranproteine (Integrine), die durch ein Signal (Rosales *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 2000) von einer niedrigaffinen in eine hochaffine Konformation überführt und somit aktiviert werden und an Mitglieder der Immunoglobulinsuperfamilie auf den Endothelzellen binden (Schwartz *et al.*, 1995). Im vierten und letzten Schritt durchdringen die Leukocyten die Endothelbarriere und wandern in das darunterliegende Gewebe ein. Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht der drei großen Familien der Zelladhäsionsmoleküle wieder.

Strukturell setzen sich die Selektine aus folgenden Domänen zusammen: Einer 120 Aminosäuren-langen NH₂-terminalen Lektin-Domäne, die den C-bindenden Proteinen ähnlich ist, einer dem Epidermis-Wachstumsfaktor analogen Region aus 35-40 Aminosäuren, einigen repetitiven Complement-bindenden-Konsensus-Elementen (SCR; engl.: short consensus repeats) von je etwa 60 Aminosäuren Länge, deren Anzahl Spezies-spezifisch ist, und einer einzelnen transmembranen Sequenz mit folgender kurzer cytoplasmatischer Domäne aus - beim Menschen - 17 (L-Selektin), 32 (E-Selektin) oder 35 Aminosäuren (P-Selektin). Abbildung 1.4 gibt schematisch den Aufbau der Selektine für einige Säugetierarten wieder.

Tabelle 1.2: Familien der Zelladhäsionsmoleküle.

| Selektine | | | |
|---|------------------------------|--|---|
| Rezeptor | weitere Bezeichnungen | Zelluläre Verteilung | Funktion |
| L-Selektin | LECAM-1, CD62L | Lymphocyten, Leukocyten | Homing, Tethering |
| E-Selektin | ELAM-1, CD62E | Endothel | Rolling, Adhäsion |
| P-Selektin | LECAM-3, CD62P | Endothel, Thrombocyten | Rolling, Adhäsion |
| Integrin-Gensuperfamilie | | | |
| Rezeptor | weitere Bezeichnungen | Zelluläre Verteilung | Funktion |
| β1-Integrine (CD29) | | | Binden von Leukocyten und Lymphocyten an die betreffenden Liganden |
| VLA-1 (α 1) | CD49a/CD29 | Leukocyten | Laminin (α 1, α 6) |
| VLA-2 (α 2) | CD49b/CD29 | | |
| VLA-3 (α 3) | CD49c/CD29 | Lymphocyten | Collagen (α 2) Fibronectin (α 4, α 5, α 6) VCAM-1 (α 4) |
| VLA-4 (α 4) | CD49d/CD29 | | |
| VLA-5 (α 5) | CD49e/CD29 | | |
| VLA-6 (α 6) | CD49f/CD29 | | |
| β2-Integrine (CD18) | | | Interaktion zwischen Leukocyten und Endothel über ICAM-1 |
| LFA-1 (α _L β 2) | CD11a/CD18 | Leukocyten | |
| Mac-1 (α _M β 2) | CD11b/CD18 | Neutrophile, Monocyten, Lymphocyten | |
| β3-Integrine (CD61) | | | Cytoadhäsine |
| gpIIb/IIIa | CD41/CD61 | Thrombocyten | |
| VNR (α γ) | CD51/CD61 | Endothel, B-Zellen, Monocyten | |
| Adhäsine der Immunglobulin-Gensuperfamilie | | | |
| Rezeptor | weitere Bezeichnungen | Zelluläre Verteilung | Funktion |
| ICAM-1 | CD54 | aktiviertes Endothel | bindet LFA-1, Mac-1 |
| ICAM-2 | CD102 | Endothelzellen | bindet LFA-1 |
| ICAM-3 | CD50 | Leukocyten | |
| VCAM-1 | CD106 | aktiviertes Endothel | bindet CD49d/CD29 |
| HLA A, B, C | MHC-I | kernhaltige Zellen | bindet TCR, CD8 |
| HLA, DP, DQ, DR | MHC-II | | bindet TCR, CD4 |

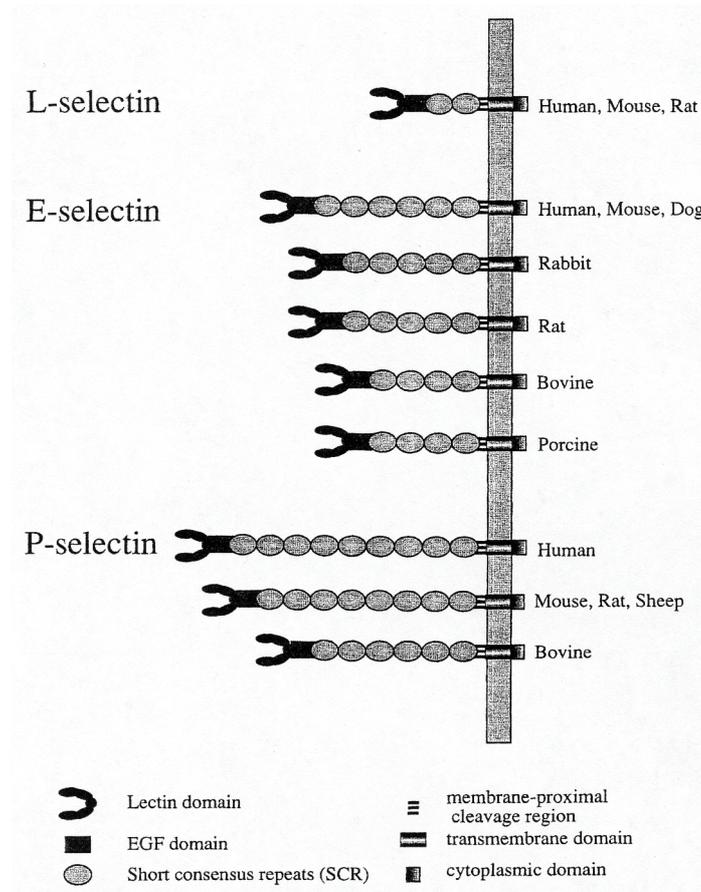


Abbildung 1.4: Strukturelle Organisation der Selektine (aus: Vestweber and Blanks, 1999).

Die individuellen Selektine werden jeweils mit einem Präfix gekennzeichnet, der historisch durch die früheste Lokalisierung determiniert ist.

E-Selektin

E-Selektin (ELAM-1, CD62E) wird von stimulierten Endothelzellen transient exprimiert. Es ist beim Menschen ein 107 bis 115 kDa großes Transmembranprotein. Das Molekulargewicht kann aufgrund von N-Glykosylierungsheterogenitäten variieren. Insgesamt besitzt das Protein 11 Konsensussequenzen für N-Glykosylierungen. Die Glykosylierung beeinflusst aber nicht das Bindungsvermögen für Liganden (Pahlsson *et al.*, 1995). Auch die kurzen repetitiven Konsensus-elemente haben keinen Effekt auf die Ligandenbindung (Ramos, *et al.*, 1997).

Nach Induktion von humanen Endothelzellen *in vitro* wurde ebenso lösliches E-Selektin (Leeuwenberg *et al.*, 1992) mit einem Molekulargewicht von 94 bis 95 kDa gefunden wie in Patienten mit einem septischen Schock (Parekh and Edge, 1994). Das E-Selektin kann also von der Transmembrandomäne abgespalten werden (engl.: shedding).

eine terminale Sialylierung inhärent ist. Dagegen ist eine subterminale Fucosylierung notwendig für eine Bindung, denn die sialylierten Kohlenhydratstrukturen aus CHO Zellen (engl.: Chinese Hamster Ovary) mit der Struktur Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc interagieren nicht mit E-Selektin. CHO Zellen besitzen keine α 1-3Fucosyltransferase (Li *et al.*, 1996). Nach Transfektion der für dieses Enzym codierenden DNA exprimieren dann auch diese Zellen E-Selektin-bindende Kohlenhydratpitope. Die in Abbildung 1.11 dargestellten Kohlenhydratantigene aus eukaryotischen Zellen besitzen ebenfalls keine subterminale Fucosylierung und binden nicht an E-Selektin. Eine zusätzlich zum sLe^x-Epitop vorhandene Fucosylierung an dem N-Acetylglucosamin, ergibt eine Hybridstruktur aus sLe^x- und VIM2-Epitop, die endogen in Neutrophilen auf N-glykosylierten Proteinen gefunden wurde, scheint dagegen eine verstärkte Bindung an E-Selektin zu verursachen (Thakor *et al.*, 1994).

Die Kohlenhydratpitope müssen für eine Wechselwirkung mit E-Selektin auf der Plasmamembranoberfläche von Leukocyten präsentiert werden. Prinzipiell können sie an Sphingolipide und Proteine kovalent gebunden vorliegen. Während auf murinen Neutrophilen das N-glykosylierte Membranprotein ESL-1 (engl.: E-selectin ligand-1) mit einem Molekulargewicht von 150 kDa als E-Selektin Ligand identifiziert wurde (Levinovitz *et al.*, 1993; Zöllner and Vestweber, 1996; Steegmaier *et al.*, 1997 b; Zöllner *et al.*, 1997), sind auf humanen Neutrophilen bisher drei potentielle Liganden mit Molekulargewichten von 80-90 kDa, 130 kDa und 230 kDa entdeckt worden. Das 80-90 kDa Protein wurde als L-Selektin, das selbst sialyliert ist, identifiziert. Bei dem 230 kDa schweren Protein handelt es sich vermutlich um PSGL-1 (engl.: P-selectin glycoprotein ligand-1), das eine 50mal schwächere Affinität zu E-Selektin als zu seinem nativen Liganden, dem P-Selektin, aufweist (Asa *et al.*, 1995) und deshalb kein effizientes Rolling auf E-Selektin-exprimierenden Zellen vermitteln kann (Steegmaier *et al.*; 1997; Yang, J. *et al.*, 1999). Alle drei Proteine wurden mit einem löslichen porcinen E-Selektin-Fusionsprotein gebunden. Mit zwei unterschiedlichen humanen E-Selektin-Fusionsproteinen konnte keine Bindung nachgewiesen werden (Jones *et al.*, 1997). Außerdem binden Neutrophile, denen L-Selektin durch Abscheren (engl.: shedding) fehlt, immer noch an E-Selektin (Varki, 1994). Deshalb ist es fraglich, ob diese Liganden, die *in vitro* auf Nitrocellulosemembranen transferiert eine Bindung mit E-Selektin zeigen, *in vivo* eine E-Selektin-bindende Funktion haben.

Wechselwirkungen von Gangliosiden aus humanen Granulocyten (Stroud *et al.*, 1996 a; Handa *et al.*, 1997) mit E-Selektin wurden ebenfalls nachgewiesen. Sie sind Gegenstand dieser Arbeit (vgl. Kapitel 1.7).

P-Selektin

P-Selektin (PADGEM, LECAM-3, CD62P, GMP-140), das zuerst in Speichergranula der Thrombocyten (engl.: platelets) gefunden wurde, wird ebenfalls von Endothelzellen exprimiert. Es ist in sekretorischen Vesikeln, den Weibel-Palade Körperchen (engl.: Weibel-Palade bodies) lokalisiert und wird nach Induktion der Endothelzelle durch Histamin oder Thrombin innerhalb von Minuten an der Plasmamembranoberfläche als 140 kDa schweres

Protein präsentiert (Bevilacqua *et al.*, 1989; Pober and Cotran, 1990). P-Selektin vermittelt für Neutrophile ein initiales Tethering und Rolling.

Als Ligand auf humanen Neutrophilen wurde das O-glykosylierte 220-240 kDa schwere homodimere PSGL-1-Membranprotein (CD162) identifiziert (Ma *et al.*, 1994). Da auch auf Subpopulationen von B-Lymphocyten (Gedächtnis-B-Lymphocyten; engl.: memory-B-lymphocytes) ein 240 kDa schweres Glykoprotein entdeckt wurde (Montoya *et al.*, 1999) und Subpopulationen von T-Lymphocyten und NK-Zellen an P-Selektin binden (Moore and Thompson, 1992), ist zu vermuten, daß auch diesen Populationen PSGL-1 inhärent ist. Gefunden wurde dieses Sialomucin auf Neutrophilen, die eine Lektin-artige Affinität zu P-Selektin aufwiesen (Moore *et al.*, 1991). Auch bei HL-60 Zellen wurde dieses Protein mittels P-Selektin Detektion in Zellmembranlysaten, die auf eine Nitrocellulosemembran transferierte waren, gefunden (Moore *et al.*, 1992). Die Funktion als P-Selektinligand wurde bestätigt, indem HL-60-cDNA, die in COS-Zellen transfiziert wurde, zur Expression eines P-Selektin-bindenden Proteins führte (Sako *et al.*, 1993). Das PSGL-1 ist sialyliert, fucosyliert und sulfatiert (Moore *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Snapp *et al.*, 1998). Die N-terminalen 19 Aminosäuren mit der O-Glykosylierung am Threonin-16 sind für eine Bindung von P-Selektin ausreichend (Goetz *et al.*, 1997). Dabei muß für eine hohe Avidität aber an mindestens einer von drei Tyrosinresten eine Sulfatierung des Liganden vorliegen (Vestweber and Blanks, 1999; Feizi, 2001). Inkubation von Neutrophilen mit PAF (engl.: platelet-activating factor) führt zu einer Entfernung (shedding) des PSGL-1 innerhalb von Minuten (Davenpeck *et al.*, 2000).

L-Selektin

L-Selektin (LECAM-1, CD62L, MEL14) ist ein sialyliertes Glykoprotein, das auf den meisten Leukocyten, u.a. auch auf Neutrophilen, Lymphocyten und den HL-60 Zellen exponiert ist (Jutila *et al.*, 1989). Das Protein wird im Gegensatz zu E- und P-Selektin konstitutiv exprimiert (Parekh and Edge, 1991). Auf Neutrophilen ist es ein 90-100 kDa schweres Membranprotein, das die initialen Schritte der Zelladhäsion zwischen den Leukocyten und induzierten Endothelzellen vermittelt (Ley *et al.*, 1991; Kishimoto *et al.*, 1990). Auf Lymphocyten ist es ein 74 kDa schweres Membranprotein, das die Rezirkulation dieser Zellen vom Blut in die Lymphgefäße ermöglicht (engl.: homing). Dabei bindet das L-Selektin an „Adressine“ (Mucine), die von den speziellen Endothelzellen mit hohem kuboidalen Querschnitt (Hochendotheliale Venolen; engl.: HEV = high endothelial venules) in den peripheren Lymphknoten exprimiert werden. Dazu gehört das 50 kDa schwere sekretierte Mucin GlyCAM (engl.: glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1) (Mebius *et al.*, 1993; Tangemann *et al.*, 1999) und das Transmembranglykoprotein CD34, ein 105-120 kDa schweres Sialomucin. CD34 (Baumhueter *et al.*, 1993) wird ebenfalls von Endothelzellen des gesamten vascularen Systems, auf embryonalen Fibroblastenzelllinien und im Gehirn exprimiert, besitzt aber für eine L-Selektin Wechselwirkung nur im hohen Endothel der peripheren Lymphknoten die korrekte Glykosylierung (Vestweber and Blanks, 1999). In den Lymphknoten der Darmschleimhäute, zu denen auch die Peyer'schen Plaques gehören, exprimieren die hohen Endothelzellen ein 58-66 kDa schweres Protein der Immunglobulin-

gensuperfamilie, das MAdCAM-1 (engl.: mucosal adressin cell adhesion molecule-1). An dieses membranständige Protein binden ebenfalls Lymphocyten über L-Selektin Wechselwirkungen.

L-Selektin bindet mit hoher Affinität an 6-sulfo-sialyl-Lewis^x (Snapp *et al.*, 1998; Tu *et al.*, 1999; Ohmori *et al.*, 2000). Dieses HECA-452 Epitop ist auch auf PSGL-1 präsent, so daß Neutrophile in einem Prozeß der sekundären Interaktion (engl.: secondary tethering) mit bereits adhärirten Neutrophilen in Kontakt kommen und dabei ihre Geschwindigkeit im Blutstrom verlangsamen. Nach Aktivierung von Neutrophilen durch Bindung an Endothelzellen wird das L-Selektin durch Shedding von der Plasmamembran abgelöst (Kishimoto *et al.*, 1989).

Integrine

Integrine sind heterodimere Proteine, die aus einer α - und einer β -Kette bestehen. Die beiden Transmembranlykoproteinketten sind dabei nicht-kovalent verbundenen. Bisher sind 15 verschiedene α -Ketten und acht verschiedene β -Ketten bekannt, die in unterschiedlicher Kombination 21 nativ vorkommende Integrinheterodimere bilden können. Die α -Kette trägt am N-Terminus drei Ca^{2+} -Bindungsstellen, die für die Funktion des Integrins essentiell sind (Imhof and Dunon, 1995). Diese Kette bestimmt bei β 1- und β 2-Integrinen hauptsächlich die Ligandenspezifität. Integrine sind vor allem für den Gewebeerhalt durch Verankerung der Zelle in der extrazellulären Matrix verantwortlich und werden konstitutiv in einem inaktiven Zustand exprimiert. Durch ein aktivierendes Signal, zum Beispiel durch einen Chemokinrezeptor, wird die Konformation des Proteins geändert, wodurch es von einem niedrigaffinen in einen für den jeweiligen Liganden hochaffinen Zustand überführt wird. Vier der 21 nativ vorkommenden Kombinationen werden von Leukocyten exprimiert und sind für Entzündungsprozesse von Bedeutung. Dazu gehören das VLA-4 (α 4 β 1; engl.: very late antigen-4; 150/130 kDa), das LPAM-1 (α 4 β 7; 150/120 kDa), das LFA-1 (α 1 β 2; engl.: lymphocyte function-associated antigen-1; 180/95 kDa) und das Mac-1 (α M β 2; 170/95 kDa) (vgl. Tabelle 1.2). Die beiden β 2-Integrine werden von Neutrophilen exprimiert und sind für den dritten Schritt der Adhäsionskaskade an induzierte Endothelzellen, die statische Adhäsion verantwortlich (Luscinskas *et al.*, 1989; von Andrian *et al.*, 1991). Sie werden nach Stimulation durch PAF (Zimmermann *et al.*, 1997) oder regulatorische Reduktion von L-Selektin aktiviert (Kishimoto *et al.*, 1989) und binden an Proteine der Immunglobulinsuperfamilie, die von Endothelzellen exprimiert werden. LFA-1 bindet dabei sowohl an ICAM-2 (engl.: intercellular adhesion molecule-2), das von Endothelzellen konstitutiv synthetisiert wird, als auch an ICAM-1 (engl.: intercellular adhesion molecule-1), das nur von induzierten Endothelzellen exprimiert wird (Tominaga *et al.*, 1998). Mac-1 dagegen bindet an ICAM-1, aber nicht an ICAM-2 (Imhof and Dunon, 1995).

Granulocyten exprimieren im Gegensatz zu Lymphocyten keine β 7-Integrine. Diese dienen einer Subpopulation von Lymphocyten für das Auswandern (Homing) aus dem Blutstrom in die Lymphknoten der Darmschleimhäute (Peyer'schen Plaques). Als Ligand des α 4 β 7-Integrins fungiert in diesem Fall das MAdCAM, das ausschließlich von hohen Endothelzellen der Lymphknoten in den Darmschleimhäuten exprimiert wird. Dabei verursacht die

Interaktion von $\alpha 4\beta 7$ mit MAdCAM ein Rolling der Lymphocyten auf den Endothelzellen (Berlin *et al.*, 1993; Berg *et al.*, 1993; Bargatze *et al.*, 1995).

Die $\alpha 4$ -Ketten der beiden Integrine $\alpha 4\beta 7$ und VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) sind in der Lage mit dem nur von induzierten Endothelzellen exprimierten VCAM-1 (engl.: vascular cell adhesion molecule-1) zu interagieren. Dabei löst $\alpha 4\beta 7$ bereits ein Rolling und transiente Adhäsion der Lymphocyten auf dem Protein der Immunglobulinsuperfamilie aus (Berlin *et al.*, 1995). Die Bindung von VLA-4 an VCAM-1 kann zu einer statischen Adhäsion führen (Elices *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1993). Mittels dieser beiden Integrine sind die Lymphocyten in der Lage, als weiteres „Abwehrinstrument“ nach den Granulocyten in entzündetes Gewebe einzuwandern.

Induktion der E-Selektin-Expression

Außer der beabsichtigten E-Selektin-Expression bei vorliegenden Entzündungen wird nach Infarkten als klinisches Symptom ebenfalls E-Selektin verstärkt exprimiert. Es wurden im Falle einer Ischämie zwei Expressionsmaxima festgestellt. Das erste tritt 45 Minuten nach Beginn der Ischämie und das zweite fünf (Russell *et al.*, 2000) bzw. 24 Stunden (Jones *et al.*, 2000; Singbartl and Ley, 2000) nach Beginn der Reperfusion auf. Dazu wurde eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit Ausbildung von Ödemen und eine Neutrophileninvasion in das betroffene Gewebe festgestellt (Seekamp and Ward, 1993; Verrier, 1996). Die aktivierten Neutrophilen können das temporär O₂-unterversorgte Gewebe durch Enzymfreisetzung noch weiter schädigen.

Im Falle einer Inflammation (siehe Abbildung 1.5) wird E-Selektin von Endothelzellen erst nach gerichteter Induktion exprimiert. Als Induktoren *in vivo* sind in erster Linie TNF- α , IL-1 β und Lipopolysaccharide (LPS) verantwortlich (Yoshida *et al.*, 1993), die die transiente *de novo* Synthese einleiten (Kuijpers *et al.*, 1992; Yuen *et al.*, 1992).

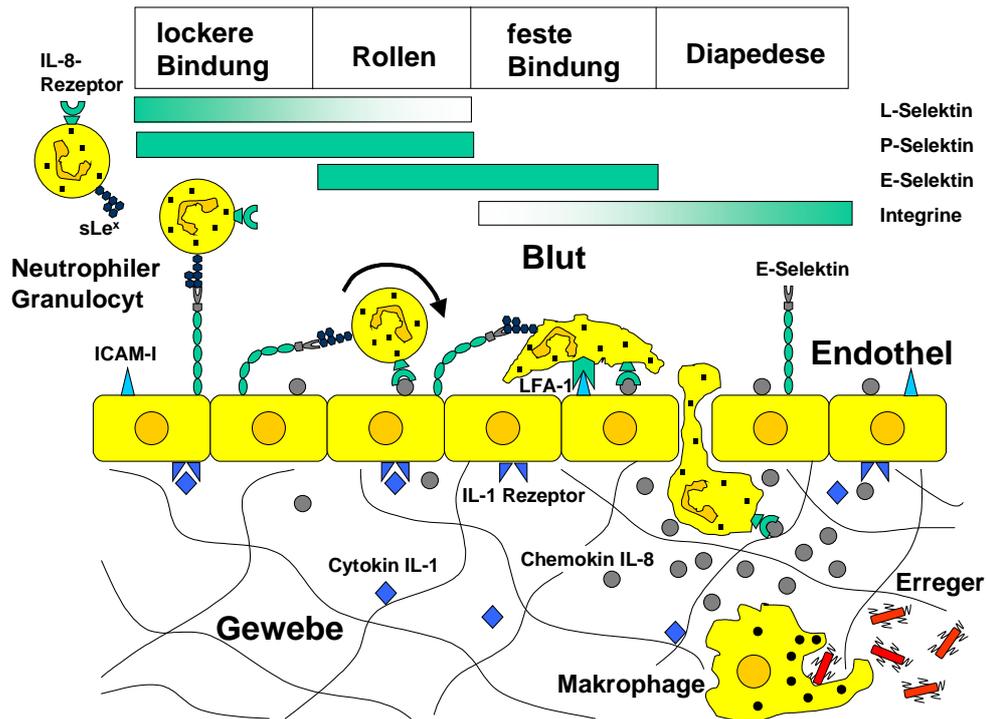


Abbildung 1.5: Zelluläre Interaktionen einer Entzündung *in vivo*. Ein Makrophage entdeckt einen Erreger und sezerniert Interleukin 1. Dies stimuliert das Endothel zur Expression von E-Selektin, an das neutrophile Granulocyten mit ihren sLe^x-Glykokonjugatliganden adhären. Diese Wechselwirkung führt zur Aktivierung einer LFA-1/ICAM-1 Bindung, durch die die Adhäsion stabilisiert wird. Gleichzeitig setzt der Makrophage Interleukin 8 frei. Die neutrophilen Granulocyten folgen diesem chemotaktischen Gradienten durch Diapedese zum Ort der Entzündung.

Für die in dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Induktion von E-Selektin auf humanen Endothelzellen wurden die Cytokine IL-1 β und TNF- α verwendet.

IL-1 β

Interleukin-1 β ist ein 17 kDa schweres Protein, das nach Spaltung des 31 kDa-Vorläuferproteins von Monocyten nach inflammatorischer Stimulation sezerniert wird (Nylander-Lundqvist *et al.*, 1996; Hanna *et al.*, 1997). Auf Endothelzellen interagiert es mit dem IL-1-Rezeptor-1. Innerhalb von zwei Stunden werden die Zellen dann irreversibel (Adamson *et al.*, 1996) über eine NF- κ B-involvierende Proteinkinase C-unabhängige Signaltransduktionskaskade induziert (Tamaru and Narumi, 1999). Die maximale E-Selektin-Expression ist vier bis sechs Stunden nach Induktionsbeginn erreicht (Imhof and Dunon, 1995) und sinkt danach innerhalb von 48 Stunden auf den Ausgangswert ab (siehe Abbildung 1.6). Zusätzlich werden bei Induktion von humanen Endothelzellen mit IL-1 β die beiden Proteine der Immunglobulinsuperfamilie VCAM-1 und ICAM-1 synthetisiert, deren maximale Expression nach 8 bzw. 24 Stunden auftritt (Meager, 1999). Bei Mäusen (Harari *et al.*, 1999), Schweinen (Stocker *et al.*, 2000), Rindern, Kaninchen und Ratten (Yao *et al.*, 1999) wird durch Induktion mit IL-1 außerdem noch die P-Selektin Expression gesteigert. Dieser Effekt tritt nicht bei Primaten - also auch nicht beim Menschen

- auf (Yao *et al.*, 1996), bei dem die P-Selektin-Expression selektiv durch Histamin oder Thrombin induzierbar ist.

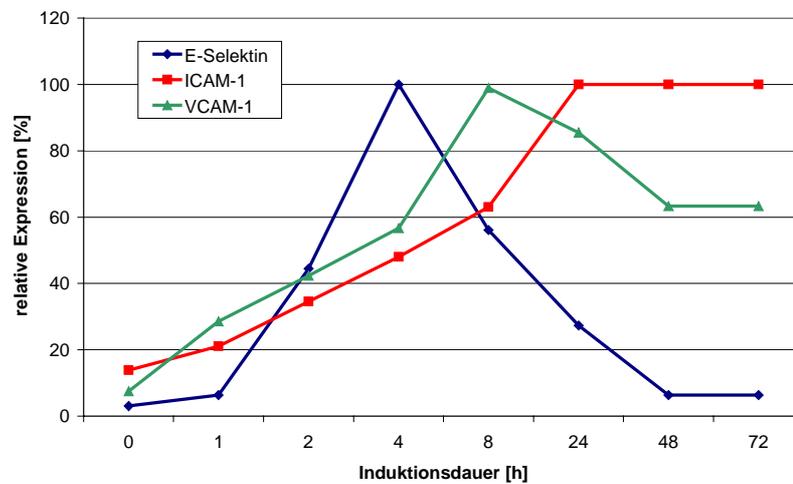


Abbildung 1.6: Kinetik der Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 bei Induktion von humanen Endothelzellen mit TNF- α bzw. IL-1 β (nach Imhof and Dunon, 1995).

TNF- α

Tumornekrosefaktor- α kommt in Makrophagen als membrangebundenes 17 kDa-Vorläuferprotein vor, das nach proteolytischer Spaltung in Lösung geht. Es bindet an zwei Rezeptoren (p55, p75), von denen der 55 kDa-Rezeptor (TNF-Rezeptor-1) die proinflammatorische Wirkung auslöst. Dabei wird über die JNK-1- und NF- κ B-vermittelte Signaltransduktion die Expression von E-Selektin ausgelöst (Montgomery *et al.*, 1991; Hanna *et al.*, 1997; Pober, 1998). Die Kinetik der E-Selektin-Expression verläuft parallel zu der IL-1 β induzierten. TNF- α induziert ebenfalls wie IL-1 β die Synthese von ICAM-1 und VCAM-1 in humanen Endothelzellen. TNF- α bedingt dort aber, im Gegensatz zu der Reaktion von Mausendothelzellen (Gotsch *et al.*, 1994), nicht die Expression von P-Selektin.

1.5.1 Nachahmung der inflammatorischen Wechselwirkungen *in vitro*

Die nach Induktion der Endothelzellen *in vivo* interagierenden Moleküle zwischen Neutrophilen und Endothelzellen bzw. zwischen Lymphocyten und Endothelzellen sind in Abbildung 1.7 mit ihren Bindungspartnern dargestellt.

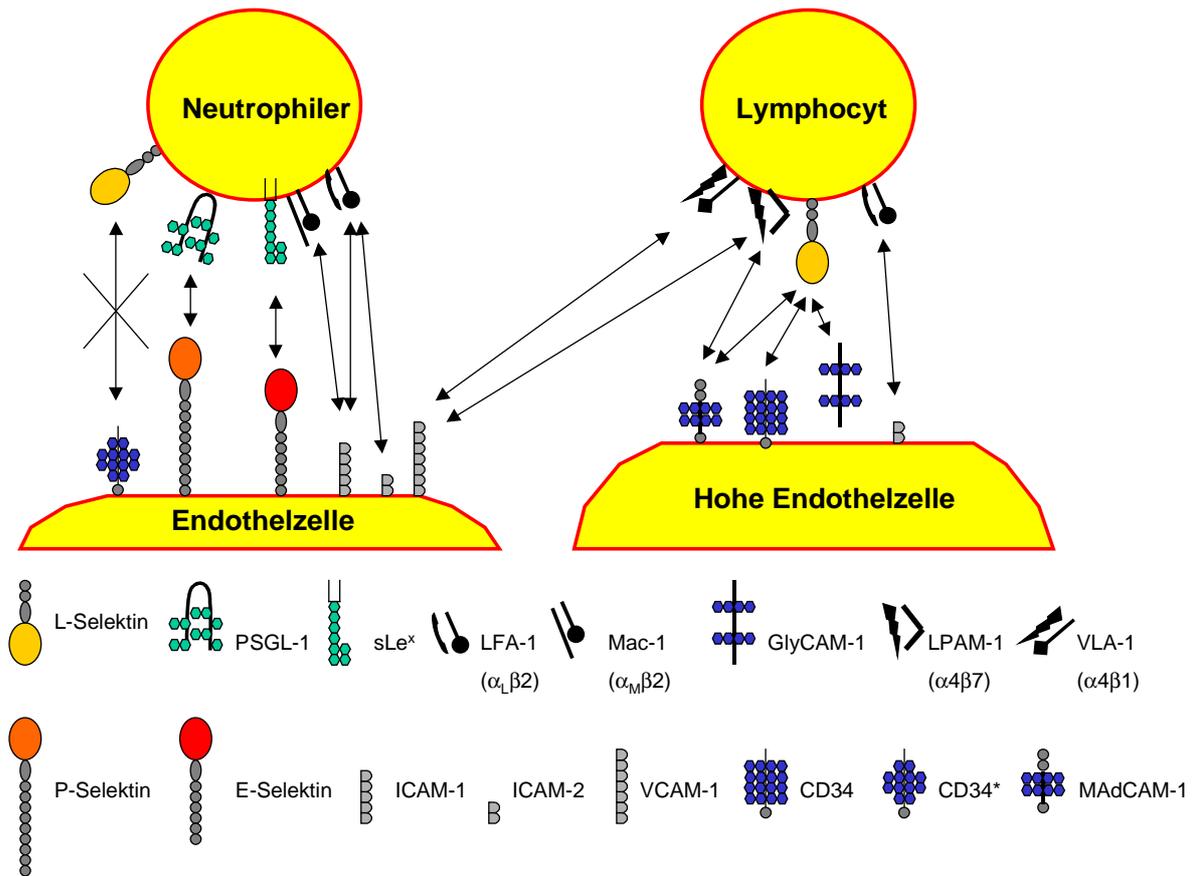


Abbildung 1.7: Interaktion der für die Bindung von Leukocyten an Endothelzellen entscheidenden Moleküle *in vivo*. Nach IL-1β- bzw. TNF-α- und Histamin- bzw. Thrombin-Induktion der Endothelzelle in den Venolen (links) exprimiert diese zusätzlich zu CD34* und ICAM-2 noch E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. Das CD34* weist auf diesen Endothelzellen eine modifizierte Glykosylierung auf, die keine Affinität zu L-Selektin bedingt. P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 binden dagegen an die jeweiligen Partner auf den Neutrophilen, wodurch es zu einem Rolling, zur statischen Adhäsion und zur Diapedese kommt. Die Lymphocyten binden mit zwei Integrinen an VCAM-1 und wandern zeitversetzt ebenfalls in das entzündete Gewebe ein. Sie adhären mittels L-Selektin bzw. α₄β₇ an Liganden die nur vom hohen Endothel der Lymphknoten exprimiert werden und transmigrieren dort vom Blut in die Lymphknoten.

Die Fülle von Interaktionen läßt sich *in vitro* durch Auswahl der Induktoren bzw. durch Austausch der primären Zellen mit Zelllinien auf die zu untersuchende Bindung von E-Selektin mit seinen potentiellen Liganden minimieren (siehe Abbildung 1.8).

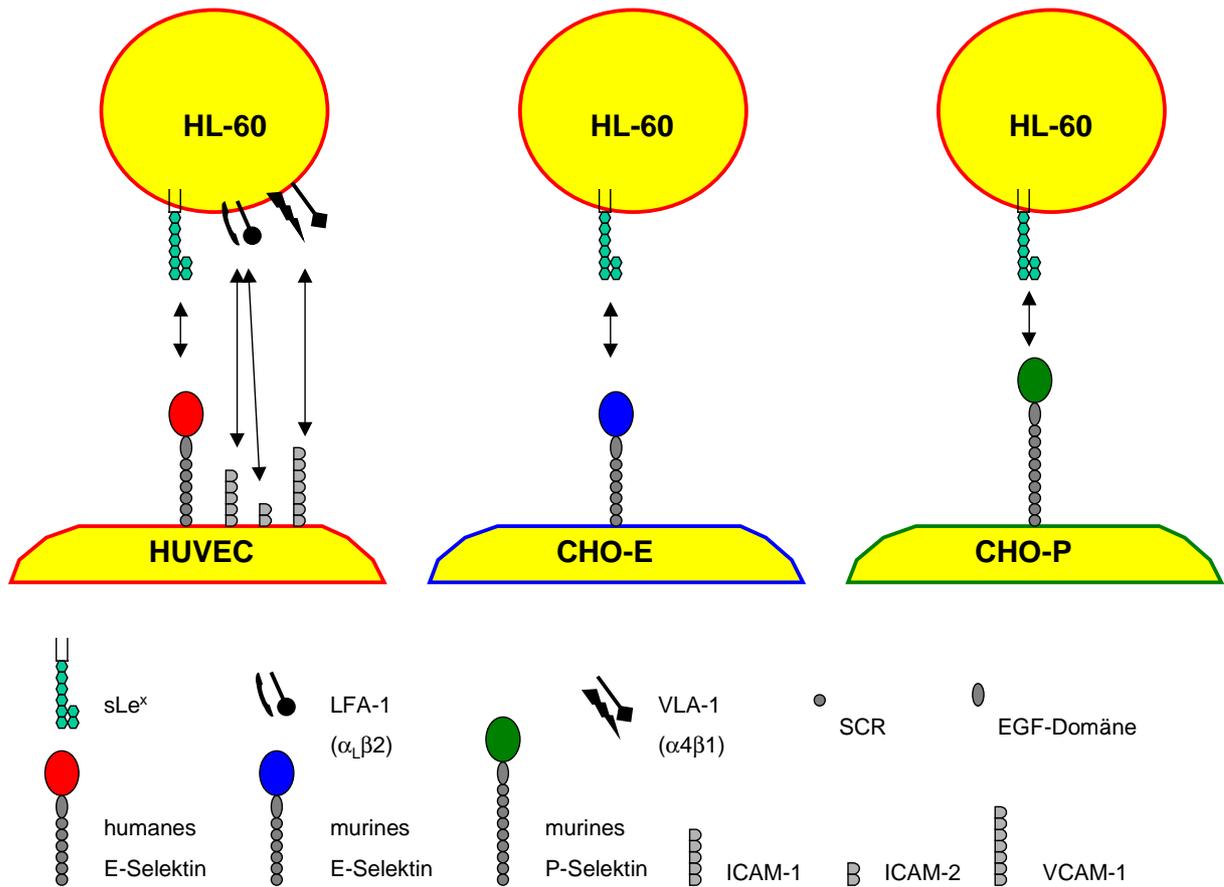


Abbildung 1.8: Untersuchungsmodelle für die E- und P-Selektin-vermittelte Interaktion *in vitro*. Die primären Endothelzellen wurden durch humane primäre Endothelzellen aus einer Nabelschnurvene (HUVEC; engl.: human umbilical vein endothelial cells) bzw. E- und P-Selektin-transfizierte CHO-Zellen ersetzt. Statt primärer Neutrophiler wurden HL-60 Zellen verwendet. Die möglichen Interaktionen mit den Bindungspartnern sind schematisch dargestellt.

Als Ersatz für die Endothelzellen aus Venolen wurden aus einer Nabelschnurvene isolierte primäre Endothelzellen (HUVEC; engl.: human umbilical vein endothelial cells) verwendet, die mit IL-1 β bzw. TNF- α zur E-Selektin-Expression induziert wurden. Allerdings werden durch diese Induktion auch ICAM-1 und VCAM-1 exprimiert, die mit Integrinen auf den als „Neutrophilen-Ersatz“ fungierenden HL-60 Zellen wechselwirken können. Zur weiteren Minimierung auf die zu untersuchende Wechselwirkung zwischen E-Selektin und seinen potentiellen Liganden wurde eine mit E-Selektin-transfizierte CHO-Zelllinie eingesetzt. CHO Zellen synthetisieren weder ICAM-1 noch VCAM-1 (Marx *et al.*, 1998), deshalb ist auch keine Bindung zwischen diesen Molekülen und den Integrinen auf den HL-60 Zellen möglich. Die Bindungsaktivität von P-Selektin für HL-60 Zellen wurde mit einer P-Selektin-transfizierten CHO Zelllinie untersucht.

1.6 Der Aufbau eukaryotischer Plasmamembranen

Die Plasmamembran eukaryotischer Zellen ist eine aus amphipathischen Molekülen asymmetrisch aufgebaute fluide Lipid-Doppelschicht (engl.: layer), die das Cytoplasma vom extrazellulären Raum abgrenzt. Sie besteht bei Leberzellen aus folgenden Bestandteilen: 7% Phosphatidylethanolamin, 4% Phosphatidylserin, 24% Phosphatidylcholin, 19% Sphingomyelin, 7% Glykolipiden, 17% Cholesterin und 22% andere Komponenten (Alberts *et al.*, 1990). Das Verhältnis der einzelnen Anteile variiert von Zelltyp zu Zelltyp. Die Asymmetrie der Plasmamembran in bezug auf die äußere und innere Plasmamembranseite ist gekennzeichnet durch drei wesentliche Parameter: Der Verteilung der Kopfgruppen, der Verteilung der Fettsäure-, „Schwänze“ und der Glykosylierungsverteilung.

Für die Kopfgruppenanordnung gilt das fast ausschließliche Vorhandensein von Cholin-haltigen Bestandteilen (Phosphatidylcholin und Sphingomyelin) auf der Außenseite und der Lokalisation von Phospholipiden mit einer terminalen primären Aminogruppe (Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin) auf der dem Cytoplasma zugewandten Innenseite.

Die Fettsäure-, „Schwänze“ von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin sind stärker gesättigt als die Kohlenwasserstoffketten von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin. Dadurch wird die Fluidität der äußeren Plasmamembranhälfte herabgesetzt, denn gesättigte Kohlenwasserstoffketten können leichter miteinander in Wechselwirkung treten als ungesättigte, deren *cis*-Doppelbindungen Biegungen verursachen und damit eine dichte Packung verhindern.

Die glykosylierten Membranlipide und -proteine sind auf die extrazelluläre Seite beschränkt, die in ihrer Gesamtheit die als Glykokalyx bezeichnete Mikroumgebung der peripheren Zelloberfläche ausmachen.

Die etwa 5 nm dicke Plasmamembranschicht fungiert als selektiver Filter für wasserlösliche Stoffe und als zweidimensionales Lösungsmittel für Membranproteine und -lipide. Singer und Nicolson entwickelten 1972 das *Flüssig-Mosaik-Modell* (Stryer, 1990) nach dem die Bestandteile der äußeren Zellmembranhälfte gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt sind. Die Fluidität der Membran wird aber außer der bereits erwähnten Sättigung der Kohlenwasserstoffketten noch durch die Länge dieser Ketten beeinflusst. Längere Fettsäure-, „Schwänze“ bewirken eine geringere Fluidität, da die Neigung, miteinander in Wechselwirkung zu treten, größer ist als bei kurzkettigen Strukturen. Ein weiterer Faktor, der die Zellmembran viskoser werden läßt, ist die Einlagerung von Cholesterinmolekülen, deren starre und planare Steroid-Ringe mit den Kohlenwasserstoffketten wechselwirken. Eine künstliche, nur aus Phospholipiden eines einzigen Typs bestehende Lipid-Doppelschicht geht bei Temperaturniedrigung bei einem charakteristischen Stockpunkt vom flüssigen in einen festen, kristallinen oder amorph-gelartigen Zustand (Gel-Phase) über. Diese Zustandsänderung wird als Phasenübergang (engl.: phase transition) bezeichnet. Unterschiedliche Lipide besitzen jeweils definierte Stock- bzw. Schmelztemperaturen, so daß in Mischungen Phasentrennungen zwischen der kristallinen und der flüssigen konventionellen Phase (engl.: conventional phase; l_c -Phase) auftreten können (Brown and London, 1998).

Durch den Einfluß von Cholesterin kann eine weitere träge Phase entstehen, deren Bestandteile wie diejenigen der Gel-Phase durch langkettige gesättigte Kohlenwasserstoffketten mit enger Packung gekennzeichnet ist (Brown and London, 2000). Allerdings besitzen diese Fettsäure-„Schwänze“ noch eine hohe Rotationsfreiheit. Die dadurch gekennzeichnete geordnete Phase (l_o -Phase) wurde zuerst von Ipsen *et al.* (1987) beschrieben.

Eine Extraktion der Membranlipide eukaryotischer Zellen mit dem Detergens Triton X-100 bei 4°C führt zu Glykolipid- und Cholesterin-reichen unlöslichen Komplexen (engl.: detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes; DIGs) bzw. unlöslichen Membrankomponenten (engl.: detergent-resistant membranes; DRMs). Dies legte die Vermutung nahe, daß diese Komplexe als l_o -Phase in der Plasmamembran vorkommen. Daraus entwickelte Simons das sogenannte „raft“-Modell (engl. für Floß). Dabei sollten Sphingolipid- und Cholesterin-reiche Cluster als „Flöße“ auf der flüssigeren inneren Membranhälfte schwimmen und eine Sortierfunktion für Glykolipide, die bei eukaryotischen polaren Epithelzellen stets auf der apikalen Seite zu finden sind, ausüben (Simons and Ikonen, 1997; Verkade and Simons, 1997; Harder *et al.*, 1998; Kobayashi and Hirabayashi, 2001). In DIGs wurden außerdem Proteine gefunden, die entweder über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) verfügten, oder mit Myristat bzw. Palmitat acyliert waren (Varma and Mayor, 1998; Friedrichson and Kurzchalia, 1998; Melkonian *et al.*, 1999; Moffett *et al.*, 2000). Vor allem das Auffinden der Src-Familie-Tyrosinkinasen in den DIGs führte zu dem Modell der Glykosignaldomäne (engl.: glycosignaling domain; GSD), das den „rafts“ eine Signaltransduktion zuspricht (Hakomori *et al.*, 1998; Hoessli *et al.*, 2000). Tatsächlich wurde eine Signaltransduktion bereits unter Beteiligung des Gangliosids G_{M3} (vgl. Kapitel 1.7) in Form von transienten Substratphosphorylierungen nachgewiesen (Iwabuchi *et al.*, 2000; Hakomori, 2000). So resultiert eine Quervernetzung von Glykosphingolipiden in einer Dimerisierung von GPI-verankerten Proteinen und zur Aktivierung von Src-Kinasen. Bisher wurden 15 Rezeptoren, darunter der EGF Rezeptor (engl.: EGF = epidermal growth factor; Epidermis-Wachstumsfaktor), der PDGF Rezeptor (engl.: PDGF = platelet derived growth factor; Blutplättchenwachstumsfaktor), der Insulin Rezeptor, der T-Zell-Rezeptor und der $F_c\varepsilon$ -Rezeptor I (engl.: F_c = fragment crystallizing) im Verbund mit „rafts“ gefunden (Prieschl and Baumruker, 2000; Kasahara and Sanai, 2001). Außerdem wurden bisher vier GPI-verankerte Proteine, drei Ionenkanäle bzw. -pumpen, acht nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen – darunter die bereits erwähnte Src-Familie -, fünf GTP-bindende Proteine (GTP = Guanosintriphosphat) – darunter die Proteine Ras und Rho – und sechs Effektorproteine – u.a. die Adenylatcyclase, die MAP-Kinase, die Phospholipase $C\gamma$ und die Phospholipase D - als „raft“-integrierte Komponenten identifiziert. Die erwähnten Proteine zählen alle zu der Signalkaskadenmaschinerie eukaryotischer Zellen. Somit erscheint das Modell der Glykosignaldomäne plausibel.

„Rafts“ konnten sowohl in künstlichen Lipidmembranen *in vitro* erzeugt werden (Dietrich *et al.*, 2001) als auch durch Elektronenmikroskopie an Gefrierbruchpräparaten mit Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Studien und chemischen Vernetzungsstudien *in vivo* detektiert werden (Kasahara and Sanai, 1999). Die ermittelten Durchmesser variierten von 26

(± 13) nm (Pralle *et al.*, 2000) bis zu 300 nm (Kasahara and Sanai, 1999). Abbildung 1.9 zeigt ein Modell der Entstehung der Membrandomänen.

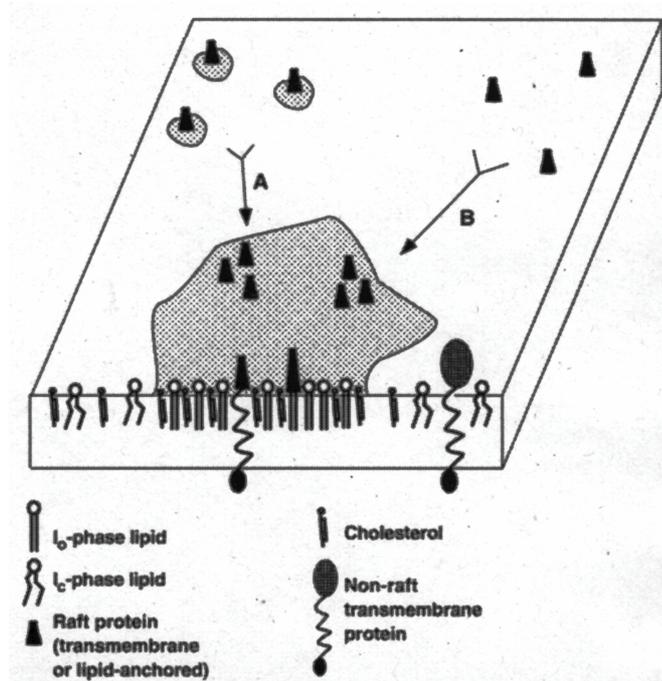


Abbildung 1.9: Modell der „raft“-Zusammensetzung. Dicht gepackte Sphingolipide sind in der l_o-Phase (grau) angereichert. „raft“-affine Proteine koaleszieren entweder zu einer größeren Membrandomäne (A) oder die Membrandomäne hat eine hohe Affinität für bestimmte Proteine, die dann inserieren (B). Möglicherweise induziert auch eine Zusammenlagerung von Membranproteinen die Entstehung von „rafts“ (Brown and London, 2000).

Cholesterin ist ein notwendiger Bestandteil zur Ausbildung von „rafts“. Bei Cholesterin-Extraktion wird die vormals reduzierte Diffusion integrierter Membranproteine in den „rafts“ beschleunigt. Außerdem sind für die Ausbildung der „rafts“ hydrophobe Interaktionen zwischen den Fettsäureresten der Lipidmoleküle wichtiger als Interaktionen zwischen eventuell vorhandenen polaren Kopfgruppen (Wang and Silvius, 2000; Wang *et al.*, 2000). So bilden sich nach Membranextraktion einer Glykosphingolipid (siehe Kapitel 1.7) –defizienten Zelllinie noch „rafts“ aus (Ostermeyer *et al.*, 1999). Dabei überexprimiert diese Zelllinie Sphingomyelin, dessen Kopfgruppe Cholin zusammen mit der Phosphatgruppe eine neutrale Nettoladung hat. Sphingolipide sind in den „raft“-Membrandomänen angereichert zu finden. Dazu gehören auch die sauren Glykosphingolipide, deren Einfluß auf die Zell-Zell-Adhäsion Schwerpunkt dieser Arbeit ist.

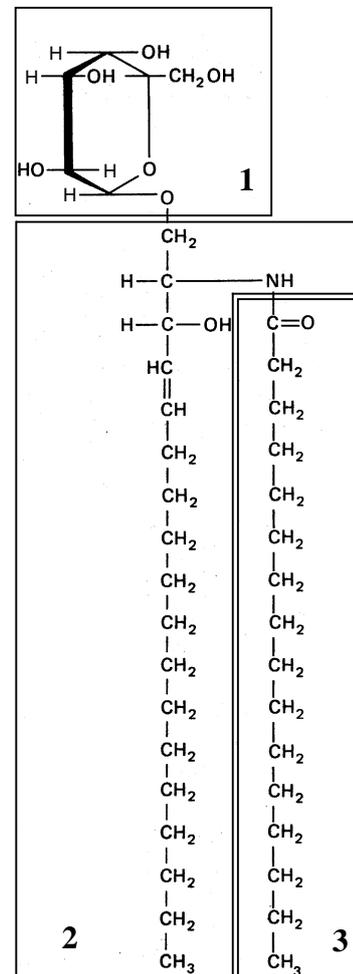
1.7 Glykosphingolipide (GSL)

Die in Tabelle 1.3 aufgeführten Kohlenhydratstrukturen müssen für eine effektive Wechselwirkung mit E-Selektin auf Leukocyten präsentiert werden. Die Oligosaccharide können entweder an Proteine oder an Lipidstrukturen (Ceramide) gebunden werden. Letztere werden als Glykosphingolipide (GSL) bezeichnet.

GSL bestehen aus einem hydrophoben Ceramid-Lipidanteil, der das Molekül in der Membran verankert, und einem extrazellulären hydrophilen Oligosaccharidanteil. Das Ceramid setzt sich aus dem basischen Aminoalkohol Sphingosin und einer Fettsäure zusammen, die über eine Säureamidbindung verknüpft sind (siehe Abbildung 1.10).

Abbildung 1.10: Schema der Grundstruktur der Glykosphingolipide (GSL); 1: Kohlenhydratanteil, 2: Sphingosin, 3: Fettsäurerest, 2+3: Ceramid.

In biologischen Membranen wurden Fettsäuren mit Kettenlängen von C_{14} bis C_{24} gefunden, von denen die am häufigsten vertretenen C_{16} -, C_{18} - und C_{24} -Fettsäuren sind.



Der Kohlenhydratanteil mit seinen Substituenten bestimmt die Einteilung der GSL in zwei große Gruppen, die neutralen ungeladenen und die sauren negativ geladenen GSL. Die sauren GSL werden weiterhin in Sulfatide, die eine oder mehrere O-gebundene Sulfatgruppen enthalten, und Ganglioside, die mindestens eine Neuraminsäure (Sialinsäure) besitzen, eingeteilt.

Als Neutralzucker kommen hauptsächlich D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal), N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), N-Acetyl-D-galactosamin (GalNAc) und L-Fucose (Fuc) vor. Insgesamt sind die GSL hochvariabel (Stults *et al.*, 1989) und unterscheiden sich durch

- die Anzahl, Art und Abfolge der gebundenen Monosaccharide des Oligosaccharidanteils,
- die Art der anomeren Konfiguration (α , β) und Position der glykosidischen (1-3, 1-4) Bindungen der Oligosaccharide,

- die Anzahl, Art und Lokalisation der Sialinsäuren an den Neutralzuckerketten (bei Gangliosiden),
- die Kettenlängen der am Sphingosin gebundenen Fettsäuren ($C_{14} - C_{24}$), und
- die Anzahl und Position der *cis*-Doppelbindungen innerhalb der Fettsäuren.

Aufgrund der variablen Struktur ihrer Oligosaccharidketten werden die GSL verschiedenen Serien oder Familien nach der Nomenklatur der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) Commission on Biochemical Nomenclature (1997) zugeordnet.

Tabelle 1.4: Häufigste Strukturfamilien der Glykosphingolipide am Beispiel von Tetraosylceramiden.

| Strukturfamilie | IUPAC Abkürzung | Struktur |
|-----------------|----------------------|------------------------------------|
| Ganglio- | Gg ₄ Cer | Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer |
| Globo- | Gb ₄ Cer | GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer |
| Lacto- | Lc ₄ Cer | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer |
| Neolacto- | nLc ₄ Cer | Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer |

Die GSL mit einem am Ceramid gebundenen Mono- bzw. Disaccharid werden nach dem Trivialnamen dieser Zucker mit der Endung Cer benannt (z.B. Galβ1-4Glcβ1-1Cer = Lactosylceramid). Bei längeren Kohlenhydratketten wird die jeweilige Bezeichnung der in Tabelle 1.4 dargestellten Serien verwendet. Die Abkürzung der Strukturfamilie wird mit der Zahl der Zuckerreste und der Endung Cer versehen (z.B. Gg₄Cer = Gangliotetraosylceramid). Die Position der Sialinsäure der Ganglioside wird anhand von römischen Ziffern angegeben. Dabei werden die Zuckerketten vom Ceramid ausgehend durchnummeriert und die Bindung der Sialinsäure (Neu5Ac, Neu5Gc) mit dem hochgestellten Index 3 oder 6 charakterisiert, je nachdem ob eine α2-3- oder α2-6- Konfiguration vorliegt. Ein Gangliosid aus Lactose und einer in α2-3-Konfiguration an die Galactose gebundenen Sialinsäure (Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer) wird also mit II³Neu5Ac-LacCer bezeichnet. Die Ganglioserie ist mengenmäßig besonders im Gehirn vertreten, die Globoserie tritt bei den Blutgruppenantigenen in Erscheinung und die Neolactoserie wird stark in humanen Granulocyten exprimiert. Ganglioside der Neolactoserie sind generell terminal sialyliert, wobei dann z.B. im Falle von nLc₄Cer die Position IV sialyliert ist.

1.7.1 Biosynthese der GSL

Glykosphingolipide sind sekundäre Genprodukte, die durch die Enzymmaschinerie der Zelle generiert werden. Ausgehend von Palmityl-CoA und Serin, die zu Dehydrosphingamin kondensieren, das anschließend in Sphingosin umgewandelt wird, entsteht schließlich Ceramid über eine Reaktion mit Acyl-CoA. Die Synthese des Ceramids geschieht im Endoplasmatischen Reticulum (ER). Die Glucosylceramidsynthase katalysiert den ersten Schritt des Kohlenhydrattransfers an das Ceramid. Folgend wird der Kohlenhydratanteil schrittweise durch membranständige Glykosyltransferasen, von denen die Reaktionspro-

dukte der Ganglioserie in Abbildung 1.11 dargestellt sind, verlängert. Die jeweiligen Enzyme verwenden aktivierte Nukleotidphosphatzucker wie z.B. UDP-Gal oder UDP-GlcNAc. Die Synthese komplexer Ganglioside erfolgt im Golgi-Apparat (Schwarzmann and Sandhoff, 1990), wobei verschiedene Sialyltransferasen die Anbindung der Sialinsäuren katalysieren (van Echten and Sandhoff, 1993). Zusätzlich ist z.B. bei Gangliosiden der Neolactoserie eine Fucosylierung durch Fucosyltransferasen möglich. Dabei ist die Fucosyltransferase VII - eine von fünf bekannten α 1-3Fucosyltransferasen – verantwortlich für die Generierung von E-Selektin bindenden Kohlenhydratepitopen (vgl. Tabelle 1.3) wie die sLe^x-Struktur (Lowe *et al.*, 1990; Chandrasekaran *et al.*, 1996; Zöllner and Vestweber, 1996; Stroud and Holmes, 1997; Handa *et al.*, 1998; Weninger *et al.*, 2000). Die Fucosyltransferase IV ist ebenfalls eine α 1-3Fucosyltransferase und führt die Synthese von Le^x- (CD15) und VIM2- (CD65w) Epitopen durch (Wagers *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2000).

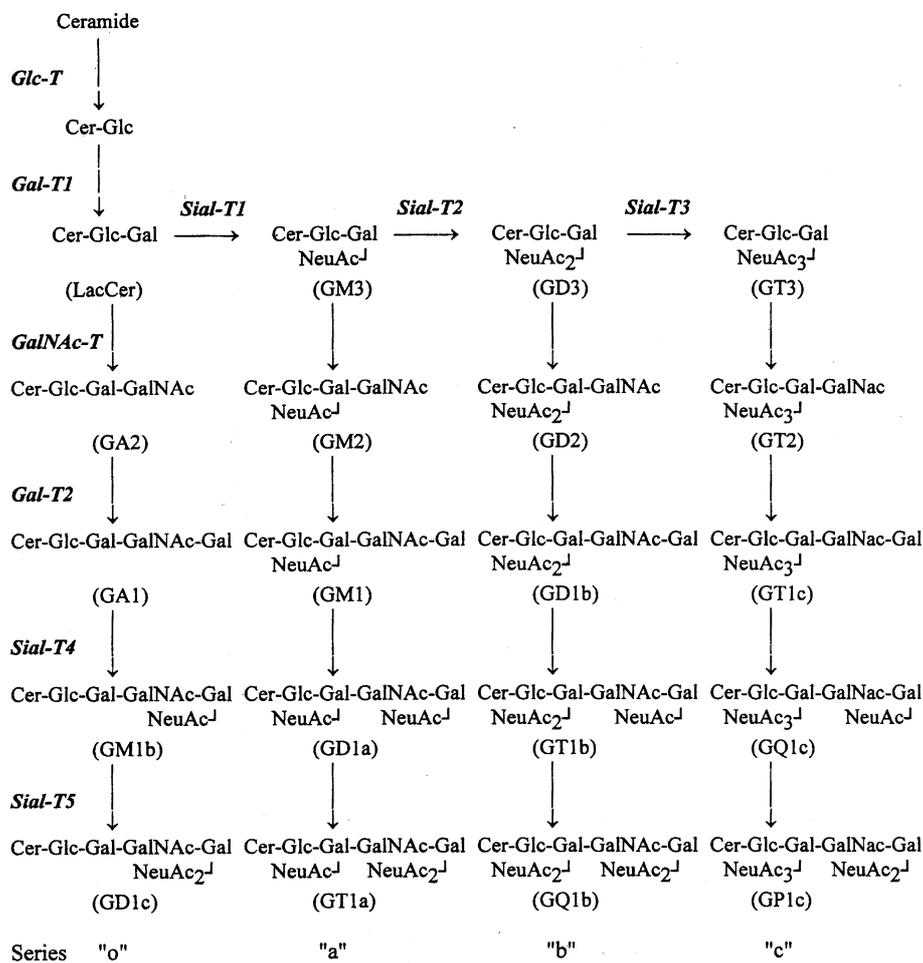


Abbildung 1.11: Schema der Biosynthesewege einiger Ganglioside der Ganglioserie (Maccioni *et al.*, 1999).

Die Abfolge der Kohlenhydratkette wird von mehreren Faktoren wie z.B. der Spezifität und dem Expressionsniveau der Glykosyltransferasen, der Lokalisation und Organisation der Enzyme im ER, Golgi-Apparat und trans-Golgi-Netzwerk und anderen Faktoren wie z.B. dem intrazellulären pH-Wert beeinflusst (Lloyd and Furukawa, 1998).

1.7.2 Vorkommen und Bedeutung von GSL

GSL kommen bei Säugetierzellen ubiquitär als Membranbestandteile vor (Ledeen *et al.*, 1982), sind aber auch intrazelluläre Bestandteile der Membranen von Organellen oder Granula (Hakomori, 1990; Gillard *et al.*, 1993). Sie unterliegen einem ständigen Umsatz durch Anabolismus und Katabolismus (Sandhoff and Klein, 1994; Sandhoff and Kolter, 1998; Sandhoff *et al.*, 1998; Kolter *et al.*, 1999; Möbius *et al.*, 1999). Ist der Abbau durch Enzymdefekte gestört, kommt es zu Speicherkrankheiten wie z.B. Morbus Gaucher, Tay-Sachs oder der Jatzkewitz-Sandhoffschen Erkrankung (Schuette *et al.*, 1999).

In tierischem Gewebe kennzeichnen die GSL die Organzugehörigkeit und variieren je nach Spezies, Zustand und Alter des Gewebes. Speziell das Le^x-Antigen ist im 8-32 Zellstadium der embryonalen Frühentwicklung den GSL inhärent (Hakomori, 1986). Die topologische Präsentation der GSL auf der äußeren Hälfte der Plasmamembran ist bedeutsam für ihre Funktion bei Zell-Zell-Erkennungsprozessen. Sie wird allerdings von krankheitserregenden Bakterien wie z.B. *E. coli* und *V. cholerae* bzw. deren Toxine ausgenutzt, die die GSL als Rezeptoren verwenden. Ebenfalls folgenschwer ist die Präsentation von veränderten GSL-Strukturen bei entarteten Zellen. Diese Krebszellen synthetisieren besonders häufig Le^a-Epitope, die eine Wechselwirkung mit E-Selektin eingehen können und bei Invasion des vasculären Systems zu einer besonders raschen Metastasierung führen (Fukushima *et al.*, 1984; Narita *et al.*, 1996; Renkonen *et al.*, 1997; Taki *et al.*, 1997; Kannagi, 1997; Renkonen *et al.*, 1999; Tomlinson *et al.*, 2000; Kitayama *et al.*, 2000). Die eigentliche Funktion der meisten der ca. 400 bekannten GSL ist allerdings unbekannt (Ichikawa and Hirabayashi, 1998). Bisher sind dem Gangliosid G_{M3} inhibitorische Eigenschaften bezüglich der EGF- und bFGF- (engl.: bFGF = basic fibroblast growth factor; basischer Fibroblastenwachstumsfaktor) Rezeptoren zugeschrieben worden (Hakomori, 1993). Das Gangliosid G_{M1} verstärkt die NGF-induzierte (engl.: NGF = nerve growth factor; Nervenwachstumsfaktor) Aktivierung der Tyrosinkinase A. Ganglioside können somit durch Modulierung der Tyrosinkinaseaktivität in die Signaltransduktionskaskade eukaryotischer Zellen eingreifen (Yates and Rampersaud, 1998; Rampersaud *et al.*, 1999; Liu and Hebert, 1999) und auch immunmodulatorische Wirkung ausüben (Marcus, 1984).

Die Bedeutung der potentiellen Gangliosidbeteiligung an der Ausbildung von Kohlenhydrat-E-Selektin-Wechselwirkungen im Falle einer Entzündung *in vivo* ist noch ungeklärt. Zwar konnte bereits eine Bindung von HL-60-Gangliosiden an E-Selektin *in vitro* nachgewiesen werden; diese beruhte jedoch auf Experimenten, bei denen die GSL in Polystyrolkavitäten von Mikrotiterplatten oder auf Polystyrolbeads immobilisiert wurden, worauf E-Selektin-transfizierte CHO Zellen adhärten (Stroud *et al.*, 1996 b; Handa *et al.*, 1997). Ebenfalls wurde eine Interaktion von E-Selektin-transfizierten CHO-Zellen mit chemisch synthetisierten sLe^x-tragenden Neoglykolipiden nach Adsorption der Glykolipide an Polystyrol (Alon *et al.*, 1995) oder an silanisierten Glasobjektträgern (Vogel *et al.* 1998; Gege *et al.*, 2000) nachgewiesen. Diese Experimente spiegeln die *in vivo*-Verhältnisse, bei denen

die GSL-tragenden Neutrophilen über statische E-Selektin-exprimierende Endothelzellen rollen, nur ungenügend wieder.

In dieser Arbeit wurde eine andere Strategie verfolgt, bei der E-Selektin exprimierende CHO-Zellen oder humane Endothelzellen kompetitiv mit humanen Granulocytgangliosiden und HL-60 Zellen inkubiert wurden. Die exogene Zugabe von freien Gangliosiden, die im wässrigen Milieu als Monomere und/oder Micellen vorliegen, führt bei Monolayern zu einer zeit- und temperaturabhängigen Adsorption eines Teils der Ganglioside an die Zellmembran (Saqr *et al.*, 1993).

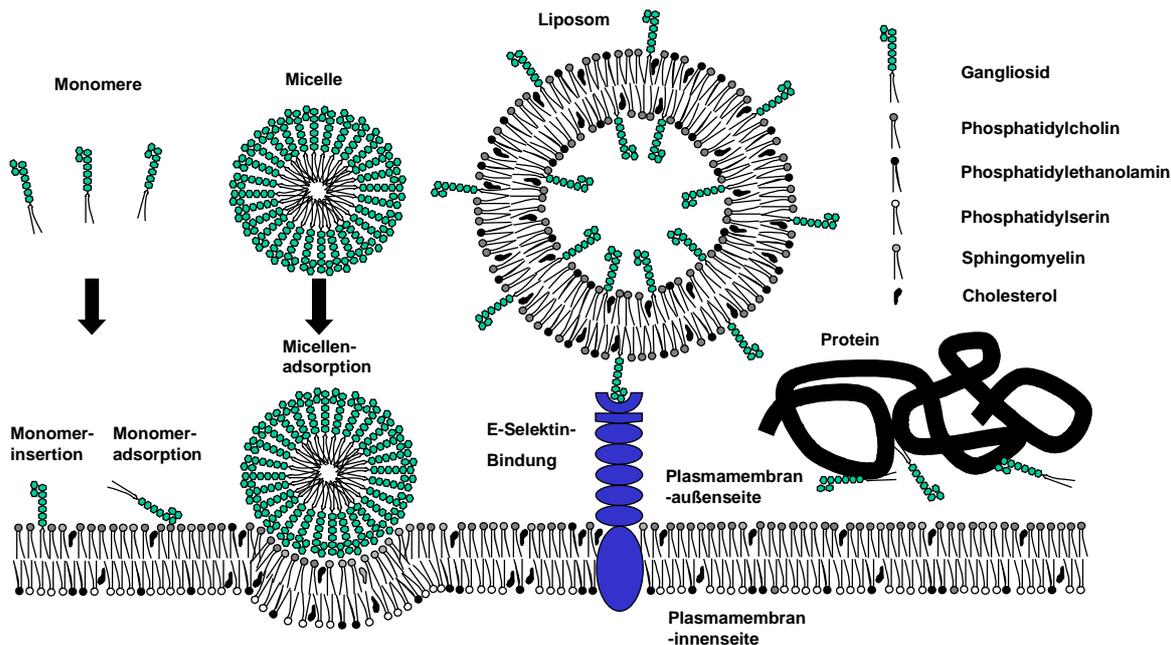


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der Gangliosidadsorption, -insertion und -bindung einer intakten E-Selektin-exprimierenden Zelle bei exogener Zugabe von Gangliosiden. In dieser Arbeit wurden drei grundlegende Darreichungsformen von Gangliosiden angewendet: 1. Die Darreichung in freier Form als Monomere und Micellen, 2. die Darreichung von Liposomen-inserierten Gangliosiden und 3. die Darreichung von Protein- und Lipoprotein-adsorbierten Gangliosiden. Prinzipiell werden die angebotenen Ganglioside entweder an Rezeptoren wie das E-Selektin gebunden, auf der extrazellulären Membranseite adsorbiert oder in die Zellmembran inseriert.

Bei einstündiger Inkubation adsorbieren bereits nach 5 Minuten 30% der Menge an Gangliosiden bezüglich des absoluten Maximalwertes. Mit sinkender Temperatur wird auch die Menge der angelagerten Ganglioside geringer. Bei 2-4°C sind es 30-60% des Vergleichswertes bei 37°C. Es sind drei Arten der Adsorption unterscheidbar: die Serum-stabile Adsorption, die Trypsin-stabile Adsorption und die Serum- und Trypsin-stabile Adsorption. Bei Inkubationszeiten der Zellen unter einer Stunde werden über 90% der adsorbierten Ganglioside nach anschließender Inkubation mit 10% (v/v) FCS (engl.: fetal calf serum; fötales Kälberserum) abgelöst. Vorherige Inkubation eukaryotischer Zellen mit Trypsin senkt die GSL-Adsorption um 75% (Radsak *et al.*, 1982). Bei längeren Inkubationszeiten von 1-96 Stunden binden 10-35% der GSL serumstabil, 10-40% adsorbieren Trypsin-stabil

und 5-25% verbleiben nach FCS- und Trypsin-Inkubation an den Zellen. Von dem serumstabilen Anteil werden 25-50% durch Trypsin abgelöst (Saqr *et al.*, 1993). Der überwiegende Großteil der Ganglioside adsorbiert demnach an Membranproteine und die Plasmamembran. Der verbleibende geringe Restanteil inseriert wahrscheinlich in die Membran.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die Ganglioside in freier Form als Monomere und/oder Micellen, inseriert in Liposomen und gebunden an BSA (engl.: bovine serum albumin; Rinderserumalbumin) bzw. HDL (engl.: high density lipoprotein; Lipoprotein hoher Dichte) den Endothelzellen zugegeben.

Die Inkubationsdauer betrug maximal 20 Minuten, um den in die Plasmamembran inserierenden GSL-Anteil relativ zum absolut bindenden Teil deutlich unter 10% zu halten. Dabei wurde ein Vergleich der Effekte bezüglich der Zell-Zell-Adhäsion zwischen den drei Inkubationsformen durchgeführt. Die Liposomen sollten eine Zellmembran nachbilden und die Ausbildung von „rafts“, die für die inflammatorische zelluläre Wechselwirkung von Bedeutung sein könnten, ermöglichen. Der Einfluß der beiden Blutproteine BSA und HDL für eine eventuelle Rolle als Trägerprotein wurde ebenfalls untersucht (siehe Abbildung 1.12).

1.8 Glykoproteine

Als nativer Ligand des P-Selektins wurde das Glykoprotein PSGL-1 auf humanen Neutrophilen identifiziert. Für das E-Selektin konnte ESL-1 als nativer Ligand auf murinen Neutrophilen erkannt werden, aber bisher wurde noch kein Glykoprotein als nativer Ligand auf humanen Neutrophilen gefunden. In dieser Arbeit wurde daher auch der Einfluß von Glykoproteinen auf die Zell-Zell-Adhäsion von HL-60 Zellen auf E-Selektin-exprimierenden Zellen untersucht.

1.8.1 Biosynthese von Proteinglykanen

Die Modifikation der Proteine erfolgt während und nach ribosomaler Synthese im ER. Dort bilden sich Disulfidbrücken aus und die Proteine werden N- bzw. später O-glykosidisch glykosyliert.

N-Glykosylierungen bedürfen der Aminosäure-Konsensussequenz Asn-X-Ser(Thr). An das Asparagin wird fakultativ *en bloc* ein Core-Oligosaccharid aus 14 Zuckerresten übertragen, dessen pentamere innere Struktur immer aus drei Mannose und zwei N-Acetylglucosaminresten besteht. Das Oligosaccharid wird von dem Trägermolekül Dolicholphosphat übertragen. Das Dolicholphosphat ist ein sehr langes Transmembran-Lipid, das etwa 20 Isopropeneinheiten enthält. Der Aufbau des Core-Oligosaccharids wird durch spezifische Transferasen katalysiert, die aktivierte Zucker übertragen. Noch im ER werden dann in einem Trimmprozeß drei Glucosemoleküle und ein Mannoserest durch Glykosidasen abgespalten. Die weitere Modifizierung erfolgt dann im Golgi-Komplex durch Glyko-

sidasen, Glykosyltransferasen und Sialyltransferasen (Kemminer, 2001). Sie wird beeinflusst durch die Nukleotidzuckerkonzentrationen, die Transportgeschwindigkeiten der Glykoproteine und die Konzentration und Lokalisation der Glykosyltransferasen im ER und Golgi-Komplex.

O-Glykosylierungen von Glykanen basieren auf der Grundstruktur Ser(Thr)-N-Acetylgalaktosamin. Die Addition von GalNAc an das Serin bzw. Threonin wird im cis-Golgi, also erst relativ spät durchgeführt. Anschließend folgt eine weitere Verlängerung der Kohlenhydratkette durch schrittweise Reaktionen von vorwiegend Galaktosyl- und Fucosyl-Transferasen sowie Sialyltransferasen. O-Glykoside sind weniger komplex aufgebaut als N-Glykane. Proteine mit einem großen Anteil an O-Glykosylierungen werden als Mucine bezeichnet. Ihre Form entspricht idealisiert einer „Flaschenbürsten“-struktur.

Die Glykosylierung eines Proteins ist nicht auf reine N- oder O-Glykosylierung beschränkt. Notwendig ist das jeweilige Vorhandensein einer Aminosäurekonsensussequenz, wobei die Wahrscheinlichkeit der N-Glykosylierung mit zunehmender Polypeptidkettenlänge aufgrund von sterischer Behinderungen abnimmt.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die initiale Wechselwirkung bzw. Adhäsion zwischen Endothel und Leukocyten ist, wie in Kapitel 1.5 bereits dargelegt, abhängig von einer Interaktion zwischen Selektinen und ihren Liganden. Zwar wurde das sLe^x-Tetrasaccharid als ein Ligand des E-Selektins identifiziert, aber dieses Epitop alleine hat nur eine geringe Affinität zum Selektin. Erst die Konjugation mit Protein- oder Lipidcarriern - und eine damit verbundene multivalente Präsentation - ermöglicht eine starke Interaktion von Rezeptor und Ligand (Crocker and Feizi, 1996). Die Ausbildung solcher funktionellen Triaden aus Rezeptor (E-Selektin), Ligand (sLe^x-Epitop) und Carrier des Liganden (Protein oder Lipid) ist demnach für das Binden von Leukocyten an inflammatorisch aktivierte Endothelzellen notwendig.

Der physiologische Carrier des sLe^x-Epitops in der Membranoberfläche von Leukocyten, der für die Bindung an E-Selektin verantwortlich ist, ist allerdings unbekannt. Möglich wäre eine Ligand-Sphingolipid-Konjugation als GSL. Bisher wurden lediglich Experimente mit an Polystyrol bzw. an silanisierte Glasoberflächen adsorbierten E-Selektin-bindenden GSL durchgeführt (siehe Kapitel 1.7.2). Die in diesen Experimenten eingesetzten Konzentrationen können aber deutlich höher als die *in vivo* vorhandenen sein. Die Ausbildung von „rafts“ (siehe Kapitel 1.6) aus Liganden-Carrier-Konjugaten in der Zellmembran könnte wiederum zu einer physiologisch relevanten E-Selektin-bindenden Konzentration führen. Die Präsentation der an Polystyrol adsorbierten GSL kann die native Präsentation der GSL in der Zellmembran nur ungenügend wiedergeben. Daher ist dieses Modell in der Aussagekraft über die Bindungsrelevanz bei Zell-Zell-Adhäsionsinteraktionen eingeschränkt. Ein zellulärer Adhäsionstest mit Leukocyten und E-Selektin-exprimierenden Zellen ließe dagegen eine realitätsnähere Untersuchung der beteiligten Bindungspartner zu.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der funktionellen Bedeutung und des Einflusses von humanen Granulocytengangliosiden auf die E-Selektin vermittelte Wechselwirkung der Zell-Zell-Adhäsion der promyelocytischen HL-60 Zelllinie und E-Selektin exprimierenden HUVEC und CHO-E Zellen.

1.9.1 Strategien zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens

Das Adhäsionsverhalten ist beschreibbar durch eine Quantifizierung der unter standardisierten Bedingungen adhärenen promyelocytischen HL-60 Zellen auf einem „Zellrasen“ (engl.: cell layer) von E-Selektin exprimierenden Zellen. Dazu mußte ein Testsystem entwickelt werden, das eine Unterscheidung von adhärenen und nicht-adhärenen Zellen zuließ.

Die erste Strategie basierte auf der Untersuchung der Zell-Zell-Adhäsion in einem statischen System (Mikrotiterplattenassay). Die jeweils 96 Kavitäten (engl.: wells) einer Platte ließen Verdünnungsreihen von potentiellen Liganden zu, die kompetitiv zu den membranständigen nativen Liganden und damit als Inhibitoren der Adhäsion eingesetzt wurden. Nicht adhärenen promyelocytische Zellen wurden mit einem Mikrotiterplattenspülgerät unter standardisierten Bedingungen ausgewaschen und die verbleibenden Zellen mit einem Umkehrmikroskop und einer, in Kooperation mit der Firma INNOVATIS (Bielefeld) entwickelten Software computergestützt ausgezählt. Der Vorteil dieser „statischen“ Adhäsionsmethode ist die große Anzahl der Ansätze, die mit einer Platte in kurzer Zeit vermessen werden. Sie läßt jedoch nicht die Erfassung der initialen Schritte der Adhäsion, dem Tethering und Rolling zu.

Die zweite Strategie war daher, die Adhäsion unter Fließbedingungen in einem dynamischen System (Fließkammer) zu charakterisieren und die Rollgeschwindigkeiten, sowie die fest adhärenen promyelocytischen Zellen zu quantifizieren. Dazu wurden eine Fließkammer und ein temperierbarer sowie pH-Wert regulierbarer Minibioreaktor entwickelt, die beide mit einem über eine Pumpe führenden Schlauchkreislauf verbunden waren. Dabei simulierte ein Layer von E-Selektin exprimierenden Zellen das Gefäßendothel in der mikroskopierbaren Fließkammer dieses dynamischen Systems.

Zur Inhibition der Adhäsion wurden die jeweiligen Zelltypen mit ihren potentiellen Liganden inkubiert. Den, das Endothel nachahmenden, E-Selektin-exprimierenden Zellen wurden isolierte humane Granulocytganglioside zugegeben, die leukocytären Zellen dagegen mit Antikörpern gegen Zelloberflächenantigene bzw. löslichem E-Selektin beladen.

Die Inhibitoren der Zell-Zell-Adhäsion mußten zuvor in ausreichender Menge produziert werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Proteine, die gegen sLe^x-Determinanten gerichtete monoklonale IgM-Antikörper CSLEX-1 und ein chimäres Maus-E-Selektin-IgG, das zur besseren Aufreinigung bzw. zum Bindungsnachweis mit einem Sekundärantikörper humane konstante Elemente der schweren Immunglobulinketten trägt, zellkulturtechnisch nach Optimierung der Produktionsraten produziert.

2 Material und Methoden

2.1 Die verwendeten Zelllinien

Von sämtlichen Zelllinien wurden Stamm- und Arbeitszellbänke angelegt und im Cryotank in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Erreichen einer Passagenzahl von > 30 wurde ein neues Aliquot aufgetaut und kultiviert, um jeweils die genetische Integrität der Zellen zu gewährleisten und möglichst identische Ausgangsbedingungen für die Zell-Adhäsionsexperimente zu garantieren. Die in dieser Arbeit zur Durchführung von Adhäsions- und Inhibitionsstudien, sowie zur CSLEX-Antikörper- und E-Selektin-IgG-Proteinproduktion verwendeten Zelllinien sind im folgenden aufgeführt.

2.1.1 HL-60

Die HL-60 Zelllinie (ATCC CCL-240, American Type Culture Collection) ist eine promyelocytische Linie, die aus dem peripheren Blut einer 36jährigen Frau isoliert wurde (Collins *et al.*, 1977). Im Phänotyp sind die Zellen heterogen. 90-95% besitzen eine myeloblastische bzw. promyelocytische Morphologie mit einem großen und mehreren kleinen Nuclei im Zellkern und basophilem Cytoplasma mit azurophiler Granula (Birnie, 1988). Die HL-60 Zellen synthetisieren Myeloperoxidase und saure Phosphatase und besitzen Rezeptoren für Insulin, Transferrin, Complement sowie für das F_c -Fragment (engl.: fraction crystallizing, = konstanter Teil der schweren Ketten) von Immunglobulinen (Tsiftoglou and Robinson, 1985; Collins, 1987). Sie wurden im Adhäsionstest statt humaner Granulozyten eingesetzt. Der Vorteil dieser Linie gegenüber den primären ausdifferenzierten Neutrophilen ist die unbegrenzte Teilungsfähigkeit und damit die ständige Verfügbarkeit großer Zellmengen gleicher Qualität.

2.1.2 K-562

Die K-562 Linie (ATCC CCL-243) wurde aus der Pleuralflüssigkeit einer 53jährigen Patientin mit chronisch myeloider Leukämie isoliert und von Lozzio als Zelllinie etabliert (Lozzio and Lozzio, 1975; Lozzio and Lozzio, 1979). Die Analyse der Oberflächenantigene ergab eine Einordnung als erythroleukämische Zelllinie (Andersson *et al.*, 1979). K-562 Blastozoiden sind multipotente hämatopoetische maligne Zellen, die spontan zu Progenitoren der erythroiden, granulocytären und monocytären Linie differenzieren können (Lozzio *et al.*, 1981). Als für diese Arbeit wesentlicher Unterschied zu der HL-60 Zelllinie ist die Verteilung der Antigene VIM2 (CDw65; 80% positive Zellen), VIMD5 (CD15, Lewis^x; 33% positive Zellen) und CSLEX1 (CD15s, sialyl Lewis^x; 2% positive Zellen) (Schlossman, 1995). Der Anteil der für diese drei Antigene positiven HL-60 Zellen ist jeweils

≥ 97%. Somit wurde die K-562 Zelllinie als Negativkontrolle bezüglich der Expression von VIMD5 und CSLEX1 Antigenen eingesetzt.

2.1.3 CHO-K1

Die CHO-K1 Zelllinie (ATCC CCL-61) ist ein Subklon der aus einer Eierstockbiopsie eines Chinesischen Hamsters isolierten somatischen CHO-Linie (engl.: Chinese Hamster Ovary), die ursprünglich 1957 von Puck etabliert wurde (Puck, 1958). Diese adhärennten Prolin-bedürftigen Zellen (Kao and Puck, 1967), die etwa ab Passage 400 von der ATCC geliefert werden, dienten als Negativkontrolle im Vergleich zu E-Selektin-exprimierenden Layerzellen da ihnen kein E-Selektin-Gen transfiziert wurde.

2.1.4 CHO-E

Die CHO-E Zelllinie wurde unserem Lehrstuhl freundlicherweise von PD Dr. U. Rothe (Martin-Luther-Universität, Halle) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie exprimiert nach Klonierung und Transfektion des murinen E-Selektin-Gens (Weller *et al.*, 1991) ein transmembranes E-Selektin, dem eine 73%ige Aminosäurehomologie zu seinem humanen Pendant inhärent ist (Becker-André *et al.*, 1992). Die adhärennt-wachsenden Zellen dienten als Modellzelllinie für die E-Selektin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsionsstudien (Vogel *et al.*, 1998).

2.1.5 CHO-P

Die CHO-P Zelllinie wurde unserem Lehrstuhl von Prof. Dr. D. Vestweber (ZMBE, Münster) überlassen. Sie exprimiert ein murines P-Selektin, dessen Aminosäuresequenz zu 73% identisch mit der Aminosäuresequenz des humanen P-Selektins ist (Weller *et al.*, 1991). Dieses Protein ist membranverankert wobei die NH₂-terminale Lektin-Domäne, die dem Epidermis-Wachstumsfaktor analogen Region und die repetitiven Complement-bindenden-Konsensus-Elementen auf der Zelloberfläche exponiert werden. Die Zelllinie wurde zur Ermittlung der P-Selektin-Beteiligung auf die Zell-Zell-Adhäsion verwendet.

2.1.6 HUVEC

Primäre Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen wurden von Frau Dr. Duvar übernommen, die in Anlehnung an die von Gimbrone *et al.* (1974) beschriebenen und von Friedl *et al.* (1989) modifizierten Methode die Zellen enzymatisch mittels einer 0,05%igen Trypsinlösung (BOEHRINGER MANNHEIM) isolierte (Duvar, 1996; Duvar *et al.*, 1996 b; Müthing *et al.*, 1996 b). Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen expandiert und eine Zellbank der Passagen 5 und 15 angelegt, um für die Experimente jeweils identisches

Ausgangsmaterial verwenden zu können. Die E-Selektinexpression wurde durch 4stündige Inkubation mit 50 ng/mL IL-1 β (TEBU, Frankfurt a M.) bzw. 50 ng/mL TNF- α (TEBU) und die P-Selektinexposition durch 10minütige Induktion mit 0,5 U/mL Thrombin (SIGMA, Deisenhofen) bzw. 10⁻⁴ M Histamin (SIGMA) induziert.

2.1.7 CSLEX1

Die Hybridoma-Zelllinie CSLEX1 (ATCC HB-8580), im folgenden CSLEX benannt, sezerniert einen monoklonalen Maus IgM Antikörper gegen das sLe^x-Antigenepitop. Sie wurde durch Fusion von P3X63Ag8.653 Myelomzellen mit Milzzellen einer BALB/c Maus hergestellt, die zuvor mit Membranproteinen eines Magenadenokarzinoms immunisiert wurde. Die CSLEX Zelllinie wurde als Suspensionszelle zur Produktion des CSLEX-Antiköpers (siehe Abbildung 2.1) an serumfreie Bedingungen adaptiert und im 1 L-SuperSpinner, sowie im 5 L Bioreaktor kultiviert (siehe Kapitel 3.1). Die für Inhibitionsstudien vorgesehenen Antikörper wurden nach Isolierung und Aufkonzentration für eine gleichbleibende Qualität aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

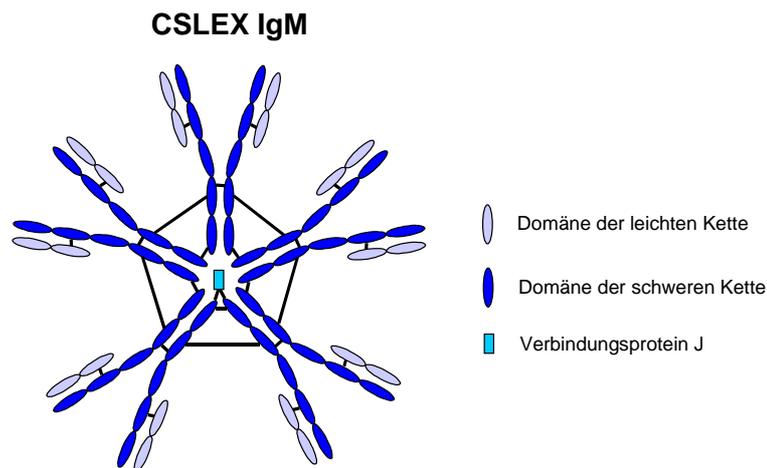


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des CSLEX-Immunglobulins. Das pentamere Molekül wird über Disulfidbrücken und ein Verbindungsprotein J (engl.: joining protein) in seiner Quartärstruktur stabilisiert.

2.1.8 CHO-IE

Die CHO-IE Zelllinie sezerniert ein lösliches chimäres Protein (Hahne *et al.*, 1993), das sich aus der Lektindomäne, der EGF-Sequenz und den ersten beiden Complementbindenden Domänen des murinen E-Selektins, sowie der Hinge-Region und den CH2- und CH3-Domänen des humanen IgG₁ zusammensetzt (siehe Abbildung 2.2). Die CHO-IE Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. D. Vestweber übersandt. Sie wurde an serumfreie Bedingungen adaptiert und als Suspensionsphäroidkulturen im 1 L-SuperSpinner, in 2-, 5- und 100 L-Bioreaktoren, sowie im 10 L-Spinner kultiviert (siehe

Kapitel 3.2). Das chimäre Protein wurde nach Aufreinigung des Überstandes aliquotiert, bei -80°C eingefroren und für Inhibitionsstudien der Zell-Zell-Adhäsionstests eingesetzt.

E-Selektin-IgG Fusionsprotein

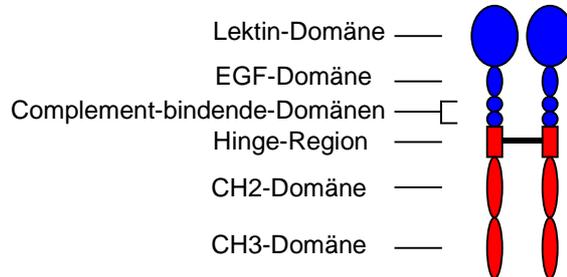


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des E-Selektin-IgG Fusionsproteins. Die murin-identischen Domänen sind blau und die human-identischen Domänen rot dargestellt.

2.2 Cryolagerung der Zellen

Die Cryokonservierung ist eine bereits etablierte Methode zur Langzeitlagerung von Zellen. Dabei wird flüssiger Stickstoff mit einer Temperatur von -196°C zur Kühlung verwendet. Zum Schutz vor Kontaminationen werden die zellhaltigen Cryoröhrchen nicht in die Flüssigphase, sondern in die Dampfphase mit einer Temperatur von -187°C (gemessen mit elektronischem Thermometer BECKMANN + EGLE) eingebracht. Bei dieser Temperatur sind die Zellen mehrere Monate bis Jahre lagerbar (Halle, 1975).

Die größte Gefahr für die Zellen ist die Bildung von Zellmembran-zerstörenden intrazellulären Kristallen während des Einfriervorgangs. Diese wird beeinflusst durch die Einfriergeschwindigkeit und das verwendete Cryoprotektivum. Daher wird versucht, die Temperaturerniedrigung mit einer langsamen Einfriergeschwindigkeit von $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durchzuführen, die sich zusammen mit gefrierpunktniedrigenden Substanzen wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Glycerin mit einem Zusatz an fötalem Kälberserum als optimal herausgestellt hat. Durch diese Methode entstehen nur sehr kleine Kristalle, die die Membranen nicht mehr schädigen können. Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 geben die Arbeitsschritte zum Einfrieren und Auftauen von Zellen wieder.

Tabelle 2.1: Arbeitsschritte zum Einfrieren von Zellen.

| | | |
|----|-----------------------------|---|
| 1. | Einfriermedium herstellen | DMEM/F12 mit 10% DMSO und 500 mg/L BSA bzw. 5% FCS auf 4°C kühlen |
| 2. | Zellen abzentrifugieren | für 5 Minuten bei 110·g |
| 3. | Zellsediment resuspendieren | mit Einfriermedium, Zellendkonzentration 1,0·10 ⁷ - 2,5·10 ⁸ Zellen/mL |
| 4. | Zellsuspension portionieren | zu 1 bzw. 4,5 ml Aliquots in Cryoröhrchen (NUNC) |
| 5. | Einfrieren | für einen Tag bei -80°C in einem Styroporbehälter |
| 6. | Langzeitlagerung | in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff im Cryotank (Chronos 350, MESSER GRIESHEIM) |

Tabelle 2.2: Arbeitsschritte zum Auftauen von Zellen.

| | | |
|----|------------------|---|
| 1. | Medium vorwärmen | 30 mL supplementiertes DMEM/F12 in 50 mL Zentrifugenröhrchen (NUNC) füllen und auf 37°C erwärmen (Wasserbad) |
| 2. | Zellen auftauen | Cryoröhrchen aus dem Stickstofftank direkt mit dem Boden in ein Wasserbad (37°C) halten; schwenken bis zum Auftaupunkt |
| 3. | DMSO entfernen | Zellen aus dem Cryoröhrchen in vorbereitetes Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Medium überführen und bei 110·g für 5 min zentrifugieren; Überstand verwerfen |
| 4. | Zellen einsäen | Zellsediment in warmem Kulturmedium resuspendieren und mit einer Zelldichte von 0,8-4,0·10 ⁵ Zellen/mL in einer temperierten Kulturflasche einsäen |

Die langsame Einfriereschwindigkeit wird durch einen Styropormantel von etwa zwei Zentimetern Wandstärke und der Verwendung einer -80°C Tiefkühltruhe erreicht. Nach einem Tag können die Cryoröhrchen dem Styroporkasten entnommen und in die Dampfphase des flüssigen Stickstoffes überführt werden (vgl. Lindl und Bauer, 1994), wobei dieser Temperatursprung nur noch geringen Einfluß auf das Kristallwachstum hat.

Die Temperatur in der -80°C Tiefkühltruhe reicht zwar schon für eine Lagerung der Zellen von mehreren Monaten aus; um aber den Stoffwechsel nahezu vollständig zu unterbinden, erfolgt die Überführung in die Dampfphase des flüssigen Stickstoffs (Bowler and Fuller, 1987). Die Dauer der Lagerungsfähigkeit wird bei diesen Temperaturen nur noch durch die zellschädigende Wirkung der Hintergrundionisationsstrahlung begrenzt (Ashwood-Smith and Friedman, 1979).

2.3 Kulturmedien

Alle Zelllinien wurden auf das gleiche Basalmedium adaptiert, um identische Ausgangsbedingungen für die Adhäsionsversuche zu garantieren. Das verwendete Medium war eine 1:1 Mischung der beiden Basalmedien DMEM und Ham's F12 (GIBCO, USA). Das Medium für die Anzucht in Kulturflaschen und Spinnerflaschen sowie für sämtliche Kultivierungen in den Bioreaktoren war NaHCO_3 gepuffert. Durch eine CO_2 -Begasung wurde über das Bicarbonatgleichgewicht der gewünschte pH-Wert eingestellt. Alle Medienchargen wurden mit Reinstwasser aus Milli-Q Anlagen (MILLIPORE, Bedford, USA) ausschließlich in Glasgefäßen angesetzt, durch Mehrwegfilter (SARTORIUS, Göttingen) mit einer Porenweite von $0,2 \mu\text{m}$ sterilfiltriert und bis zur Verwendung im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Für die Routinekultivierung der im Adhäsionstest eingesetzten Zellen (HL-60, K-562, CHO-E, CHO-P und HUVEC) wurde dem Basalmedium fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum, FCS) zugesetzt. Die zur Antikörper- bzw. E-Selektin-IgG-Proteinproduktion verwendeten Zelllinien CSLEX und CHO-IE wurden innerhalb von 7 bzw. 10 Wochen an serumfreie Kultivierungsbedingungen adaptiert. Statt FCS wurde dem Basalmedium notwendige Supplemente zugegeben (siehe Tabelle 2.3), deren Konzentrationen nachfolgend vergleichend mit den Normkonzentrationen im humanen Blutplasma dargestellt sind:

Tabelle 2.3: Vergleich der Supplementkonzentrationen des Kulturmediums mit den Normkonzentrationen (nach Hinghofer-Szalkay, 1994) im humanen Blutplasma.

| Supplement | Kulturmediumsupplementkonzentrationen | Normkonzentrationen in humanem Blutplasma |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| Glucose | 10 mM | 4 - 5,5 mM |
| Rinderinsulin | 5 mg/L | 0,5 - 2 ^a $\mu\text{g/L}$ |
| Rinderserumalbumin | 500 mg/L | 37 - 45 ^b g/L |
| Humantransferrin, eisengesättigt | 5 mg/L | 2 - 4 g/L |

(^a: Humaninsulin, ^b: Humanalbumin)

Glucose dient den Zellen als Kohlenstoffquelle für den Energiestoffwechsel der Glykolyse. Das aus zwei Untereinheiten (α und β -Kette) bestehende $5,7 \text{ kDa}$ große Rinderinsulin (engl.: bovine insulin, BI) stimuliert die Glucoseaufnahme sowie die Protein- und Fettsynthese (Alberts et al., 1990). Humantransferrin (HT) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 76 kDa und dient dem Eisentransport in die Zelle (Mather and Sato, 1979), indem das im extrazellulären Milieu mit zwei Fe^{3+} -Ionen beladene Holo-Transferrin über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen wird (Thorstensen and Romslo, 1990). Anschließend dissoziieren die Eisenionen im sauren Milieu der Endosomen ab und das eisenfreie Apo-Transferrin wird über Exocytose wieder aus der Zelle geschleust (Dautry-Varsat and Lodisch, 1984; Karin and Mintz, 1981). Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin, BSA) hat ein Molekulargewicht von 67 kDa und dient als Transportprotein für Fettsäuren, Peptide und Steroidhormone. Aufgrund seiner Nettoladung hat es eine Affinität für Wasser, Kationen und andere geladene Substanzen.

Den Nährstoffbedürfnissen der unterschiedlichen Zelllinien wurde durch die in Tabelle 2.4 dargestellten individuellen Supplementierungen Rechnung getragen.

Tabelle 2.4: Supplementierung der Basalmedien pro L Kulturmedium in Abhängigkeit von der jeweils kultivierten Zelllinie.

| Supplement | CSLEX | CHO-IE | HL-60 | K-562 | CHO-K1 | CHO-E | CHO-P | HUVEC |
|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Na-Pyruvat | 2 mM |
| NaHCO ₃ | 28,8 mM |
| Glucose | 10 mM | 15 mM | 10 mM |
| Ethanolamin | 150 µM | 150 µM | - | - | - | - | - | - |
| Glutamin | 4 mM | 4 mM | - | - | - | - | - | - |
| Tryptophan | 150 µM | 50 µM | - | - | - | - | - | - |
| Aspartat | - | - | 200 µM |
| Asparagin | - | 50 µM | 200 µM | 200 µM | 200 µM | 200 µM | 200 µM | 200 µM |
| Methionin | 70 µM | 30 µM | - | - | - | - | - | - |
| Serin | - | 30 µM | - | - | - | - | - | - |
| Leucin | 200 µM | - | - | - | - | - | - | - |
| Isoleucin | 150 µM | - | - | - | - | - | - | - |
| Prolin | - | 170 µM |
| FCS (PAA) | - | - | 5% | 5% | 5% | 5% | 5% | 10% |
| H-bFGF (TEBU) | - | - | - | - | - | - | - | 1 µg |
| H-EGF (TEBU) | - | - | - | - | - | - | - | 10 µg |
| HSA (MILES) | - | - | - | - | - | - | - | 5 mg |
| Ascorbinsäure | - | - | - | - | - | - | - | 50 mg |
| Hydrocortison | - | - | - | - | - | - | - | 1 mg |
| BI (SIGMA) | 5 mg | 5 mg | - | - | - | - | - | - |
| BSA (SERVA) | 500 mg | 500 mg | - | - | - | - | - | - |
| HT (SEROLOG. PROTEINS) | 5 mg | 5 mg | - | - | - | - | - | 5 mg |

Primäre Zellen benötigen zur Proliferation *in vitro* außer der undefinierten Zahl und Konzentration an Substanzen im FCS noch zusätzliche Wachstumsfaktoren. Für die HUVEC-Kultivierung wurden daher dem Medium humaner basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (engl.: human basic fibroblast growth factor; H-bFGF) (TEBU), humaner epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: human epidermal growth factor; H-EGF) (TEBU) und Hydrocortison (SIGMA) zugegeben. Zum Schutz vor Radikalen und toxischen Substanzen wurden die Supplemente Ascorbinsäure (SIGMA) sowie Serumalbumin (HSA) (MILES, U.S.A.) eingesetzt.

2.4 Die Kultivierungssysteme

2.4.1 T-Flaschen

Die kleinste Einheit, in der die Zellen zur ständigen Proliferation kultiviert wurden, waren Gewebekulturflaschen (engl.: tissue culture flasks; T-Flaschen) aus klarem Polystyrol (25 cm², NUNC) mit der patentierten Zelladhäsionsoberfläche Nunclon™Δ. Für Routinepassagierungen wurden 75 cm² T-Flaschen verwendet. Mit einem Kulturvolumen von bis zu 30 mL dienten sie vornehmlich der Zellanzucht, als Sicherheitsreserve sowie als Inokulum für Multiwellplatten oder größere Kultivierungseinheiten (175 cm² T-Flaschen und Spinner). Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% zur Einstellung des pH-Wertes, wobei der Deckel um eine halbe Windung aufgedreht wurde, um einen Gasaustausch über die Medienoberfläche zu gewährleisten. Die optische Kontrolle der Zellzahlzunahme dieser statischen Suspensions- bzw. Adhäsionskulturen wurde durch mikroskopische Betrachtung durch ein Inversmikroskop (ZEISS, Axiovert 10) verfolgt. Zusätzlich wurde die Zellkonzentration bei Suspensionszellen mit der täglichen Probenahme und bei adhärenenten Zellen während der Passagierung mit der Trypanbau-Zählmethode bestimmt.

2.4.2 Die Spinner

Spinnerflaschen (Duran, SCHOTT) wurden zur permanenten Kultivierung von HL-60 Zellen eingesetzt. Sie sind im Gegensatz zu den Gewebekulturflaschen ein dynamisches Suspensionssystem. Die 500 mL Duran-Glasflaschen wurden mit einem Arbeitsvolumen von 100 bis 200 mL befüllt und im Brutschrank bei 37°C (5% CO₂, 95% Luft) auf einer „Variomag Biosystem 3B“ Drehfeldrührstation (H+P LABORTECHNIK, Oberschleißheim) mit Biomodul 40B Steuereinheit gerührt. Der mit einem inneren Magneten bestückte Glasrührer bewirkte dabei eine homogene Durchmischung bei 30 U/min. Der Gasaustausch erfolgte über die für eine halbe Umdrehung geöffneten Deckel der Seitenarme.

2.4.3 Die SuperSpinner®

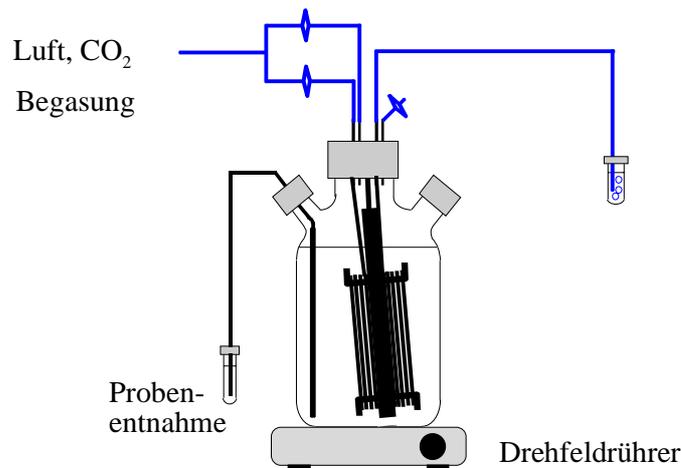


Abbildung 2.3: Schemazeichnung des SuperSpinners.

Die SuperSpinnerflasche (siehe Abbildung 2.3) aus Borosilikatglas (Duran, SCHOTT) ist ebenfalls ein dynamisches Suspensionssystem und beruht auf einer am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld durchgeführten Weiterentwicklung konventioneller Spinnerflaschen (Heidemann *et al.*, 1993). Die Submersbegasungseinheit ermöglicht höhere Zelldichten und eine höhere Gesamtzellzahl als in statischen Submerskultivierungen. Die blasenfreie Begasung erfolgte dabei durch eine Polypropylenhohlfaser (Accurel®, AKZO NOBEL), die in einer Länge von 3 Metern vor Gebrauch auf einen Taumelrührer aufgewickelt wurde (Lehmann *et al.*, 1987). Eine Gasmischstation stellte die Gasversorgung (95% Luft, 5% CO₂, 20 NL/h) sicher. Der Taumelrührer, der für eine homogene Durchmischung sorgte, besaß einen Magneten, der von einer Teflonhülle ummantelt war. Angetrieben wurde er durch einen stufenlos regelbaren Drehfeldrührer (Variomag, Biosystem 4B), dessen Geschwindigkeit auf 30 U/min eingestellt wurde. Durch dieses kombinierte Rühr-/Begasungssystem wurde der hohe Sauerstoffeintrag gewährleistet.

Die Kultivierung erfolgte in einem auf 37°C temperierten Klimaraum. Die Ernte und das Nachfüllen von frischem Medium im wiederholten satzweisen Betrieb wurde unter einer Reinraumwerkbank (lamin air, HERAEUS) durchgeführt. Der SuperSpinner diente sowohl zur Produktion von Antikörpern- und E-Selektin-IgG-Proteinen, als auch für die Bereitstellung einer ausreichenden Zellmenge zur Inokulierung größerer Kultivierungseinheiten.

2.4.4 Der 10 L-Spinner

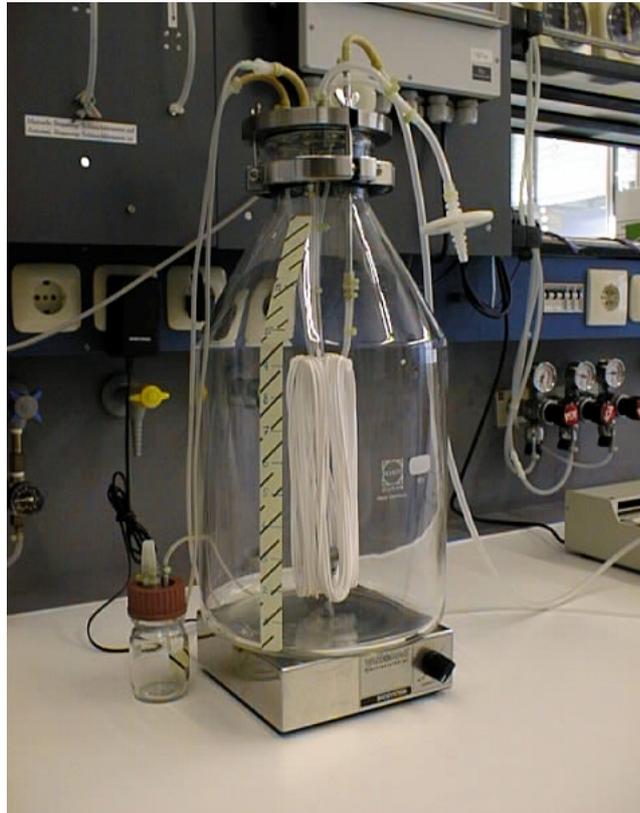


Abbildung 2.4: Der 10 L-Spinner.

Der 10 L-Spinner (siehe Abbildung 2.4) war eine Eigenkonstruktion und bestand aus einer 10 L-Duranglasflasche, einer mit Flügelmuttern fixierten Edelstahlscheibe mit Anschlüssen zur Begasung, Befüllung mit Frischmedium und der Probennahme sowie einem verlängerten Rührer mit 15 Metern Accurel®-Membran zur blasenfreien Begasung. Das Funktionsprinzip ist dem SuperSpinner gleich, jedoch wurde das Inokulum bzw. das Frischmedium über eine separate Flasche zugeführt, die über einen Silikonschlauch mit dem Spinner verbunden war. Dieses System wurde zur Produktion des E-Selektin-IgG-Proteins eingesetzt.

2.4.5 Der 5 L- und der 100 L-Bioreaktor

Der verwendete 5 L-Bioreaktor (Isotherm, KGW) war ein doppelwandiger Glasreaktor mit einem durch ein Heiz-/Kühlwasserbad temperierbaren Wassermantel. In den Fermenterdeckel wurden Elektroden zur pH- und pO_2 -Messung (INGOLD), und zusätzlich ein PT100-Temperaturmeßfühler eingebaut. Die Elektroden und der Fühler wurden an eine digitale Regelungseinheit der Firma B. BRAUN Biotech International (DCU, Biostat MD) angeschlossen, die die Meßsignale aufnahm und an das Meßaufnahmesystem MFCS (B. BRAUN Biotech International) weiterleitete. Der Vorteil dieses Systems gegenüber den

Spinnern besteht in der Regelung des pH-Wertes und des pO_2 -Partialdruckes in physiologischen Grenzen, wodurch relativ konstante Kulturbedingungen im Zeitraum des Produktionsprozeß gewährleistet werden. Die Regelung des pH- und pO_2 -Wertes erfolgte durch Veränderung des anteiligen Volumenstroms des Gasgemisches aus O_2 , N_2 , CO_2 und Luft, die von der Gasmischstation eingestellt wurde. Die Temperatur wurde über das zugeführte Wasser im Doppelmantel konstant auf $37^\circ C$ gehalten. Die Durchmischung der Zellsuspension gewährleistete ein Taumelrührer, auf den 10 m Begasungsmembran (Accurel[®], AKZO NOBEL) gewickelt waren. Der Glasreaktor stand auf einem Drehfeldrührer (Variomag, Biosystem 1) und wurde mit einer konstanten Geschwindigkeit von 22 U/min gerührt. Dieser Bioreaktor wurde zur Kultivierung von CSLEX- und CHO-IE Zellen eingesetzt.

Der 100 L Bioreaktor (B. BRAUN Biotech International) war aus Edelstahl gefertigt und komplett mit festen Anschlüssen verrohrt. Statt eines Taumelrührers wurde aufgrund des großen Volumens ein Edelstahlblattrührer für eine homogene Durchmischung verwendet. Die Begasung erfolgte mittels eines auf einen Edelstahlkorb gewickelten dünnwandigen Silikonschlauches, durch den das Gasgemisch geleitet wurde. Dieser Bioreaktor wurde zur Produktion der E-Selektin-IgG-Chimäre eingesetzt.

2.4.6 Der 2 L-Perfusionsbioreaktor

Der 2 L-Bioreaktor (B. BRAUN Biotech International) wurde im Gegensatz zu den oben genannten Bioreaktoren in einer Perfusionsprozeßführung betrieben. Der Reaktor war mit einem Edelstahlblattrührer ausgerüstet, der über einen aufgesetzten Elektromotor mit einer Geschwindigkeit von 120 U/min angetrieben wurde. Ein auf der Rührwelle montierter mehrlagiger Edelstahlsfilter sorgte für die Rückhaltung der Zellen im Perfusionsbetrieb. Eine kontinuierlich arbeitende Pumpe (WM501U, WATSON MARLOW) sorgte für den Zulauf von gekühltem Frischmedium, und eine diskontinuierliche, über einen Füllstandsensorgesteuerte Pumpe (WM501U), für den Ablauf. Das Ablaufintervall wurde durch eine Zeitschaltuhr (Eigenbau der Universität Bielefeld) auf eine Minute begrenzt. Die Kontrolle der Durchflußrate erfolgte mittels Waagen (Precisa 12000 D), die ständig das Gewicht der Zu- und Ablaufflaschen maßen. Die Begasung erfolgte über einen auf einen Edelstahlkorb gewickelten Silikonschlauch. Temperatur-, pO_2 - und pH-Wert der Kultur wurden mittels einer DCU geregelt. Abbildung 2.5 zeigt den Aufbau der Perfusionsanlage.

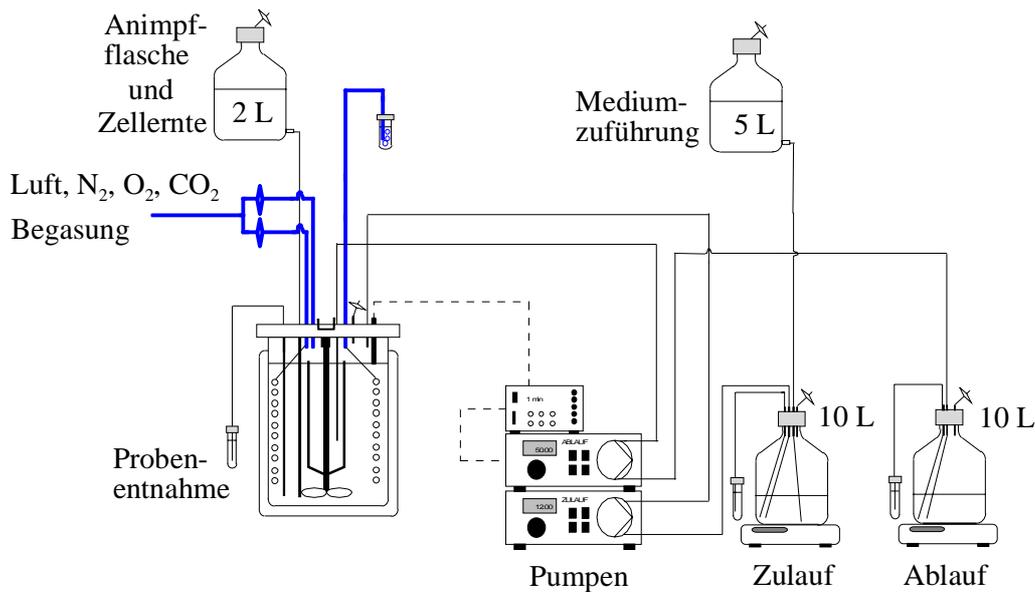


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau der 2 L-Perfusionsbioreaktoranlage.

2.5 Die Prozeßführungen

In der Biotechnologie wird für Kultivierungen von Zellen grundsätzlich zwischen offenen, teiloffenen und geschlossenen Systemen unterschieden (Chmiel, 1991).

In einem geschlossenen System wird Medium mit den für das Zellwachstum notwendigen Substraten und das Inokulum am Anfang der Kultivierung eingebracht. Weder Medium noch Zellen werden während des späteren Prozesses zu- oder abgeführt. Das System ist bezüglich seiner Flüssigphase geschlossen, muß aber zum Zwecke des Gasaustausches für gasförmige Substrate offen sein. Am Ende der Kultivierung erfolgt die Ernte der Produkte und damit das Entleeren des Kulturgefäßes.

In einem teiloffenen System wird entweder während der Kultivierung Medium mit einer bestimmten Rate zugegeben, bis das Maximalvolumen erreicht ist, oder es wird zunächst mit dem Maximalvolumen kultiviert, welches bei bevorstehender Substratlimitierung auf ein Minimum abgelassen und anschließend mit frischem Medium aufgefüllt wird.

Ein offenes System ist gekennzeichnet durch eine kontinuierliche Zu- und Abfuhr von Medium. Bezüglich der Gasversorgung sind alle Systeme offen.

Je nach Kultivierungsprinzip unterscheiden sich damit die Prozeßführungen in satzweise und kontinuierliche Kultivierungen.

2.5.1 Der Batch-Prozeß

Der satzweise Betrieb (engl.: batch) wird in einem geschlossenen System durchgeführt (Pirt, 1985). Dabei ändern sich die Substrat-, Metaboliten-, und die Biomassekonzentrationen.

nen permanent. Substrate werden metabolisiert und Biomasse nimmt zu. Zwangsläufig führt dies zu einer Limitierung von mindestens einem Substrat oder zur Akkumulation von wachstumsinhibierenden Metaboliten. Beides resultiert in einem eingeschränkten Zellwachstum. Zweckmäßigerweise ersetzt man deshalb vor dem Eintreten einer Substraterschöpfung einen Großteil des Mediums durch Frischmedium. Diese Prozeßführung wird wiederholter satzweiser Betrieb (engl.: repeated batch) genannt und bedingt ein teiloffenes System.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Antikörper- und E-Selektin-IgG-Proteinproduktion sowohl satzweise als auch wiederholt satzweise Kultivierungen durchgeführt. Der ersetzte Medienanteil richtete sich nach der Biomassekonzentration, die nicht geringer als $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL sein sollte, um eine ausreichende Konzentration von zellspezifischen Mediatoren zu halten (Selbstkonditionierung). Der ausgetauschte Anteil variierte zwischen 50 und 95% des Kulturvolumens. Als Sonderfall wurden die Zellen aus 4 L der CSLEX-5 L-Bioreaktorkultur bei jedem Batch nach Zentrifugation (10 min, 150-g, 14°C, HERAEUS Cryofuge 6000) rückgeführt, um die Zellkonzentration in der Kultursuspension auf möglichst hohem Niveau zu halten und damit die Produktionsrate des Antikörpers zu erhöhen.

Die Kultivierung von adhärennten Zellen in T-Flaschen wurde ebenfalls satzweise durchgeführt. Der wachstumslimitierende Faktor ist bei ausreichender Nährstoffversorgung die den Zellen dargebotene Grundfläche der T-Flasche. Ist die Kultur konfluent, so wird bei kontaktinhibierten Zellen eine weitere hyperplastische Proliferation eingestellt. Das notwendige Passagieren erfolgte nach Absaugen des Kulturmediums und Waschen mit CMF-PBS (engl.: calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline) enzymatisch mittels Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%, SIGMA). Nach 1 bis 3minütiger Einwirkzeit lösten sich die Zellen vom Substrat, worauf die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 mL serumhaltigen Medium abgestoppt wurde. Anschließend erfolgte je nach Zelllinie und Zellkonzentration eine Passage in eine oder mehrere neue T-Flaschen mit einem Verdünnungsfaktor von 3 bis 35. Die T-Flaschen zur HUVEC-Kultivierung wurden vor Verwendung mit 1%iger Gelatinelösung (porcin, SIGMA) mindestens 30 Minuten inkubiert, abgesaugt und mit CMF-PBS gewaschen. Durch diese Behandlung konnte die Ausplattierungseffizienz gegenüber dem unbehandeltem Polystyrol gesteigert werden.

2.5.2 Der Perfusions-Prozeß

Der Perfusions-Prozeß basiert auf einem offenen System mit einer kontinuierlichen Betriebsweise. Die Flußraten von Zu- und Ablauf sind gleich, so daß ein konstantes Kulturvolumen erreicht wird. Mit dem abgeführten Medium werden, anders als beim Chemostat-Prozeß, kaum Zellen aus dem System ausgetragen. Dafür sorgt ein Zellrückhaltesystem, dessen Ausschlußgrenze idealerweise so gewählt ist, daß lebende Zellen im Reaktor verbleiben, Zelltrümmer aber ausgetragen werden. Nach einer Einschwingphase kommt es zu einem stationären Zustand (engl.: steady state), der durch konstante Konzentrationen an Zellen und Substrat gekennzeichnet ist (Pirt, 1985). Die Zellkonzentration paßt sich dem

Substratangebot an. Die Wachstumsrate ist gleich der Durchflußrate multipliziert mit dem Anteil der Zellrückhaltung. Damit wird die spezifische Wachstumsrate von der Verdünnungsrate entkoppelt, und zwar so, daß im Vergleich zum freien System ohne Zellrückhaltung (Chemostat) wesentlich höhere Verdünnungsraten gefahren werden können.

Der Perfusions-Prozeß bietet bei geeigneter Parameterwahl gegenüber dem Batch-Prozeß den Vorteil, daß kontinuierlich Produkt geerntet werden kann wobei die volumetrische Produktivität gesteigert ist.

Durchgeführt wurde eine Perfusions-Kultivierung im 2 L Reaktor mit CHO-IE-Zellen.

Zunächst wurde der Prozeß im satzweisen Betrieb begonnen, bis eine Zelldichte von $4,1 \cdot 10^5$ Zellen /mL erreicht war. Ab diesem Punkt wurde die Perfusion gestartet, indem eine Peristaltikpumpe kontinuierlich Frischmedium mit einer Verdünnungsrate von $0,5 \text{ d}^{-1}$ in den Reaktor förderte. Erreichte der Flüssigkeitsmeniskus die Füllstandsonde, förderte die Ablaufpumpe innerhalb von acht Minuten 90 mL aus dem Bioreaktor. Die Flußrate wurde ab dem 9. Tag auf $1,0 \text{ d}^{-1}$ erhöht.

2.6 Aufreinigung der produzierten Proteine

Die produzierten CSLEX-Antikörper und E-Selektin-IgG-Proteine sollten für den immunologischen Nachweis E-Selektin-bindungsaktiver Ganglioside auf Dünnschichtchromatographieplatten sowie als Moleküle zur Maskierung der Liganden des E-Selektins in Zell-Zell-Adhäsionsstudien dienen und mußten aus der Zellkultursuspension isoliert, konzentriert, aliquotiert und konserviert werden, um für die einzelnen Experimente gleiches Ausgangsmaterial mit definierten Konzentrationen einsetzen zu können.

2.6.1 CSLEX-Antikörper

Die Isolierung des monoklonalen Maus-IgM-Antikörpers CSLEX erfolgte im ersten Schritt durch eine zweistufige Zentrifugation zur Abscheidung der Zellen und Zelltrümmer. Dazu wurden die Zellen zunächst schonend für 10 min bei $150 \cdot g$ in einer Zentrifuge (Cryofuge 6000, HERAEUS) mit 6 x 1 L Behältern abgetrennt und der Überstand dekantiert. Anschließend erfolgte die Abscheidung von Zelltrümmern bei $4000 \cdot g$ für 15 min. Eine Ultrafiltration des serumfreien Überstandes mit einem Sartocoon II (SARTORIUS) Modul führte durch die gewählte Ausschlußgrenze (engl.: cut off) von 100 kDa zur Ankonzentrierung des IgMs, während die Medienbestandteile Albumin, Transferrin und Insulin abgereichert wurden. Nach einer Diafiltration gegen NaCl-Lösung mit einer Konzentration von 1 g/L erfolgte eine Lyophilisierung (Lyovac GT2, LEYBOLD) und letztendlich eine Solvatisierung in CMF-PBS. Die CSLEX-Konzentration wurde auf 1 mg/mL eingestellt und Aliquots à 200 µL bei -20°C eingefroren. Zur Kontrolle der Reinheit wurden 50 µL CSLEX-Konzentrat mit einer Superdex 200-Gelfiltrationssäule (PC 3.2/20) am SMART-System (AMERSHAM PHARMACIA Biotech) mit CMF-PBS bei pH 7,0 in 11x 200 µL Fraktionen aufgetrennt und die zweite Fraktion als Vergleichsmaßstab der Reinheit für die Gelelektrophoresen (siehe Kap. 2.9.7) verwendet.

2.6.2 E-Selektin-IgG-Protein

Das E-Selektin-IgG Protein wurde zunächst von den CHO-IE-Zellen durch kontinuierliche Zentrifugation (HERAEUS Biofuge 17RS) mit 3543-g und Tiefenfiltration (Sartopure PP2, 3 µm, SARTORIUS) getrennt. Anschließend erfolgte eine Ankonzentrierung durch eine Ultrafiltration in einer Spiralkartusche (S10Y10, AMICON) mit einem *cut off* von 10 kDa. Die weitere Aufreinigung wurde affinitätschromatographisch mit 40 mL Protein A-Material (AMERSHAM PHARMACIA Biotech) gepackt in einer AMICON-Säule an einer FPLC-Anlage (AMERSHAM PHARMACIA Biotech) durchgeführt. Die Auftrags- und Elutionsraten betragen 300 bzw. 100 cm/h. Letztendlich wurde das Eluat in Reaktionsgefäße (EPPENDORF) á 350 µL mit einer Konzentration von 300 µg/mL aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Optimierung der Pufferbedingungen für die Affinitätschromatographie erfolgte an einer Streamline-Säule (AMERSHAM PHARMACIA Biotech) der Dimensionen 2,5 x 100 cm (Durchmesser x Höhe) mit 60 mL Protein A-Material bei einer Flußrate von 25 mL/min (306 cm/h). Die Anlage war mit einer P50-Pumpe, einer Control Unit UV-1, einer Optical Unit UV-1 und einem Gradi Frac Fraktionssammler sowie einem REC102 Schreiber ausgestattet.

Folgende Puffer wurden für die Affinitätschromatographie verwendet:

Tabelle 2.5: Puffer zur Durchführung der Protein A-Affinitätschromatographie.

| | |
|--|--|
| Equilibrierungs- und Laufpuffer | 20 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, pH 7,0 |
| Elutionspuffer | 100 mM Glycin/HCl, 150 mM NaCl, pH 2,5 10% Glycerin |

2.7 Humane Ganglioside

Die für die Adhäsionsstudien verwendeten humanen Granulocytganglioside und die humanen Hirnganglioside, sowie eine HL-60-Gangliosidfraktion, die als Vergleichsstandard für die Massenspektrometrie (siehe Kapitel 2.7.3) und die HPTLC-Analytik (siehe Kapitel 2.7.2) eingesetzt wurde, stellte PD Dr. J. Müthing zur Verfügung. Die Extraktion und Feinreinigung führten Dipl.-Chem. S. Kemminer und Dipl.-Biochem. A. Olbrich durch.

Folgende Fraktionen wurden bereitgestellt:

Tabelle 2.6: Bezeichnung und Herkunft der bereitgestellten Gangliosidfraktionen.

| Bezeichnung | Herkunft |
|-------------|--|
| JM07/7-1 | Humane Granulocytenganglioside (Neolacto-Serie) |
| JM07/7-3 | |
| JM07/7-3S | |
| JM07/7-4 | |
| JM07/7-4S | |
| JM08/68-2 | Humane Hirnganglioside (Ganglio-Serie) |
| JM08/72-1 | HL-60 Ganglioside (Neolacto-Serie) |
| JM08/72-2 | |

Die jeweilige Endziffer in der Bezeichnung der einzelnen Fraktionen bezieht sich auf die Elutionsfraktionen der Aufarbeitung. Die mit dem Buchstaben „S“ gekennzeichneten Fraktionen sind durch Sedimentation abgeschiedene Komponenten der Ausgangsfraktion.

2.7.1 Extraktion und Isolierung von Gangliosiden

Die zur Isolierung der Ganglioside notwendigen Schritte sind im folgenden schematisch dargestellt.

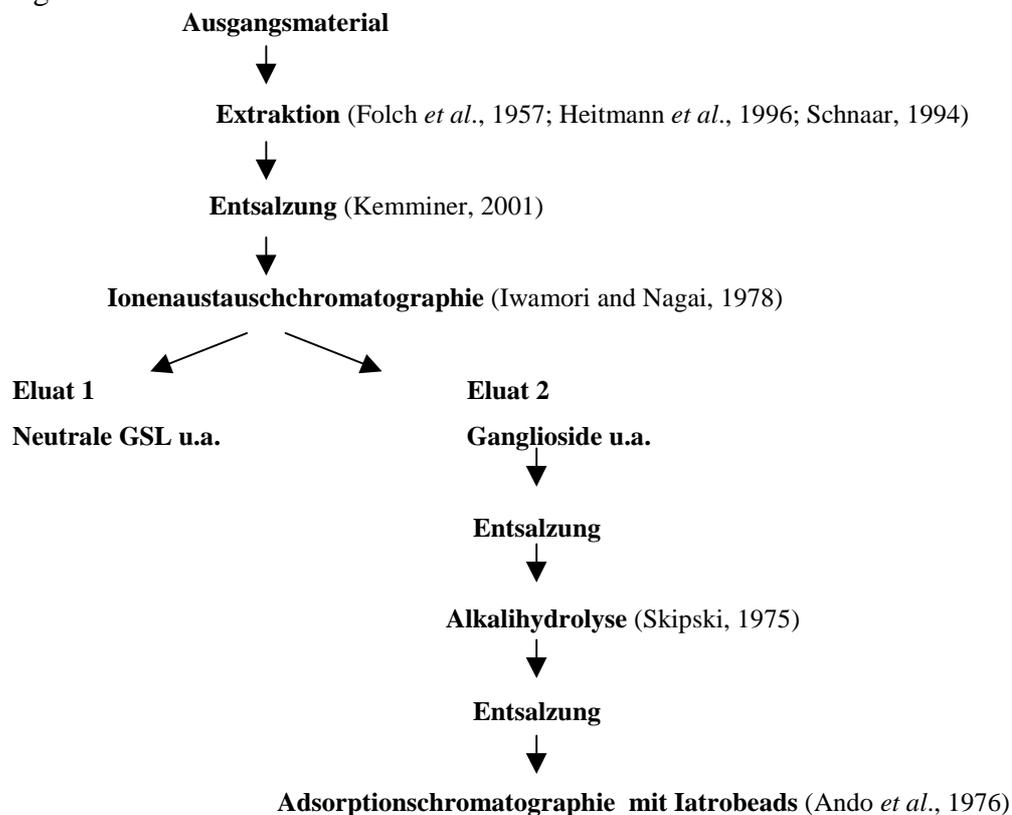


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Isolierung von Gangliosiden in Anlehnung an Heitmann (1998) und Kemminer (2001).

2.7.2 Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Zur Auftrennung des Gangliosidgemisches und zum Bindungsnachweis des CSLEX-Antikörpers und des E-Selektin-IgG-Proteins an die humanen Granulocytenganglioside wurde die HPTLC-Technik (engl.: high performance thin-layer chromatography) angewendet. Die Ganglioside wurden auf Kieselgel 60 beschichteten Glassplatten (10 x 10 cm, 0,2 mm dicker Silicagellayer, MERCK, Darmstadt) in Chloroform/Methanol/Wasser 50/47/14 (v/v/v) supplementiert mit 5 mM CaCl₂ getrennt. Anschließend wurden die Gangliosidbanden mit Orcinol-H₂SO₄ sichtbar gemacht (Svennerholm, 1956) und mit 0,5 % Polyisobutylmethacrylate (Plexigum P28, RÖHM, Darmstadt) in n-Hexan überzogen und fixiert (Müthing, 1998).

Die Immunfärbung wurde mit der Overlay-Technik (Müthing, 1996c) durchgeführt. Dazu wurde nach HPTLC, Plexigumfixierung und Inkubation mit CSLEX-Antikörper (10 µg/mL in CMF-PBS mit 1% BSA) bzw. E-Selektin-IgG-Protein (1 µg/mL in 10 mM HEPES Puffer (pH 7.0), supplementiert mit 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ und 1% BSA) eine anschließende Inkubation der 1:1000 verdünnten, mit alkalischer Phosphatase markierten Sekundärantikörper (Ziege anti Maus IgM bzw. Kaninchen anti human IgG; DIANOVA) vollzogen. Die Detektion der Bindungskomplexe geschah durch enzymatischen Umsatz des 0,05%-konzentrierten (w/v) Substrats 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP; BIOMOL, Hamburg) gelöst in 0,1 M Glycinpuffer supplementiert mit 1 mM ZnCl₂ und 1 mM MgCl₂ bei pH 10,4.

2.7.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde zur Strukturaufklärung der humanen Granulocytengangliosid- und HL-60-Gangliosidfraktionen verwendet. Das Meßprinzip beruht auf der Tatsache, daß ein bewegtes Ion durch ein magnetisches Feld als Funktion seiner Masse und seiner Geschwindigkeit abgelenkt wird. Ionen mit größerer kinetischer Energie werden dabei weniger abgelenkt als diejenigen mit niedriger Energie, während ein Gemisch von Ionen verschiedener Masse, aber gleicher Geschwindigkeit im Verhältnis ihrer Massen abgelenkt werden. Durch Herausschlagen eines Elektrons oder durch Einfangen eines Protons werden ionisierte Formen der Verbindungen erzeugt. Je nach Stärke der Energiezufuhr werden die Verbindungen in eine Reihe ebenfalls ionisierter Fragmente gespalten. Die meisten der bei der ursprünglichen Ionisierung gewonnenen Ionen besitzen durch eine Entfernung eines Elektrons eine einfach positive Ladung. Das Masse/Ladungsverhältnis (m/e) ist der Masse numerisch gleich, die so erzeugten Ionen unterscheiden sich somit nur in ihrer Masse. Das letztendlich detektierte Spaltungsmuster ist für die einzelnen Verbindungen charakteristisch und läßt eine Ableitung der Struktur der Moleküle zu.

Für diese Arbeit wurde die Nano-ESI QTOF Massenspektrometrie (engl.: Nano-electrospray ionization (ESI) tandem mass spectrometry (MS/MS) quadrupole time-of-flight (QTOF)) angewendet (Metelmann *et al.*, 2000). Bei diesem Verfahren wird die Probe durch Anlegen einer Spannung an einem Metalldraht in einer, vor einem Kegelelement

befindlichen, Kapillare ionisiert und als „Elektrospray“ mit einem Trägergas eingedüst, beschleunigt und nach Durchgang durch Hexapol-Quadrupol-Hexapol-Magnetfelder am Detektor registriert. Die Kapillarspannung betrug 1,1 kV mit einer Kegelspannung von 150 kV am Gerät (MICROMASS, Manchester, U.K.). Die Granulocytenfraktionen in Chloroform/Methanol (2/1, (v/v)) wurden mit einer Konzentration von ca. 0,1 µg/µL und einer Flußrate von 15-40 nL/min unter Stickstoffbegasung appliziert. Das verwendete Massenspektrometer ließ durch die bauartbedingte Kollisionskammer im zweiten Hexapol Fragmentierungsexperimente, und damit genauere Strukturanalysen, zu. Für die MS/MS-Analyse betrug der Druck in der Kollisionskammer unter Verwendung von Argongas $4 \cdot 10^{-5}$ mbar.

2.7.4 Insertion von Gangliosiden in Liposomen

Eine Standardmischung aus Phosphatidylcholin (PC 18:0/18:0, Nr. 565076-1, LIPOID GmbH, Ludwigshafen), Phosphatidylethanolamin (S PE, Nr. T31018, LIPOID GmbH) und Cholesterol (C-7402, SIGMA) wurde im Gewichtsanteilen von 5/3/2 in Chloroform/Methanol (2/1) hergestellt. In diese Mischung wurde anschließend (9 PC/PE/C +1 GSL nach Gewichtsanteilen) die jeweilige humane Gangliosidfraktion zugegeben. Nach Abzug des Lösungsmittels unter Stickstoff wurden die Anteile in proteinfreiem Basalmmedium aufgenommen und in Intervallen für eine Minute mit Ultraschall behandelt (Sonifier 250, BRANSON SONIC POWER COMPANY, Danbury, U.S.A.; 50 % duty cycle, output control „5“). Mittels anschließender 11maliger Extrusion durch zwei Polycarbonatmembranen mit 100 nm Porendurchmesser (Extruder LiposoFast, AVESTIN, Ottawa, Canada) wurden unilamellare Liposomen gleicher Größe zu generiert, in die die Ganglioside inseriert waren (MacDonald *et al.*, 1991).

Die Inkubation der CHO-E Zellen geschah in 50 µL Volumina der Liposomenenthaltenden Lösung, die bis zur 12. Spalte mit proteinfreiem Medium je 1:2 verdünnt wurde. Letztendlich wurden die Layer mit je $1,35 \cdot 10^5$ Zellen in 50 µL Volumina überschichtet und der statische Adhäsionstest wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben durchgeführt.

2.7.5 Präparation von Gangliosid-BSA-Komplexen

Zur Bindung der humanen Ganglioside an fettfreies BSA (Nr. K41402, PAA) wurde eine jeweils definierte Menge Ganglioside in einem Pyrexglasröhrchen nach Abzug des Lösungsmittels Chloroform und Methanol (2/1, v/v) mit 1 mg BSA in proteinfreiem Medium mittels Ultraschall (siehe Kapitel 2.7.4) aufgenommen. Nicht-gebundene Ganglioside wurden durch Affinitätschromatographie mit 0,1 g RP₁₈-Material (SepPak C₁₈) in einer PC10 Säule von dem beladenen Albumin getrennt. Die Säule wurde zunächst mit Chloroform-Methanol (2/1, v/v) und anschließend mit Reinstwasser gespült. Nach der Probenaufgabe wurde in 1 mL-Schritten stufenweise zunächst mit 0,88% KCl und Wasser das beladene Albumin eluiert und anschließend mit steigendem Methanolanteil (M/W (v/v) 20/80,

40/60, 60/40, 80/20, Methanol) die an die Säule gebundenen Ganglioside vom Säulenmaterial gelöst.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit dem auf der Biuret-Reaktion beruhenden **BCA-Test** (PIERCE, Rockford, U.S.A.) auf ihren Proteinanteil getestet bei dem im alkalischen Milieu Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen in Anwesenheit von Proteinen wie z.B. BSA reduziert werden. Die Bichinonsäure (BCA) bildet mit Cu^{1+} einen farbigen Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden kann (siehe Tabelle 2.7).

Parallel wurden die Fraktionen mit der **Neutralzuckerbestimmung** (Monsigny *et al.*, 1988) auf ihren Zucker- und damit Gangliosidanteil hin untersucht (siehe Tabelle 2.7). Die Resorcin/Schwefelsäure-Mikromethode kann Neutralzucker von Glykoproteinen und Glykolipiden bestimmen ohne daß die Zucker vorher isoliert werden müssen. Dabei wird die Probe mit Resorcinol und Schwefelsäure für 90 Minuten erhitzt und nach Abkühlung bei 430 nm photometrisch vermessen. Als Referenzzucker für die Eichkurvenerstellung diente Galactose.

Tabelle 2.7: Arbeitsschritte für den BCA-Test und die Neutralzuckerbestimmung.

| BCA-Test | Neutralzuckerbestimmung |
|--|--|
| 10 mL Reagenz A (Na-carbonat, Na-hydrogencarbonat, BCA, Na-tartrat in 0,2 M NaOH) 0,2 mL Reagenz B (4% Kupfer(II)sulfat) | 200 µl Probe bzw. D-Galactosestandard 200 µL Resorcinol (6 mg/mL in Wasser) 100 µL H_2SO_4 75% |
| 10 µL Probe bzw. Standard / well 200 µL Reagenz AB /well | Auf Eis, mischen, Reaktionsröhrchendeckel mit Kanüle einstechen |
| 30 min 37°C | 30 min 90°C im Heizblock |
| messen bei 570 nm in 96well-Mikrotiterplatte (NUNC) | 30 min 4°C |
| | Messen bei 430 nm in Quarzküvette |

2.7.6 Inhibition der HL-60 E-Selektin-Liganden-Biosynthese

Zur Inhibition der E-Selektin-Liganden-Biosynthese wurden vier verschiedene Glykosylierungs-Inhibitoren benutzt, die an unterschiedlichen Stellen in den Gangliosid- bzw. Glykoprotein-Anabolismus eingreifen.

D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (**D-PDMP**) (MATREYA) ist ein kationisches Lipid, das als Inhibitor der Glucosylceramid-Synthase wirkt (Abe *et*

al., 1991; Li and Ladisch, 1997). Dadurch wird der Transfer der UDP-Glucose auf das Ceramid gehemmt, was letztendlich zu einer Syntheseblockade der Ganglio-, Globo-, Lacto- und Neolacto-Glykosphingolipide führt.

Fumonisin B₁ (ALEXIS, Läufelfingen, Schweiz) ist ein Mycotoxin aus *Fusarium moniliforme*, das den Transfer von Galactose an Sphingolipide sowie die N-Acetyltransferase inhibiert und damit die *de novo* Sphingolipidsynthese blockiert (Merril *et al.*, 1993).

Brefeldin A (ALEXIS) inhibiert die *de novo* Synthese von Globo- und Neolacto-Glykosphingolipiden, hat aber keinen Effekt auf β 1-3-N-Acetylglucosaminyl-, die β 1-4-Galactosyl- oder die α 1-3-Fucosyltransferaseaktivität (Sherwood and Holmes, 1992).

Tunicamycin (SIGMA) aus *Streptomyces lysosuperificus* hemmt spezifisch die N-Glykosylierung von Proteinen durch Blockade der Übertragung von GlcNAc auf Dolicholphosphat (Paul *et al.*, 1992). Dieses Lipid ist eine für die N-Glykosylierung von Proteinen notwendige Vorstufe, da es als Trägermolekül fungiert, von dem der Kohlenhydratanteil letztendlich übertragen wird.

Je 50 μ L der Glykosylierungsinhibitoren wurden in einer Mikrotiterplatte in 1:2 Schritten von der ersten bis zur zwölften Spalte in Kulturmedium verdünnt. Anschließend wurden 100 μ L/well HL-60 Zellen mit einer Konzentration von $2,02 \cdot 10^6$ Zellen/mL zugegeben. Die Inkubationskonzentrationen der Glykosylierungsinhibitoren betragen dabei 0-30 μ M. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank für sechs Stunden unter Schütteln bei 200 U/min inkubiert und dann je 100 μ L/well auf die Mikrotiterplatte mit CHO- bzw. HUVEC-Layern übertragen und der statische Adhäsionstest wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben mit Zentrifugation und Waschen fortgeführt.

2.7.7 Enzymatischer Verdau von E-Selektin-Liganden

Zum enzymatischen Verdau von HL-60 Membran-integrierten E-Selektin-Liganden wurden folgende Enzyme verwendet:

- rekombinante cytosolische **CHO-Sialidase** (rCHO), die in *E. coli* kloniert und exprimiert wurde (Burg and Müthing, 2001). Das Enzym ist ein 69 kDa großes Fusionsprotein aus Sialidase und Glutathion-S-Transferase. Es hydrolysiert bevorzugt terminal α 2-3-gebundene Sialinsäuren (Müthing and Burg, 2001).
- **Sialidase aus *Vibrio cholerae*** (BEHRING Diagnostics GmbH, Marburg) (Barman, 1969). Dieses Enzyme spaltet an Neutralzuckerketten gebundene Sialinsäuren von Sialo-Glykoproteinen und Gangliosiden ab. Die Substratspezifität der Sialidase aus *V. cholerae* umfaßt O-ketosidische α 2-3, α 2-6 und α 2-8-Bindungen endständiger Sialinsäuren von Oligo-, Poly- und Mucopolysacchariden sowie von Glykoproteinen und Glykolipiden.
- rekombinante in *E. coli* exprimierte **Peptid-N-Glykosidase F** (PNGase F) (BOEHRINGER MANNHEIM). Spaltet alle Typen N-glykosidisch-gebundener Glykanketten von Glykoproteinen.

- rekombinante in *E. coli* exprimierte **Endoglykoceramidase** (CALBIOCHEM, La Jolla, U.S.A.) aus *Rhodococcus*. Diese trennt spezifisch Oligosaccharide nur von Glykosphingolipiden am Ceramidteil (Ito and Yamagata, 1989).

Je 50 μL der Enzyme wurden in einer Mikrotiterplatte in 1:2 Schritten von der ersten bis zur zwölften Spalte in Kulturmedium verdünnt. Anschließend wurden 50 μL /well HL-60 Zellen mit einer Konzentration von $3,375 \cdot 10^6$ Zellen/mL zugegeben. Die Inkubationskonzentrationen der Enzyme betragen dabei 0-100 mU/mL. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank für sechs Stunden unter Schütteln bei 200 U/min mit der Endoglykoceramidase bzw. für 1,5 Stunden mit PNGase F, VC-Sialidase oder rCHO-Sialidase inkubiert und dann je 80 μL /well auf die Mikrotiterplatte mit CHO-E- bzw. HUVEC-Layern übertragen und der statische Adhäsionstest wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben mit Zentrifugation und Waschen fortgeführt.

2.8 Das Adhex Zellzählsystem

Das Adhex (engl.: adherence-examination-system) der Firma INNOVATIS (Bielefeld) ist eine Kombination aus Umkehrmikroskop, digitaler Kamera, steuerbarem Motortisch und computergesteuerter Mustererkennungsanalyse zur Auszählung von adhärenierten Zellen auf einem konfluenten Zellayer. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Prototyp verwendet, der in Zusammenarbeit mit der Firma INNOVATIS an die Anforderungen angepaßt wurde. Abbildung 2.7 zeigt die Benutzeroberfläche der Adhex-Software.

Die Zählergebnisse basierten auf den Grauwertbildern der JAI 1/2" CCD Kamera, die mit einem High Speed Shutter mit einer Verschlusszeit bis zu 1/917000 Sekunden ausgerüstet war. Die Auflösung der effektiven quadratischen Pixelelemente betrug 782 horizontal und 582 vertikal. Die Aufnahmen wurden „non-interlaced“ mit 525 Zeilen in 1/30 Sekunde (EIA) und Horizontal- bzw. Vertikalfrequenzen von 15,625 kHz und 50 Hz generiert. Eine Ausstattung mit einem „Progressive Scanning CCD“ ermöglichte eine höhere Auflösung bei bewegten Bildern. Die Kamera war in ein IX50 (OLYMPUS) Inversmikroskop integriert, das mit zwei Objektiven für eine 4- und 10fache Vergrößerung der mikroskopischen Bilder sorgte. Standardmäßig wurde das 4fach Objektiv eingesetzt, das eine auszählbare Oberfläche von 1 mm² abbildete. Für die optische Kontrolle der Messung war das Mikroskop mit einem Binokulartubus mit Okularen von je 10facher Vergrößerung ausgestattet. Die generierten Bilder wurden vom 320 MB Hauptspeicher auf der 8 GB Festplatte des Pentium II Personal Computers (233 MHz) gespeichert. Das Musterkennungsprogramm ermittelte nach Ablauf der Meßserie mittels Operatoren für Objektgröße, Grauwert, Geometrie und Schärfe die jeweilige Anzahl der adhärenierten Zellen pro Bild. Die Ansteuerung der auszählenden Bildausschnitte wurde durch einen Motortisch (MÄRZHÄUSER, Wetzlar), der manuell über einen Joystick oder automatisch nach auswählbaren Koordinaten gesteuert wurde, ausgeführt. Durch die Kombination mit einer 8 Bit 3-Achs-Steuerung zur X, Y und Z Achsenbewegung und einer Schrittmotorsteuerung mit einer Auflösung von $1 \cdot 10^{-4}$ mm war eine äußerst genaue Ansteuerung bei einer hohen Geschwindigkeit von

$3,6 \cdot 10^5$ Mikroschritten/s möglich, wobei die programmierbare automatische Rampensteuerung die Beschleunigung beim Starten und Stoppen begrenzte. Die Steuerung arbeitete mit dem vektoriellen Verfahren der linearen Interpolation, so daß beide Achsen gleichzeitig die Zielposition erreichten. Eine automatisierte Fokussierung gewährleistete die für das Mustererkennungsprogramm optimale Schärfenebene.

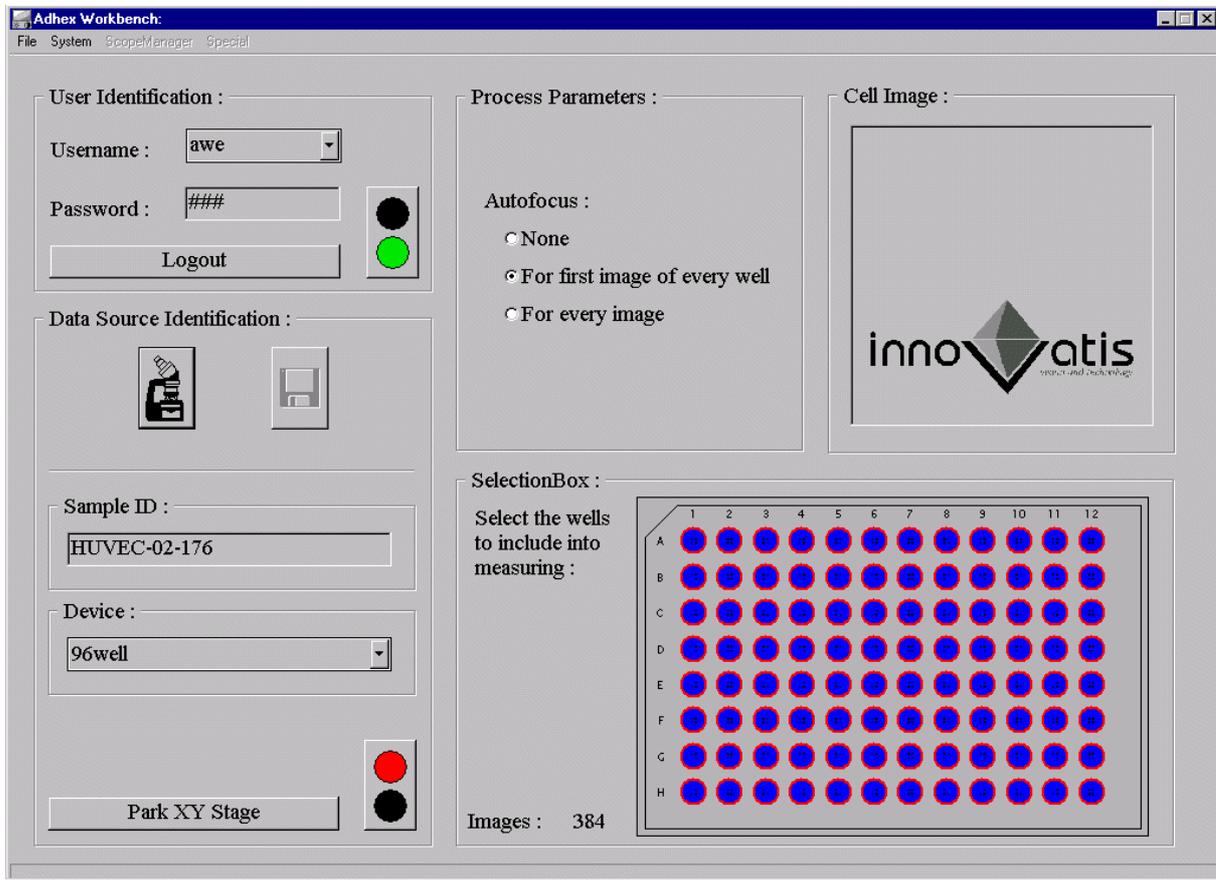


Abbildung 2.7: Benutzeroberfläche der Adhex-Software.

Insgesamt wurde durch die Automatisierung der Erkennung und Auszählung die subjektive Auswertung des Menschen ausgeschlossen. Zusätzlich wurde durch die hohe Auswertegeschwindigkeit von durchschnittlich 1 Bild/4 s bei 5000 Zellen/Bild ein effizientes System zur Analyse von Zell-Zell-Wechselwirkungen geschaffen.

2.8.1 Das statische Adhäsionssystem in 96well Mikrotiterplatten

Das Zell-Zell-Adhäsionsverhalten der einzelnen Zelllinien wurde zunächst in einem statischen System untersucht. Dazu mußte eine reproduzierbare Methode entwickelt werden, die einen möglichst hohen Durchsatz gewährleistete. Es wurden sterile 96well-Mikrotiterplatten (NUNC) verwendet, die gleichzeitig Verdünnungsreihen der Adhäsions-Inhibitoren bzw. -Induktoren zuließen. Die zu testenden Layerzellen wurden mit einer Konzentration von $1,6 \cdot 10^5$ Zellen/mL und einem Volumen von 100 μ L/well mit einer Va-

ripette (EPPENDORF) eingesät und für zwei Tage im Brutschrank bei 37°C (5% CO₂, 95% Luft) bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und jeweils durch frisches Medium ersetzt. Die Testsubstanz wurde nun in die 1. Spalte der Reihen B-G pipettiert (siehe Abbildung 2.8) und mit einer 12Kanalpipette (EPPENDORF) bis zur 12. Spalte verdünnt. Die A- und H-Reihen dienten als Kontrolle ohne Wirksubstanz. Nach der gewünschten Inkubationsdauer wurde die Wirksubstanz durch Absaugen entfernt und jeweils pro well 100 µL HL-60 bzw. K-562 Zellen mit einer Konzentration von $1,35 \cdot 10^6$ Zellen/mL zupipettiert. Eine 2minütige Zentrifugation bei 32 g in einem Ausschwingrotor für Mikrotiterplatten (Nr. 3471, HERAEUS) beschleunigte die Zellen auf den Layer. Die Bremse wurde vor der Zentrifugation ausgeschaltet, um eine zu starke Querbeschleunigung und damit ein Rollen der Zellen über den Layer zu vermeiden. Ein Mikrotiterplattenwaschgerät (ELP-40, BIO-TEK INSTRUMENTS) sorgte für die Ablösung der nicht oder nur schwach adhärennten Zellen. Für den Waschvorgang wurde ein 10 mM HEPES Puffer mit 150 mM NaCl und 5 mM CaCl₂ verwendet, der auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt war.

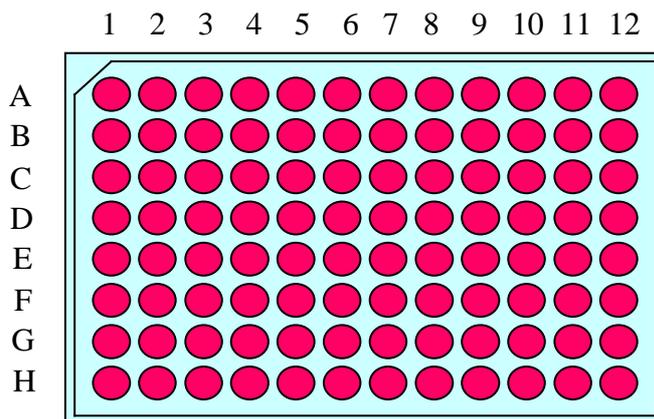


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung einer 96well Mikrotiterplatte.

Die Einstellungen des Mikrotiterplattenwaschgerätes wurden für CHO- und HUVEC Zellen neu programmiert und optimiert. Sie sind in Tabelle 2.8 dargestellt.

Tabelle 2.8: Einstellungen des ELP-40 Waschgerätes zur Durchführung des statischen Adhäsionsassays.

| | CHO-E, CHO-K1, CHO-P | HUVEC |
|--------------------------|-----------------------------|--------------|
| Plate | Adhex 96 | Huvec 96 |
| Bottom shape | Flat | Flat |
| Horiz. Position | 0,0 mm | 0,0 mm |
| Centering | 0,5 mm | 0,5 mm |
| Aspiration depth | 9,0 mm | 6,0 mm |
| Aspiration height | 9,0 mm | 6,0 mm |
| Bottom wash height | 9,0 mm | 1,0 mm |
| Horizontal carrier speed | 0 | 0 |
| Home manifold speed | 0 | 0 |
| Aspiration down speed | 7 | 7 |
| Disp. Up speed | 9 | 9 |
| Bottom wash down speed | 8 | 8 |
| Bottom wash up speed | 9 | 9 |
| Shaking amplitude | 9 | 2 |
| Crosswise asp. | No | No |
| Apir. Time | 0,5 s | 0,5 s |
| Wash vol. | 300 µL | 300 µL |
| Overflow hite | 7,0 mm | 6,0 mm |
| Liquid | Wash R1 | Wash R1 |
| Fluid flow rate | -4 | -5 |
| Number of cycles | 6 | 1 |
| Soak time | 0 mn 0 s | 0 mn 0 s |

Die Platten wurden mit je vier Bildern/*well*, die jeweils einen Ausschnitt von 1 mm² darstellten, durch das Adhex-System vermessen. Die Positionen der Bilder waren geometrisch in Form der „Augenzahl“ vier eines Würfels vom Einspritzpunkt der Waschdüse gleich weit entfernt und mit festen Koordinaten für jedes *well* fixiert.

2.8.2 Das dynamische Ahäsionssystem in der Fließkammer

Die verwendete Fließkammer ist eine Eigenkonstruktion, die zur Nachahmung der Strömungsverhältnisse in einer biologischen Venole entwickelt wurde. Sie bestand aus einem Edelstahlstempel mit Außendichtring und eingeklebtem Glasfenster zur optischen Kontrolle, einer Teflonscheibe, die die innere O-Ring-Dichtung stützte und zwei angeschraubten Edelstahlstutzen, die zur Stempelseite ebenfalls über O-Ringe abgedichtet waren (siehe Abbildung 2.9). Zur Versuchsdurchführung wurde der Stempel mit zwei Haltestegen in einem über ein Wasserbad temperierbaren Aluminiumrahmen in eine 35 mm Zellkulturschale (NUNC) gepresst.

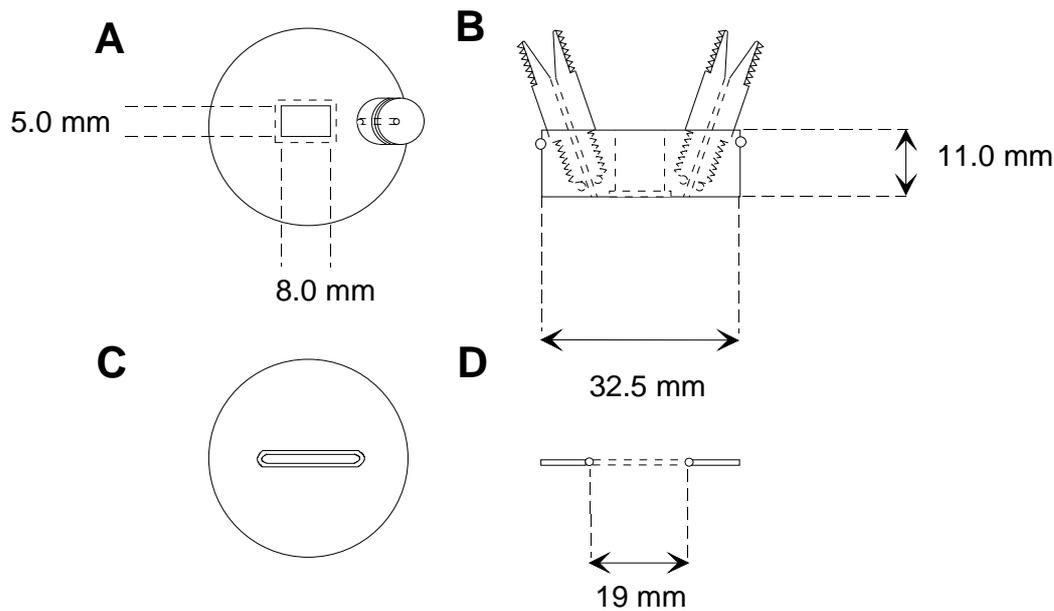


Abbildung 2.9: Bauteile der Fließkammer mit A: Aufsicht des Edelstahlstempels mit eingeklebtem Glas und eingeschraubten Stützen; B: Seitenansicht des Stempels; C: Aufsicht der Teflonscheibe mit O-Ring; D: Seitenansicht der Teflonscheibe.

Die Zellkulturschalen wurden zwei Tage vor Durchführung des Adhäsionstests zentral zunächst mit $30\ \mu\text{L}$ einer Zellsuspension von $8 \cdot 10^4$ Zellen/mL für eine Stunde bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank zur Anheftung inkubiert. Anschließend wurden pro Schale $2\ \text{mL}$ Medium zupipettiert, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten und eine Austrocknung zu vermeiden. Innerhalb der zwei Tage wuchsen die Zellen bis zur Konfluenz mit kreisförmiger Begrenzung. Die Kammergeometrie wurde durch die innere O-Ringdichtung auf $1,1 \times 1 \times 19\ \text{mm}$ (Breite \times Höhe \times Länge) begrenzt. Die Deformierung der O-Ring-Dichtung durch die Anpresskraft betrug bei abgedichteter Kammer in der Höhe ca. $100\ \mu\text{m}$. Die Kammer war über Teflonschläuche mit $0,5\ \text{mm}$ Durchmesser über eine Perimax 16 Antipuls-Peristaltikpumpe (SPETEC, Erding) mit einem Minibioreaktor verbunden (siehe Abbildung 2.10).

Die Pumpe war charakterisiert durch zwei rotierende Rollenköpfe mit je acht Andruckrollen, die zu ihrem darüberliegenden Nachbarn halbversetzt waren. Durch einen $0,5\ \text{mm}$ Tygongschlauch, der über Y-Verbinder zunächst in zwei Schläuche aufgesplittet und hinter der Pumpe wieder zusammengeführt wurde, waren die Druckwellen so überlagert, daß es nahezu zu einer Pulsfreiheit der Strömung kam. Der Minibioreaktor ist ebenfalls eine Eigenkonstruktion und bestand aus einer $100\ \text{mL}$ Duranflasche mit zwei Anschlußboliven für den Anschluß an ein temperierbares Wasserbad, einem hohlgebohrten Deckel mit Dichtung und innenliegendem $33\ \text{mL}$ -Pyrexglasröhrchen. Unter dem zugehörigen inneren Deckel mit $25\ \text{mm}$ Durchmesser befand sich eine, durch eine Teflondichtung fixierte Edelstahlscheibe mit Anschlüssen für die Gasver- und Entsorgung, Zu- und Abführung von Zellsuspension über $120\ \text{mm}$ lange Edelstahlkanülen, die durch eingeschraubte Septen geführt

wurden, sowie Durchführungen für Mini-pO₂- und pH-Elektroden (MEREDOS, Nörten-Hardenberg).

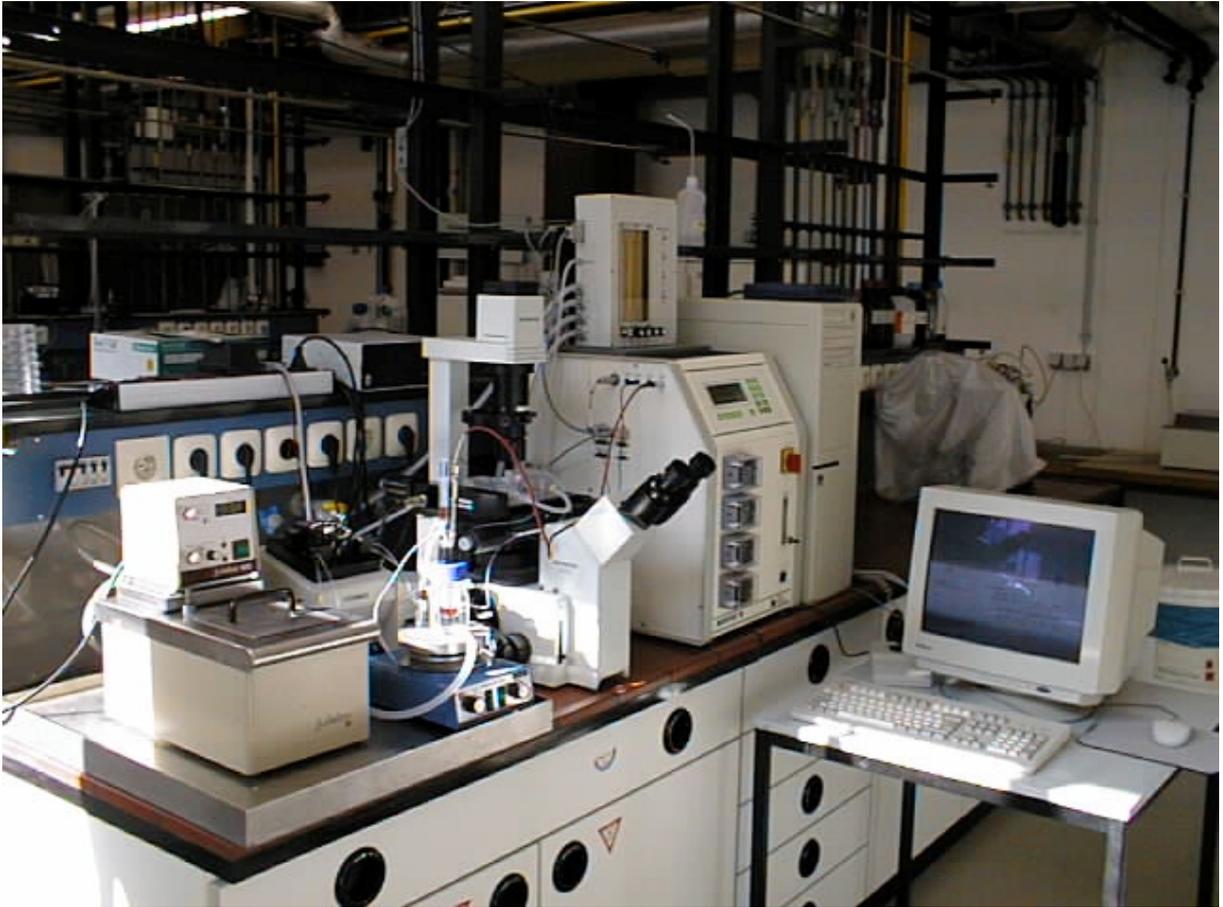


Abbildung 2.10: Das Adhex-System mit Monitor, Tastatur, Personal-Computer, Biostat B, IX-50 Mikroskop mit Fließkammer, Steuereinheit, Bioreaktor, Pumpe und Wasserbad (von rechts nach links).

Vor Beginn des Fließkammeraufbaus wurde die HL-60 Suspension mit einer sterilen Spritze durch ein Septum injiziert. Die Begasung der jeweils 1-3 mL HL-60 Suspension erfolgte über die Oberfläche. Durchmischt wurde mittels eines 5 mm langen und 2 mm breiten Magnetührstäbchens, das über einen Magnetprüher angetrieben wurde. Die Temperierung übernahm ein Julabo 5 Wasserbad, dessen Temperatur über ein PT100 Meßfühler abgegriffen wurde. Die Regelung des pH-Wertes auf einen Wert von 7,3 wurde durch die Gaszufuhr einer Biostat B Einheit (B. BRAUN Biotech International) sichergestellt. Der Mini-bioreaktor war mit eingebauten Elektroden entweder separat oder mit Doppelmantel auto-klavierbar. Mit Beginn des jeweiligen Adhäsionsversuches wurde der Motortisch des Mikroskops manuell mittels Joystick bewegt und die Mitte der Fließkammer optisch fixiert. Die Kammer wurde zunächst für eine Minute mit einer Pumprate von 900 $\mu\text{L}/\text{min}$ luftblasenfrei gespült und der Volumenstrom anschließend entsprechend den gewünschten Scherstressbedingungen vermindert. Nach dem Spülen der Kammer wurde die Zeitnahme gestartet und eine 40sekündige Bildsequenz mit 25 Bildern/s bei 4facher Objektivvergrößerung aufgenommen, um die Rollgeschwindigkeit und die Anzahl der mit dem Layer integrierenden Zellen zu bestimmen. Jeder Fließkammerversuch wurde für 10 Minuten

durchgeführt und am Ende ein Film aufgenommen, mit dem aus 51 Bildern die Anzahl der fest adhärirten Zellen/mm² bestimmt wurde.

2.8.3 Berechnungsgrundlagen der Fließkammer

Die Berechnungsgrundlagen der Fließkammer basieren auf der Voraussetzung der laminaren Strömungsverhältnisse (siehe Abbildung 2.11) im Bereich der transparenten Bauelemente, aus dem die Daten der Adhäsionsstudien aufgenommen wurden. Bei dieser Ausbildung der Schichtenströmung bewegen sich die Fluidelemente nebeneinander auf voneinander getrennten Bahnen, ohne daß es zu einer Vermischung zwischen den parallel zueinander gleitenden Schichten kommt. Die Geschwindigkeitsvektoren zeigen dabei in allen Schichten tangential zur Hauptströmungsrichtung, wobei die Fluidelemente, die die Wand berühren, aufgrund der Haftbedingung zur Ruhe kommen (vgl. Kapitel 1.4). Oberhalb einer kritischen Geschwindigkeit geht die laminare in eine turbulente Strömung über. Das strömende Fluid bewegt sich dabei nicht mehr in geordneten Schichten, sondern der Hauptströmungsbewegung sind jetzt zeitlich und räumlich ungeordnete Schwankungsbewegungen überlagert. Zur Beschreibung der Strömungsverhältnisse an um- oder durchströmten Körpern wird die dimensionslose Reynolds-Zahl, eine Kennzahl, die den Reibungseinfluß durch Viskosität und Turbulenz beschreibt, verwendet ($Re = v l / \nu$). Ein bestimmter Zahlenwert, der von der Form und der Oberflächenbeschaffenheit abhängig ist, kennzeichnet den Umschlag von laminarer in turbulente Strömung. Bei glatten durchströmten Körpern, d. h. bei Rohrströmungen, beträgt die mit der mittleren Durchströmgeschwindigkeit, dem Rohrdurchmesser und der kinematischen Viskosität gebildete Reynolds-Zahl ($Re_u = v_m D / \nu$) des laminar-turbulenten Umschlags ca. 2300 (Truckenbrodt, 1996). In nicht kreisförmigen Querschnittsformen sind nicht alle Elemente des beströmten Umfangs in gleichem Maß an der Übertragung der Wandschubspannung beteiligt. In einer Fließkammer mit rechteckigem Querschnitt berechnet sich die Reynolds-Zahl aus dem gleichwertigen Durchmesser $D_g = 2h / (1 + h/b)$. In einem Spalt haben die Seitenwände keinen Einfluß, so daß der gleichwertige Durchmesser nur von der Spalthöhe abhängt ($D_g = 2h$). Zur Vereinfachung wurden die O-Ringseitenwände der Innenkammer als gerade Wände angenommen und der gleichwertige Durchmesser nach der Formel für den rechteckigen Querschnitt berechnet.

Zusätzlich beeinflußt die Rauheit der Oberfläche die Strömungsverhältnisse. Die Rohrreibungszahl λ beschreibt zusammen mit der Länge und dem Durchmesser den Verlust an fluidmechanischer Energie (Druckverlust) und ist eine Funktion der Reynolds-Zahl und der relativen Rauheit (k/D_g), die sich wiederum aus der Wandunebenheit (k) im Verhältnis zum gleichwertigen Durchmesser (D_g), $\lambda = \lambda(Re, k/D_g)$ ergibt. Die Spaltreibungszahl ist bei gleicher Reynolds-Zahl um den Faktor 1,5 größer als beim glatten Kreisrohr. Der Umschlag von laminarer Strömung in turbulente liegt bei etwa $Re = 3400$. Da der Querschnitt der Fließkammer weder kreis- noch spaltförmig ist, kann anhand der rechteckigen Geometrie ein Umschlagpunkt zwischen 2300 und 3400 angenommen werden. Die Wandrauheit beträgt bei einer Fließkammerhöhe von 900 μm unter Berücksichtigung des gleichwerti-

gen Durchmessers ($990 \mu\text{m}$) und einer Zell-Layerhöhe von $5 \mu\text{m}$ $5,1 \cdot 10^{-3}$. Der Umschlagpunkt der Strömung liegt damit ebenfalls in dem oben genannten Bereich, da sich die Funktion $\lambda = \lambda(\text{Re})$ für glatte und raue Rohre bis zu einer relativen Rauheit von $3 \cdot 10^{-2}$ im laminaren Bereich praktisch nicht unterscheiden. Erst im turbulenten Zustand ist die Rohrreibungszahl mit zunehmender Rauheit deutlich gegenüber den glatten Rohren erhöht (vgl. Truckenbrodt, 1996).

Der Einlaßkanal der Fließkammer ist an der Eintrittsöffnung in die innere Strömungskammer im Winkel geführt. Damit entsprechen die Strömungsverhältnisse dort denen hinter einem Rohrkrümmer mit Wirbelbildung an dem unteren und hinter dem oberen Kantenbereich. Die hydrodynamische Einlaufänge bis zur Ausbildung der laminaren Strömung beträgt nach F. Bender $L_{hE} = 0,03 \text{ Re } D$ (Vauck und Müller, 1988). Damit ist eine laminare Strömung an den transparenten Bauelementen in der Mitte der Fließkammer bis zu einem Wert von $\text{Re} = 300$ gewährleistet.

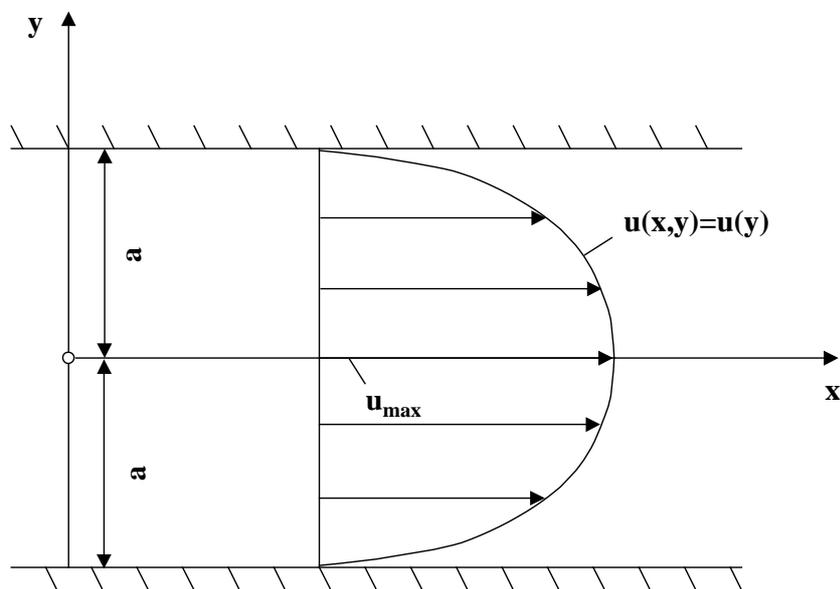


Abbildung 2.11: Laminare Spaltströmung.

Zur Berechnung der Strömungsparameter in der Fließkammer wurden folgende Gleichungen in Ableitung der Navier-Stokeschen Bewegungsgleichung angewendet:

Berechnung der Strömungsgeschwindigkeiten (nach Truckenbrodt, 1996):

$$u_{\max} = \frac{\dot{V} \eta}{2ba} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$$

$$u_{\text{mittel}} = \frac{2}{3} u_{\max} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$$

$$u(y) = \frac{u_{\max} (a^2 - y^2)}{a^2} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$$

Berechnung der Wandschubspannung (nach Lawrence *et al.*, 1987):

$$\tau_w = \frac{3\dot{V} \eta}{2a^2 b} \quad [\text{N} \cdot \text{m}^{-2}]$$

Tabelle 2.9: Größen zur Berechnung der Strömungsparameter in der Fließkammer.

| Größe | Bezeichnung | Einheit |
|--------------------------|--|---|
| u_{\max} | Maximale Geschwindigkeitskomponente bei ebener Strömung | $[\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$ |
| u_{mittel}, v_m | Mittlere Geschwindigkeitskomponente bei ebener Strömung | $[\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$ |
| $u(y)$ | Geschwindigkeitskomponente in Höhe y bei ebener Strömung | $[\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$ |
| \dot{V}_A | Volumenstrom | $[\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}]$ |
| ν | Kinematische Viskosität | $[\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}]$ |
| η | Dynamische Viskosität | $[\text{N} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}]$ |
| τ_w | Wandschubspannung | $[\text{N} \cdot \text{m}^{-2}]$ |
| b | Breite der Kammer | $[\text{m}]$ |
| a | Kammerhalbhöhe | $[\text{m}]$ |
| D_g | Gleichwertiger Durchmesser | $[\text{m}]$ |
| h | Kammerhöhe | $[\text{m}]$ |
| Re | Reynolds-Zahl | $[-]$ |

2.9 Analytik zur Zellkultur

2.9.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung ist die wichtigste Messung zur Kontrolle eines Kultivierungsverlaufes, da sie in Verbindung mit anderen ermittelten Variablen die Berechnung von zell-spezifischen Parametern erlaubt. Aussagen über das Wachstumsverhalten der Zellen lassen sich aus dem zeitlichen Verlauf dieser Größe ableiten.

Die Zellzählung der jeweiligen Kulturen wurde in der Regel einmal pro Tag durchgeführt.

Es wurde eine Zellprobe aus dem Kultursystem entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (vgl. Lindl und Bauer, 1994). Trypanblau (0,5% w/v, SERVA) diente zur selektiven Anfärbung von toten (nekrotischen) Zellen. Dieser Farbstoff kann die Membran lebender Zellen nicht durchdringen, so daß diese im Lichtmikroskop als durchsichtig hellgelb erscheinen, während blau gefärbte Zellen eine defekte Zellmembran besitzen und damit als tot gezählt werden. Die Proben wurden je nach Zellkonzentration zu gleichen oder mehrfachen Teilen mit Trypanblau verdünnt.

Die verwendete CHO-IE Zelllinie neigte unter serumfreien Bedingungen zur Aggregatbildung (Sphäroide), so daß eine Lebendzellzahlbestimmung in vielen Fällen mit nur einer Zählung nicht möglich war. Deshalb wurde eine Differenzbestimmung durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Totzellzahl durch die Trypanblaumethode bestimmt. Im zweiten Schritt wurde mit einer Citrat-Lösung die Integrität der Plasmamembran zerstört, so daß mittels Kristallviolett (0,08 % w/v Kristallviolett in 0,1 M Citrat) die Kerne zur Gesamtzellzahlbestimmung angefärbt werden konnten. Für die Kristallviolettfärbung wurden 500 µL Zellsuspension 2 min bei 1000-g abzentrifugiert, der Überstand vollständig abgesaugt und das Zellsediment je nach Konzentration in gleichen oder mehrfachen Teilen der Kristallviolettlösung resuspendiert. Die Proben wurden bei 37°C unter Schütteln für mindestens 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die vereinzelt Kerne in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Die Zellkonzentrationen der adhären wachsenden Zellen wurde jeweils nach Trypsinisierung ermittelt.

2.9.2 Bestimmung des Zelldurchmessers mit CASY

Für eine Berechnung der theoretischen Geschwindigkeit der Fluidelemente, die die mit dem Zellayer interagierenden HL-60 Zellen in der Fließkammer überströmten, war die Ermittlung des mittleren HL-60-Zelldurchmessers notwendig. Dieser definierte die Höhe über dem Grund und somit das betreffende Fluidelement in dem Strömungsprofil.

Die Messung der HL-60-Zellgrößenverteilung erfolgte mit dem „Cell Counter and Analyser System“ (CASY[®] 1, Modell TCC, SCHÄRFE, Reutlingen). Das System arbeitete nach dem Widerstandsmeßprinzip kombiniert mit dem Verfahren der Pulsflächenanalyse (Schärfe, 1988). Ein Zellprobenvolumen von 100 µL wurde in mikrofiltriertem physiologischen Puffer (CASYton, SCHÄRFE) 1:100 vorverdünnt und durch eine Meßkapillare in ein Präzisionssteigrohr gesaugt. Die Kapillare des CASY[®] hatte einen Durchmesser von 150 µm. Die Messungen wurden mit einer 0-50 µm-Kalibrierungsdatei durchgeführt. Dabei teilte das Gerät diesen Partikelgrößenbereich in 1024 Kanäle ein, deren Meßergebnisse grafisch als gemessene Partikelanzahl pro Kanal über dem zugehörigen Durchmesser ausgegeben wurden. Unterhalb der Meßgrenze von 3,37 µm wurde Software-bedingt stets ein Nullsignal angezeigt.

Die Meßeinheit bestand aus zwei Elektroden, die über die Kapillare ein definiertes elektrisches Feld aufbauten. Da HL-60 Zellen aufgrund ihrer Lipiddoppelschicht der Zellmem-

bran einen Isolator darstellten, erhöhte sich der Widerstand bei ihrem Durchtritt. Im Falle defekter Zellmembranen hingegen stand das Cytosol dieser Zellen mit dem CASYton-Puffer in leitender Verbindung. Das Gerät maß dann das nächstkleinere intakte Membrankompartiment, das zu einer Widerstandserhöhung führte (Zellkern mit dem Endoplasmatischen Reticulum). Einzelne Membranstücke und Partikel führten ebenfalls zu einer ihrer Größe entsprechenden Widerstandserhöhung, wurden aber nicht berücksichtigt, sofern ihr Durchmesser unter der Ausschlußgrenze von 3,37 μm lag.

Das Meßsignal der Elektroden wurde mit einer Frequenz von 1 MHz durch das System aufgenommen, so daß eine Zelle auf ihrem Weg durch die Meßeinheit mehrere hundert mal vermessen wurde. Die Daten wurden digitalisiert und über eine Pulsflächenanalyse ausgewertet. Der in das System integrierte Personal-Computer berechnete zusätzlich zu der Ausgabe der Größenverteilung der Zellen verschiedene statistische Daten wie Angaben über die Zellvolumina und die Zellkonzentration.

Zur Messung wurden jeweils dreimal 400 μL der 1:100 verdünnten Zellsuspension eingesaugt und die enthaltenen Partikel vermessen. Vor der Messung erfolgte eine Kontrolle der Partikelreinheit des Systems durch Einsaugen und Messen einer Pufferprobe.

2.9.3 Bestimmung der LDH-Aktivität

Lactatdehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) ist ein cytosolischer Enzymkomplex aus vier globulären Untereinheiten, den M- und H-Monomeren, die je nach Zelltyp in unterschiedlichem stöchiometrischen Verhältnis zueinander aggregiert sind (Groß *et al.*, 1989). Das Enzym reduziert Pyruvat reversibel mit Hilfe des Coenzym NADH + H⁺ zu Lactat, wobei NAD⁺ generiert wird. Diese Reaktion tritt bei Zellen höherer Organismen auf, wenn der Sauerstoffgehalt der begrenzende Faktor ist (Stryer, 1990).

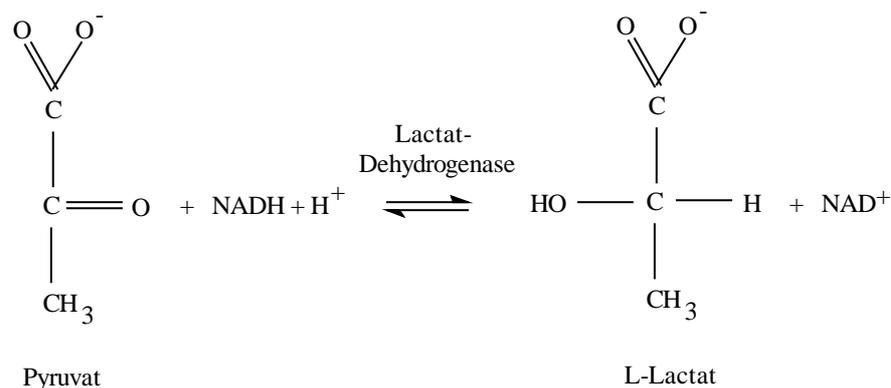


Abbildung 2.12: Katalysierte Reaktion der LDH.

Die Oxidation von NADH zu NAD⁺ hat eine typische Veränderung der UV-Absorption des Moleküls zur Folge, die photometrisch nachgewiesen werden kann. NADH hat bei einer Wellenlänge von 339 nm ein Absorptionsmaximum, NAD⁺ absorbiert kein Licht dieser Wellenlänge. So entspricht die lineare Abnahme der Extinktion bei 339 nm während der Meßzeit der Reaktionsgeschwindigkeit. Bei Substratsättigung ohne inhibitorische Einflüsse

ist deshalb die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymkonzentration proportional, wenn die Enzymkonzentration klein gegenüber der Substratkonzentration ist (Chmiel, 1991).

Da es sich um ein cytosolisches Enzym handelt, deutet sein Nachweis im Medium auf Zellmembrandefekte oder Zellyse hin. Deshalb wird es als Markerenzym verwendet, um indirekt das Absterben von Zellen in einer Kultur zu messen.

Folgende Lösungen werden benötigt:

Tabelle 2.10: Lösungen für den Reaktionsansatz.

| | | |
|--|---------------|-----------------------|
| Reaktionspuffer | 30 mM, pH 7,4 | |
| Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | | 8,7 g/L |
| NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O | | 0,93 g/L |
| NADH-Lösung | 2,7 mM | (BOEHRINGER Mannheim) |
| NADH | | 9,5 mg/ 5mL |
| Pyruvat-Lösung | 10 mM | (SERVA, Heidelberg) |
| Na-Pyruvat | | 0,87 g/L |

Zur Messung wird folgender Ansatz in einer Quarzküvette hergestellt:

Tabelle 2.11: Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung der LDH.

| | |
|--------|---|
| 100 µL | zellfreier Kulturüberstand (evtl. 1:10 mit Reaktionspuffer vorverdünnt) |
| 100 µL | Na-Pyruvat (10 mM) in Reaktionspuffer |
| 700 µL | Reaktionspuffer |
| 100 µL | NADH (2,7 mM) in Reaktionspuffer |

Die lineare Extinktionsabnahme wird über einen Zeitraum von einer Minute mit einer Meßaufnahmerate von 50 Messungen pro Minute mit einem Spektrophotometer (Uvicon 930 mit Software 8939; KONTRON, Neufahrn) bei einer Wellenlänge von 340 nm aufgenommen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Extinktion proportional der Konzentration der absorbierenden Substanzen und der Schichtdicke der absorbierenden Lösung. Unter der Berücksichtigung, daß die Konzentrationsänderung des Substrates pro Zeiteinheit die Aktivität des Enzyms wiedergibt, ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Enzymaktivität (Wilson und Goulding, 1991):

$$v = \frac{\Delta E}{d \cdot \epsilon \cdot \Delta t} \cdot \frac{V_{\text{Gesamt}}}{V_{\text{Probe}}}$$

mit

$$v : \text{ Reaktionsgeschwindigkeit } [\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}] = [\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}] = [6 \cdot 10^7 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}]$$

ΔE : Extinktionsdifferenz

d : Küvetten-Schichtdicke [cm]

ε : molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm: $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Δt : Meßzeit [s]

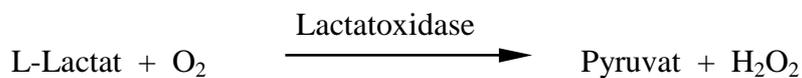
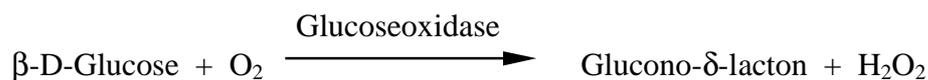
V_{Gesamt} : Gesamtvolumen in der Küvette [mL]

V_{Probe} : Probevolumen [mL]

2.9.4 Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentrationen

Die Glucosebestimmung ist eine der wichtigsten Substratbestimmungen in der Zellkulturtechnik, da Glucose ein energielieferndes Molekül ist, das in die Glykolyse eingeht. Lactat stellt ein Stoffwechselendprodukt dar und kann in hohen Konzentrationen toxisch wirken. Die Glucose- und Lactatkonzentrationen wurden enzymatisch mit Hilfe der beiden Enzyme Glucose- und Lactatoxidase bestimmt, die an Membranen innerhalb einer Meßkette immobilisiert waren.

Die Enzyme setzen Glucose bzw. Lactat nach folgenden Gleichungen um:



Die Messung erfolgte mit einem Glucose-Lactat-Analyser (YSI 2700 Select, YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS, Ohio), der parallel die Glucose- und Lactatkonzentration einer Probe mit zwei verschiedenen Meßsonden bestimmte. Die Sonden waren jeweils mit drei Membranen unterschiedlicher Permeabilität bestückt. Die äußere Membran bestand aus Polycarbonat und diente zur Rückhaltung von Zelltrümmern und hochmolekularen Substanzen. Die mittlere Membran trug die immobilisierten Enzyme. Die innere Membran aus Celluloseacetat hatte eine Ausschlußgrenze von 200 Da, und war damit impermeabel für die Reaktionsprodukte der Oxidasen (Glucono- δ -lacton und Pyruvat), wohl aber permeabel für H_2O_2 . Das Wasserstoffperoxid diffundierte durch die letzte Membran und wurde durch Amperometrie erfaßt, indem es an der Platin-Anode oxidiert wurde. Der Stromfluß ist der lokalen H_2O_2 -Konzentration und somit der Glucose- bzw. Lactatkonzentration proportional.

Der halbautomatische Analyser benötigte für eine Messung 50 μL zellfreien Kulturüberstand und gab die ermittelten Konzentrationen innerhalb von einer Minute in der Dimension g/L aus. Die Zellsuspensionen wurden vor der Messung 2 min bei 1000-g abzentrifugiert und nur der Überstand zur Messung verwendet, um die Meßsonden nicht mit Zellen oder Zelltrümmern zu verunreinigen.

2.9.5 Quantitative Bestimmung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen

Der Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen im Medium kommt neben der Glucosekonzentrationsbestimmung eine tragende Rolle zu. Aminosäuren besitzen eine universelle Bedeutung als Stickstoffdonatoren, als Energiesubstrate sowie als Bausteine für die Synthese von Proteinen. In den meisten Fällen zeigt sich eher eine Korrelation zwischen sinkender Produktivität der Zellen mit einer oder mehreren limitierenden Aminosäuren als mit einer absinkenden Glucosekonzentration (Büntemeyer, 1988).

Für die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen wurde die Umkehrphasen- (engl.: reversed phase) HPLC (engl.: High Performance Liquid Chromatography) angewendet. Als stationäre Phase diente ein Silicamaterial, an das über eine Organo-Siliziumbindung eine lange Kohlenwasserstoffkette gebunden wurde (Kromasil C₁₈ ODS d_p=5 µm, L=125 mm, d_i=4,6 mm). Die stationäre Phase war vollkommen unpolar, und die Trennung erfolgte aufgrund hydrophober Interaktionen. Die mobile Phase bestand aus einem binären Puffersystem das durch stetige Veränderung des Mischungsverhältnisses von einem polaren zu einem unpolaren Charakter wechselte. Das Verhältnis des polaren Puffers A zu dem unpolaren Puffer B wurde nach einem Gradientenprofil vollautomatisch von der HPLC-Anlage (D 450-Mt2, KONTRON) eingestellt.

Um die Aminosäuren im UV-Licht detektierbar zu machen, wurden sie vor dem Säulenauftrag mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert. Dabei reagieren primäre Aminogruppen im alkalischen Milieu (pH > 9) mit OPA und 3-Mercaptopropionsäure in einer Zyklisierungsreaktion zu instabilen, aber fluoreszenzfähigen Isoindolderivaten (siehe Abbildung 2.13). Diese wurden nach ihrer Trennung durch eine Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm im Fluoreszenzdetektor (SFM 25, KONTRON) detektiert.

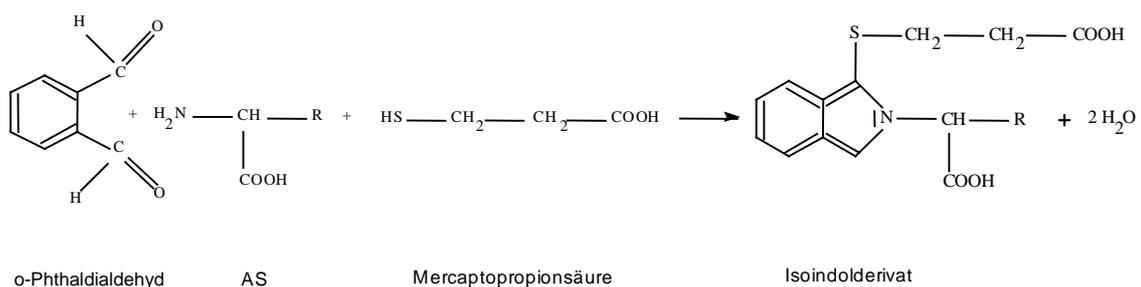


Abbildung 2.13: Derivatisierung von Aminosäuren mit o-Phthaldialdehyd

Folgende Lösungen werden für die Aminosäureanalyse benötigt:

Tabelle 2.12: Lösungen für die Aminosäureanalyse.

| Bestandteil | Zusammensetzung |
|--------------------------|--|
| Derivatisierungsreagenz: | 50 mg o-Phthaldialdehyd in 1 mL Methanol p.a. 100 µL 3-Mercaptopropionsäure 9 mL 0,6 M Boratpuffer, pH 10,4 |
| Puffer A: | 89 % 0,1 M Na-Acetat, pH 7,5 10 % Methanol p.a. 1 % Tetrahydrofuran p.a. |
| Puffer B: | 15 % 0,1 M Na-Acetat, pH 5,2 85 % Methanol p.a. |
| Proteinfällungsreagenz: | 5 % Perchlorsäure 300 µM δ-Aminovaleriansäure (interner Standard) |

Die Zellkultursuspensionen wurden zunächst bei 116-g für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen, um die Zellen abzutrennen. 50 µL dieses Überstandes wurden einer Proteinfällung mit 50 µL 5%iger Perchlorsäure unterzogen. Das ausgefallene Protein wurde drei Minuten bei 15000-g (HERAEUS Sepatech, Biofuge A) abzentrifugiert und 50 µL des Überstandes mit 100 µL Natriumboratpuffer (0,4 M, pH 9,5) mit Hilfe eines Vortexers vermischt. Nur ein pH-Wert größer als 9 ermöglichte eine anschließende Derivatisierung der Aminosäuren nach der OPA-Methode. Es wurden 20 µL der Lösung in ein Probengefäß gefüllt und der Chromatographielauf gestartet.

2.9.6 Antikörpernachweis mit der ELISA-Methode

Der quantitative Nachweis des CSLEX-Antikörpers bzw. des E-Selektin-IgG-Proteins erfolgte mit Hilfe des ELISA-Testes (engl.: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der antigenunabhängige Sandwich-ELISA (siehe Abbildung 2.14) und der antigenabhängige indirekte ELISA angewendet. Im Sandwich-ELISA wurde das zu bestimmende Protein zwischen zwei Antikörper gebunden, von denen der zuletzt gebundene Enzym-konjugiert war. Für diesen Test war das Antigen für den nachzuweisenden Antikörpers nicht notwendig. Zur Funktionsüberprüfung der Bindungsaktivität zwischen dem produzierten Antikörper bzw. E-Selektin-IgG und seinem Antigen bzw. Liganden wurde der Primärantikörper durch humane Granulocytenganglioside ersetzt.

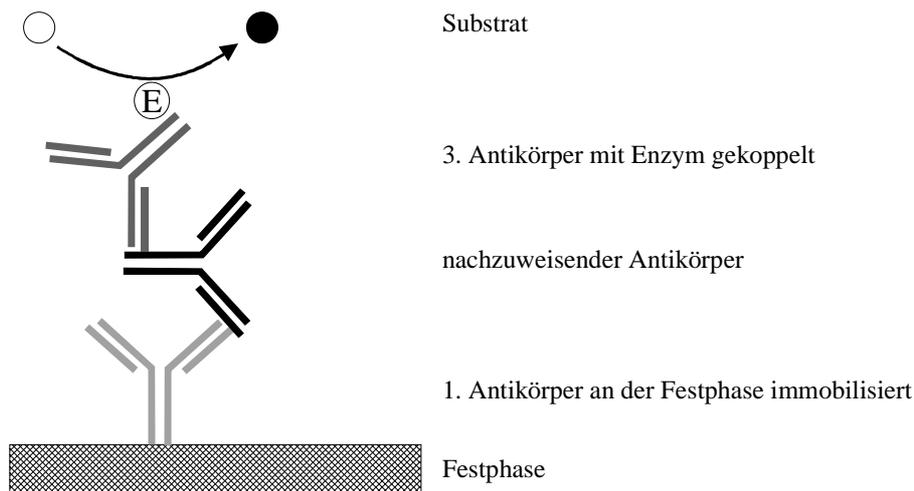
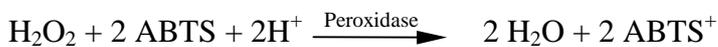


Abbildung 2.14: Prinzip des Sandwich-ELISA.

Im Sandwich-ELISA wurde der Primärantikörper gegen das nachzuweisende Protein im ersten Schritt an die feste Phase - eine Mikrotiterplatte (Immuno Plate Maxi Sorp, NUNC) - gebunden. Danach wurde das E-Selektin-IgG bzw. der CSLEX-Antikörper zupipettiert. Nachgewiesen wurde dieser Komplex, indem die Peroxidase bzw. die alkalische Phosphatase des Sekundärantikörpers ihre Substrate in einer Farbreaktion enzymatisch umsetzten. Als Substrat der Peroxidase wurde ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethylthiazolin-sulfonat(6)]) eingesetzt, das in folgender Reaktion zu dem stabilen ABTS-Radikalkation (ABTS^+) umgesetzt wurde:



Das Radikalkation hat Absorptionsmaxima bei 650 und 414 nm und erschien im sichtbaren Licht als grüner Farbstoff. Die Extinktion der Verbindung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$ photometrisch mit einem ELISA-Reader (BIO-TEK Instr., EL_X 808) erfaßt. Als Substrat der alkalischen Phosphatase wurde di-Natrium 4-Nitrophenylphosphat eingesetzt, dessen Umsatzprodukt 4-Nitrophenol ebenfalls bei 405 nm vermessen wurde. Aufgrund des kleinen Antigenanteils aus den CH2 und CH3-Domänen des E-Selektin-IgG-Proteins wurden als Primär- und Sekundärantikörper für diesen Nachweis keine kompletten Antikörpermoleküle, sondern nur die antigenbindenden F_{ab}-Anteile verwendet. Somit konnte eine sterische Behinderung verhindert werden.

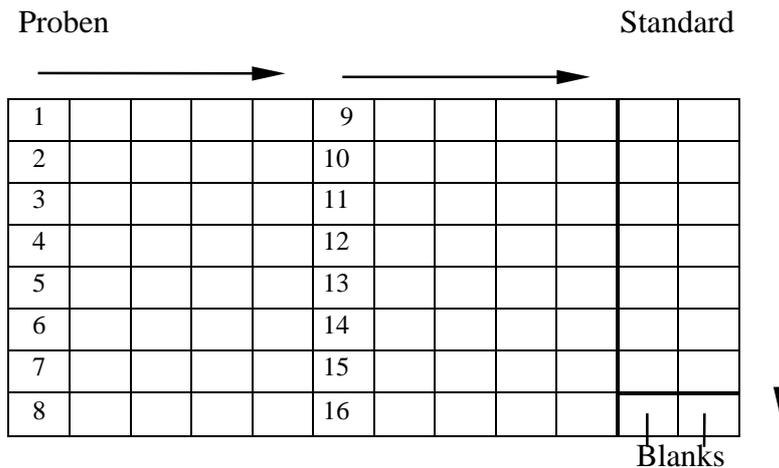


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der Probenbelegung auf der ELISA-Mikrotiterplatte.

Da die Reaktion nicht abgestoppt wurde, konnte die Zunahme der Extinktionswerte über einen längeren Zeitraum verfolgt werden. Zur Konzentrationsberechnung wurde ein interner Standard in einer Verdünnungsreihe mitgeführt (siehe Abbildung 2.15). Im Falle des CSLEX-Nachweises war dies ein aus Zellkulturüberstand aufgereinigter monoklonaler κ -IgM-Antikörper (DIANOVA). Für den E-Selektin-IgG-Nachweis diente humanes IgG (SIGMA) als Standard.

Die Antikörperbestimmung im Sandwich-ELISA gliederte sich in neun Arbeitsschritte.

Tabelle 2.13: Arbeitsschritte zur Durchführung des Sandwich-ELISA-Tests zum Nachweis des E-Selektin-IgGs.

1. Binden des Primärantikörpers an der Mikrotiterplatte:
100 μ L Beschichtungspuffer mit einer 1:1000-Verdünnung des Kaninchen anti human-IgG ($F_c\gamma$) (DIANOVA) F_{ab} -Antikörpers in jedes well vorlegen und ü.N. bei 4°C inkubieren
2. Absättigen freigebliebener Bindungsstellen der Platte:
100 μ L Absättigungslösung in jedes well aufschichten, 30 min bei Raumtemperatur schütteln
3. Waschen zur Entfernung nicht gebundener Antikörper bzw. des Absättigers:
5x waschen (Microplate Washer ELP-40, BIO-TEK INSTRUMENTS) und anschließend ausklopfen
4. Auftragen der zu bestimmenden E-Selektin-IgG-Proben und des Standard-Antikörpers:
100 μ L PBS-Blau in jedes well vorlegen, Standard 1:2500 in PBS-Gelb vorverdünnen und in Standardreihe auftragen, Blanks nur mit 100 μ L PBS-Blau befüllen
100 μ L der in PBS-Gelb vorverdünnten Proben in die vorgesehenen wells einpipettieren und mit der 12-Kanalpipette (Titertek) je 1:2 weiterverdünnen
5. Waschen zur Entfernung des nicht gebundenen Probenantikörpers:
Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur erneut 5x waschen und ausklopfen

6. Binden des enzymgekoppelten Sekundärantikörpers an das E-Selektin-IgG und den Standardantikörper:
100 µL Konjugatlösung mit 1:20000 verdünntem Peroxidase-konjugierten Ziege anti human-IgG (F_cγ)
F_{ab}-Antikörpers in jedes well pipettieren
7. Waschen zur Entfernung der nicht gebundenen, enzymgekoppelten Antikörper:
Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur 5x waschen und ausklopfen
8. Auftragen des Substrates zum Start der Enzymreaktion (Farbreaktion):
100 µL ABTS-Substratlösung in jedes well einpipettieren, 20 min auf Schüttler inkubieren
9. Bestimmung der Extinktion:
Mikrotiterplatte in den ELISA-Reader legen und Messung starten, nach jeweils 10 min erneut messen,
bis sich die Extinktionen im auswertbaren Bereich befinden

Folgende Reagenzien wurden für den ELISA-Test benötigt:

Tabelle 2.14: Lösungen und Antikörper für den Sandwich ELISA-Test zum E-Selektin-IgG Nachweis.

| Bestandteil | Zusammensetzung |
|---------------------------|---|
| Beschichtungspuffer: | 4,29 g Na ₂ CO ₃ · 10 H ₂ O 2,93 g NaHCO ₃ auf 1 L dest. H ₂ O, pH 9,4 |
| Absättiger: | 5% BSA (azidfrei) in 0,137 M Phosphatpuffer |
| Phosphatpuffer (0,137 M): | 13,7 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 9,3 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O auf 1 L dest. H ₂ O, pH 7,0 |
| PBS-Gelb: | 2,77 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 0,34 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 8,75 g NaCl 0,1 g Tartrazin (SERVA 35754) auf 1 L dest. H ₂ O, pH 7,2 |
| PBS-Blau: | 0,44 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 0,13 g NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O 8,75 g NaCl 1,8 g BSA 1,65 g Chloramphenicol (SIGMA C-0378) 0,034 g Neomycinsulfat (SIGMA N-1876) 0,1 g Alphazurine A (EGA 19814-5) 0,5 mL Tween 20 auf 1 L dest. H ₂ O, pH 7,2 |
| Waschlösung: | 0,05 % Tween 20 in dest. H ₂ O |
| PBS/Tween: | 0,44 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 0,13 g NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O |

| | |
|----------------------|--|
| | 8,7 g NaCl |
| | 0,5 mL Tween 20 |
| | auf 1 L dest. H ₂ O pH 6,7 |
| Konjugatlösung: | 5 mL PBS/Tween |
| | 5 mL BSA 5% (azidfrei) |
| ABTS-Substratpuffer: | 0,94 g NaBO ₃ · 4 H ₂ O |
| | 0,83 g Citric-monohydrat |
| | 21,47 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O |
| | auf 1 L dest H ₂ O, pH 4,5 |
| ABTS-Substrat: | ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethyl-benzthialozin-sulfonat(6)]) (BOEHRINGER Mannheim) |
| Substratlösung: | 27,4 mg ABTS auf 25 mL Substratpuffer |

Für den Nachweis des CSLEX-Antikörpers im Sandwich-ELISA ergeben sich folgende Änderungen:

Tabelle 2.15: Unterschiede des CSLEX-ELISAs zum E-Selektin-IgG Nachweis.

| | |
|----|--|
| 1. | Binden des Primärantikörpers an der Mikrotiterplatte: 100 µL Beschichtungspuffer mit einer 1:250-Verdünnung des Ratte IgG anti Maus-IgM (PHARMINGEN) Antikörpers in jedes well vorlegen und ü.N. bei 4°C inkubieren |
| 4. | Auftragen der zu bestimmenden CSLEX-Proben und des Standard-Antikörpers: 100 µL PBS-Blau in jedes well vorlegen, Standard 1:2500 in PBS-Gelb vorverdünnen und in Standardreihe auftragen, Blanks nur mit 100 µL PBS-Blau befüllen 100 µL der in PBS-Gelb vorverdünnten Proben in die vorgesehenen wells einpipettieren und mit der 12-Kanalpipette (Titertek) je 1:2 weiterverdünnen |
| 6. | Binden des enzymgekoppelten Sekundärantikörpers an den CSLEX- und den Standardantikörper: 100 µL Konjugatlösung mit 1:1000 verdünntem, mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Ratte anti Maus-IgM Antikörpers (PHARMINGEN) in jedes well pipettieren |
| 8. | Auftragen des Substrates zum Start der Enzymreaktion (Farbreaktion): 100 µL 4-Nitrophenyl-Substratlösung in jedes well einpipettieren, 20 min auf Schüttler inkubieren |

Tabelle 2.16: Unterschiede der Lösungen für den CSLEX-Nachweis im Sandwich-ELISA.

| Bestandteil | Zusammensetzung |
|---|--|
| 4-Nitrophenyl-Substratpuffer: (Glycinpuffer) | 100 mM Glycin 1 mM ZnCl ₂ , auf pH 10,4 einstellen |
| 4-Nitrophenyl-Substrat: | Di-Natrium-4-Nitrophenylphosphat Hexahydrat |
| Substratlösung: | 16 mM in 4-Nitrophenyl-Substratpuffer |

Der indirekte antigenabhängige ELISA ist in den ersten vier Schritten durch Änderungen gegenüber dem Sandwich-ELISA gekennzeichnet.

Tabelle 2.17: Unterschiede des indirekten ELISAs zum Sandwich-ELISA.

| | |
|----|--|
| 1. | Binden des Antigens an der Mikrotiterplatte: Reihe ansteigender Volumina aber gleicher Konzentration humaner Granulocytinganglioside in Methanol/Wasser (2/1) vorlegen und ü.N. bei Raumtemperatur eintrocknen |
| 2. | Absättigen freigebliebener Bindungsstellen der Platte: Keine Absättigung |
| 3. | Waschen zur Entfernung nicht gebundener Antikörper bzw. des Absättigers: Kein Waschen |
| 4. | Auftragen der zu bestimmenden E-Selektin-IgG- bzw. der CSLEX-Proben: 100 µL der gleichkonzentrierten Proben in die vorgesehenen wells einpipettieren (alternativ können auch die Proben in einer Verdünnungsreihe aufgetragen werden, dann muß in Schritt 1 in jedes well die gleiche Menge Antigen pipettiert werden) |

2.9.7 Gelelektrophorese zur Kontrolle der Proteinexpression

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der differenzierten Wanderung von Ionen in einem elektrischen Feld. Viele biologischen Moleküle, wie z.B. Aminosäuren, Peptide, Proteine, Nucleotide und Nucleinsäuren tragen ionisierbare Gruppen und können deshalb in Lösung als elektrisch geladene Verbindungen - Kationen oder Anionen - vorliegen. Die Kontrolle der Proteinexpression des CSLEX-Antikörpers und des E-Selektin-IgG-Moleküls wurde mittels Gelelektrophorese durchgeführt, die besonders für die Trennung von hochmolekularen Substanzen, wie Proteinen und Nucleinsäuren geeignet ist. Die physikalischen Eigenschaften der Gele, die aus pulverförmigen Vorstufen (Stärke, Agar und Polyacrylamid) hergestellt werden und wasserschwerlösliche, aber hydrophile halb feste Kolloide sind, ermöglichen durch Molekularsiebeeigenschaften die Trennung von Molekülen ähnlicher Ladung, aber unterschiedlicher Größe und Form (Wilson und Goulding, 1991). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit Fertiggelen im PhastSystem (AMERSHAM PHARMACIA Biotech) durchgeführt, die im folgenden erläutert werden. Die vorgefertigten Gele, bei denen Polyacrylamid als Trägermedium dient, das durch radikalische Copolymerisation von Acrylamid und dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid nach Zugabe von Ammoniumpersulfat und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED) entsteht, haben den Vorteil der homogenen Qualität und garantieren somit eine gute Reproduzierbarkeit der Elektrophoresen.

2.9.7.1 Native Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese trennt die Proteine aufgrund ihrer Ladung, ihrer Molekularmassen sowie ihrer Konformation. Eine genaue Molekulargewichtsbestimmung im Gel ist somit nicht möglich. Durch das Fehlen des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) gewährleistet sie jedoch eine Kontrolle der strukturellen Integrität des aus mehreren Aminosäureketten aufgebauten Antikörpers CSLEX. Die Nettoladung dieses Proteins richtet sich dabei nach dessen isoelektrischen Punkt sowie dem pH-Wert des verwendeten Puffers und ist in einem Bereich von pH 8-9 negativ, so daß es zur Anode wandert. Die Trennung erfolgte in Gradientengelen (4-15%) mit einem Trennbereich von 150-1000 kDa unter Verwendung von „nativen“-Pufferstreifen (3% Agarose, 0,88 M L-Alanin, 0,25 M Tris, pH 8,8). Mit einem Applikatoramm wurden 5 µL/Probe und ein Molekulargewichtsstandard (HMW-Nativ-Standard, engl.: high molecular weight; AMERSHAM PHARMACIA Biotech, siehe Tabelle 2.18) aufgetragen, der eine ungefähre Abschätzung der Molekulargewichtsbereiche zuließ.

Tabelle 2.18: Proteine und Molekulargewichte des HMW-Nativ-Standards.

| Markerprotein | Molekulargewicht [kDa] |
|----------------------|------------------------|
| Albumin | 67 |
| Laktat-Dehydrogenase | 140 |
| Katalase | 232 |
| Ferritin | 440 |
| Thyroglobulin | 669 |

Die verwendeten Programmeinstellungen für die native Gelelektrophorese sind in Tabelle 2.19 aufgeführt.

Tabelle 2.19: Programmschritte für die native Gelelektrophorese.

| Programmschritt | Einstellung |
|-----------------------|-------------------------------|
| 1. Probenauftrag | 2 Vh |
| 2. Trennung Schritt 1 | 400 V 10 mA 2,5 W 15°C 10 Vh |
| 3. Trennung Schritt 2 | 400 V 1 mA 2,5 W 15°C 2 Vh |
| 4. Trennung Schritt 3 | 400 V 10 mA 2,5 W 15°C 108 Vh |

Die Detektion der aufgetrennten Proteine wurde durch Anfärbung mit Silbernitrat durchgeführt (Heukeshoven and Dernick, 1988). Dabei bildet das Ag⁺-Ion Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Eine Zugabe von Formaldehyd reduziert das Ag⁺ der Komplexe zu Ag. Mit dem Einsatz von Thiosulfat beim Reduktionsschritt kann die Nachweisgrenze auf 50 bis 100 pg Protein/Bande gesteigert werden (Rehm, 1996). Aufgrund der Aminosäure-abhängigen Intensität der Färbung sind die Proteinbanden jedoch nicht quantifizierbar. Die benötigten Lösungen sind in Tabelle 2.20 aufgeführt.

Tabelle 2.20: Lösungen und Ablauf der Silberfärbung (nach Heukeshoven und Dernick, 1988).

| Lösung | Zusammensetzung | t [min] | T [°C] |
|------------------|---|---------|--------|
| 1. Fixierer 1 | 80 mL Reinstwasser + 120 mL Methanol, mit Trichloressigsäure (20% w/v) auf 400 mL auffüllen | 0,5 | 25 |
| 2. Fixierer 2 | 30% Ethanol + 10% Eisessig + 60% Reinstwasser | 0,4 | 50 |
| 3. Fixierer 2 | Wie Schritt 2 | 4,0 | 50 |
| 4. Conditioner | 30 mL Ethanol + 10 mL Natriumacetat (4 M) + 0,5 mL Eisessig + 10 mL Glutardialdehyd (5%) + 0,2 g Natriumthiosulfat, mit Reinstwasser auf 100 mL auffüllen | 7,0 | 40 |
| 5.-7. Waschen | Reinstwasser | 3,0 | 50 |
| 8.-9. Waschen | Reinstwasser | 4,0 | 50 |
| 10. Versilberer | 50 mL Silbernitratlösung (0,4% w/v) + 50 µL Formaldehyd (37% w/v), mit Reinstwasser auf 200 mL auffüllen | 8,0 | 40 |
| 11. Versilberer | Wie Schritt 10 | 2,0 | 25 |
| 12. Entwickler | 200 mL Natriumcarbonat (2,5% w/v) + 50 µL Formaldehyd (37% w/v) | 0,4 | 30 |
| 13. Entwickler | Wie Schritt 12 | 4,0 | 50 |
| 14. Stopbad | 50 mM EDTA (Na-Salz) in Reinstwasser | 2,0 | 50 |
| 15. Waschen | Reinstwasser | 3,0 | 50 |
| 16. Konservierer | 10% Glycerin (97% w/v) in Reinstwasser | 4,0 | 0,4 |
| 17. Waschen | Reinstwasser | 0,4 | 25 |

2.9.7.2 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese eignet sich als Methode zur Auftrennung eines Proteingemisches mit einhergehender Molekulargewichtsbestimmung. Das Natriumdodecylsulfat ist ein anionisches Detergens, das stark an Proteine bindet und sie denaturiert. Im Überschuß zugegeben, binden etwa 1,4 g SDS/g Protein, so daß alle Proteine eine beständige negative Ladung pro Masseneinheit tragen. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern sie deshalb zur Anode. Infolge der Molekularsiebeigenschaften des Gels sind die Wanderungsstrecken pro Zeiteinheit dem dekadischen Logarithmus (\log_{10}) des Molekulargewichtes umgekehrt proportional. Mit einer Serie von Eichproteinen bekannten Molekulargewichtes ist eine Eichung und damit die Bestimmung der Molekulargewichte der Zielproteine möglich. Zur Kontrolle der E-Selektin-IgG Expression wurden Fertiggradientengele (8-25%, Gelpuffer: 0,112 M Acetat, 0,112 M Tris, pH 6,4) mit einem Trennbereich von 6-300 kDa und SDS-Pufferstreifen (3% Agarose, 0,2 M Tricin, 0,2 M Tris, 0,55% SDS, pH 8,1) verwendet. Die Proben wurden in nichtreduzierendem Probenpuffer (0,063 M Tris/HCl, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, pH 6,8) vorverdünnt und jeweils 1 µL/Probe appliziert. Als Molekulargewichtsstandard wurde der LMW (engl.: low molecular weight) Marker Kit (AMERSHAM PHARMACIA Biotech) verwendet (siehe Tabelle 2.21).

Tabelle 2.21: Proteine und Molekulargewichte des LMW-Standards.

| Markerprotein | Molekulargewicht [kDa] |
|-----------------------|------------------------|
| α -Lactalbumin | 14,4 |
| Trypsin-Inhibitor | 20,1 |
| Carboanhydrase | 30 |
| Ovalbumin | 43 |
| Albumin | 67 |
| Phosphorylase b | 94 |

Die angewendeten elektrophoretischen Trennbedingungen der SDS-Gelelektrophorese sind in Tabelle 2.22 aufgeführt.

Tabelle 2.22: Programmschritte für die SDS-Gelelektrophorese.

| Programmschritt | Einstellung | | | | |
|---|-------------|--------|-------|------|-------|
| 1. Probenauftrag und elektrophoretische Trennung | 150 V | 6,0 mA | 1,8 W | 15°C | 90 Vh |
| 2. Aufrechterhaltung der elektrophoretischen Trennung | 50 V | 0,1 mA | 0,5 W | 15°C | 0 Vh |

2.9.8 Berechnung der zellspezifischen Parameter

Die zellspezifischen Parameter ermöglichen, die Physiologie der Zellen zu charakterisieren und so Vergleiche des Wachstums-, Produktions- und Stoffwechselverhaltens mit anderen Zelllinien zu ziehen.

Die verwendeten Gleichungen sind im folgenden dargestellt (vgl.: Pirt, 1985):

Satzweise Prozeßführung

Berechnung des Zellwachstums (spezifische Wachstumsrate):

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad [\text{d}^{-1}]$$

Berechnung der Verdopplungszeit:

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [\text{d}]$$

Berechnung der spezifischen Substratumsatzrate (Substratverbrauchsgeschwindigkeit):

$$q_s = \frac{1}{x} \cdot \frac{dc_s}{dt} \quad [\text{mol} \cdot \text{Zellen}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}]$$

Berechnung der spezifischen Produktionsrate (Produktbildungsgeschwindigkeit):

$$q_p = \frac{1}{x} \cdot \frac{dc_p}{dt} \quad [\text{g} \cdot \text{Zellen}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}]$$

Perfusions-Prozeßführung

Berechnung des Zellwachstums (spezifische Wachstumsrate):

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} + D_E \quad [\text{d}^{-1}]$$

Berechnung der spezifischen Produktionsrate (Produktbildungsgeschwindigkeit):

$$q_p = \frac{1}{x} \cdot \frac{dc_p}{dt} + \frac{1}{x} \cdot D \cdot c_p \quad [\text{g} \cdot \text{Zellen}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}]$$

Tabelle 2.23 gibt die Größen zur Berechnung der zellspezifischen Parameter wieder:

Tabelle 2.23: Größen zur Berechnung der zellspezifischen Parameter.

| Größe | Bezeichnung | Einheit |
|------------|---|---|
| x | Lebendzelldichte | $[\text{Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}]$ |
| t | Zeit | $[\text{d}]$ |
| t_D | Verdopplungszeit | $[\text{d}]$ |
| μ | spezifische Wachstumsrate (spez. Wachstumsgeschwindigkeit) | $[\text{d}^{-1}]$ |
| q_s | spezifische Substratumsatzrate (spez. Substratverbrauchsgeschwindigkeit) | $[\text{mol} \cdot \text{Zellen}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}]$ |
| q_p | spezifische Produktionsrate (spez. Produktbildungsgeschwindigkeit) | $[\text{g} \cdot \text{Zellen}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}]$ |
| c_s, c_p | Substratkonzentration, Produktkonzentration | $[\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$ |
| D | Durchflußrate (Raumgeschwindigkeit) | $[\text{d}^{-1}]$ |
| D_E | Zellerterate (Zellerntegeschwindigkeit) | $[\text{d}^{-1}]$ |

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Produktion des CSLEX-Antikörpers

Die an serumfreies Medium adaptierten CSLEX-Zellen wurden zur Produktion des Antikörpers vom T-Flaschenmaßstab mit 20 mL Kulturvolumen und 80 cm² Grundfläche zunächst für 31 Tage in einem Spinner mit 100 mL Kulturvolumen expandiert. Mit Beendigung des 3. Batches am 7. Tag der Spinnerkultur wurde ein SuperSpinner anfangs mit 250 mL Volumen in einer Zellkonzentration von $3,6 \cdot 10^5$ Zellen/mL inokuliert (siehe Abbildung 3.1). Mit Erreichen einer Zellkonzentration von $1,39 \cdot 10^6$ Zellen/mL wurde das Kulturvolumen im SuperSpinner zunächst auf 500 mL und ab dem 9. Batch auf 1 L gesteigert. Mit Zellen des 11. Batches wurde ein 5 L-Bioreaktor mit Zellen aus dem SuperSpinner in einer Konzentration von $3,25 \cdot 10^5$ Zellen/mL und einem Volumen von 4,9 L inokuliert (siehe Abbildung 3.2).

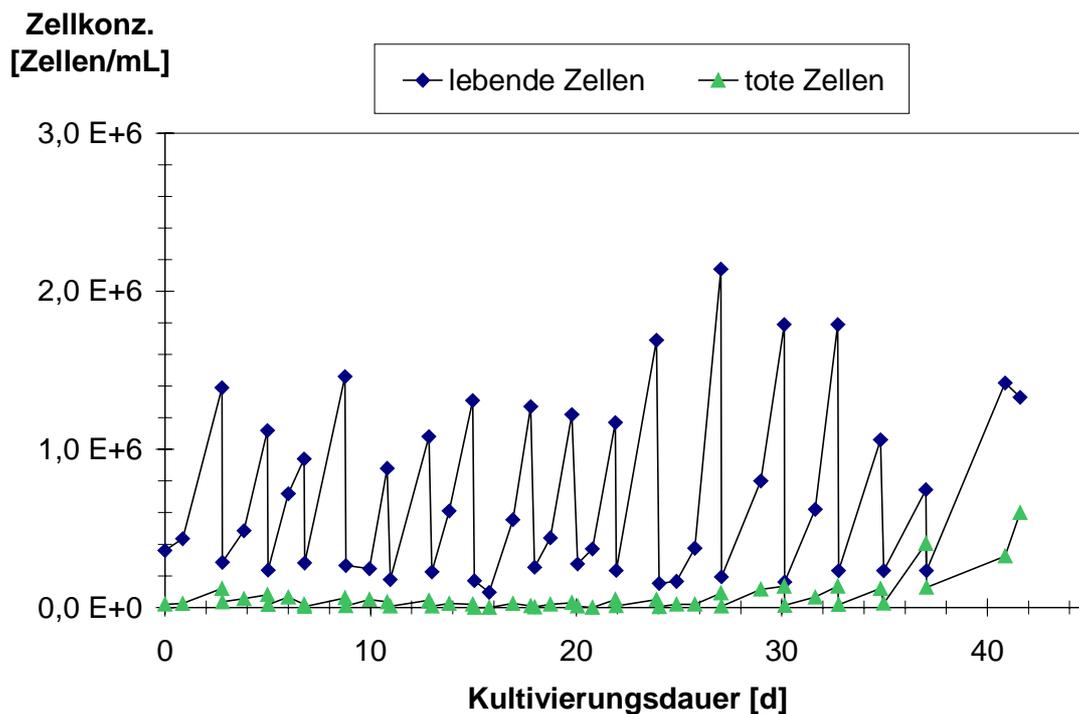


Abbildung 3.1: Verlauf der Lebend- und Totzellkonzentrationen der CSLEX-SuperSpinnerkultur.

Im Verlauf der Kultivierung im SuperSpinner lagen die erreichten maximalen Lebendzellkonzentrationen der einzelnen Batches zwischen $7,5 \cdot 10^5$ und $2,14 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Innerhalb der letzten zwei Ansätze stieg nach einem nächtlichen CO₂-Begasungsausfall die Totzellkonzentration auf $6,0 \cdot 10^5$ Zellen/mL an und die Viabilität sank von durchschnittlich 94,8% (sd 3,4%) auf 68,9%. Daraufhin wurde die Kultivierung beendet.

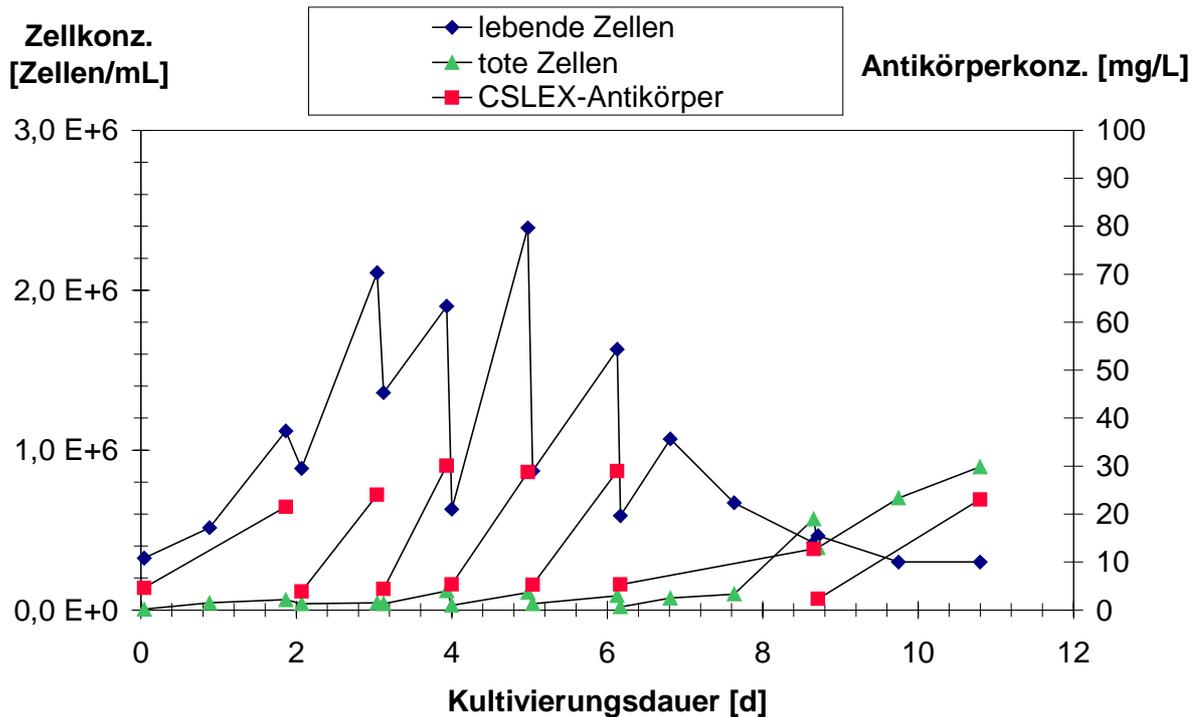


Abbildung 3.2: Verlauf der Lebend- und Totzellkonzentrationen sowie der Antikörperkonzentration der CSLEX-5 L-Bioreaktorkultur.

Die Kultivierung im 5 L-Bioreaktor wurde in sieben Ansätzen durchgeführt. Im vierten Batch wurde eine maximale Lebendzellkonzentration von $2,39 \cdot 10^6$ Zellen/mL erreicht, ein Wert, der fast identisch mit der Maximalkonzentration im SuperSpinner ist. Mit Beginn des fünften Batches wurde zur höheren Produktreinheit proteinfreies Medium nachbefüllt, so daß die BSA-, Humantransferrin- und Insulinsupplementkonzentrationen schrittweise verringert wurden. Allerdings stieg die Totzellzahl bereits mit dem 6. der insgesamt 7 Ansätze um 470% auf $5,7 \cdot 10^5$ Zellen/mL und die Viabilität sank von durchschnittlich 95,5% (sd 1,7%) auf letztendlich 25,1%. In den jeweiligen Ansätzen eins, zwei, drei, vier, fünf, sechs und sieben wurden mittels Sandwich-ELISA folgende zugehörige maximale CSLEX-Antikörperkonzentrationen bestimmt: 21,5 mg/L, 24,0 mg/L, 30,1 mg/L, 28,7 mg/L, 29,0 mg/L, 12,7 mg/L und 23,1 mg/L. Nach dem zweiten Zuführen des proteinfreien Mediums am Anfang des 6. Ansatzes reduzierte sich die maximale Produktkonzentration im Vergleich zum Durchschnitt der vorherigen fünf Ansätze um 52%. Im 6. Batch sank auch die Antikörpersyntheserate von $16,6 \mu\text{g}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ (sd $2,0 \mu\text{g}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$) auf $6,8 \mu\text{g}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$. Zur Steigerung der Produktivität wurden nach dem jeweiligen Ansatz die folgenden Zellmengen nach 10minütiger Zentrifugation bei 150-g rückgeführt: Ansatz eins 75% der Zellen, Ansätze zwei und drei 50% der Zellen, Ansätze vier und fünf 25% der Zellen und Ansatz sechs 100% der Zellen. So konnte fast täglich eine Produkternte erfolgen. Für die Aufarbeitung des CSLEX-Antikörpers wurden die ersten sechs An-

sätze der 5 L-Bioreaktorkultur sowie die Ansätze 9, 10, 12, 13, 14, 16 und 17 der Super-Spinnerkultur mit einem Gesamtvolumen von 32 L Kulturüberstand verwendet.

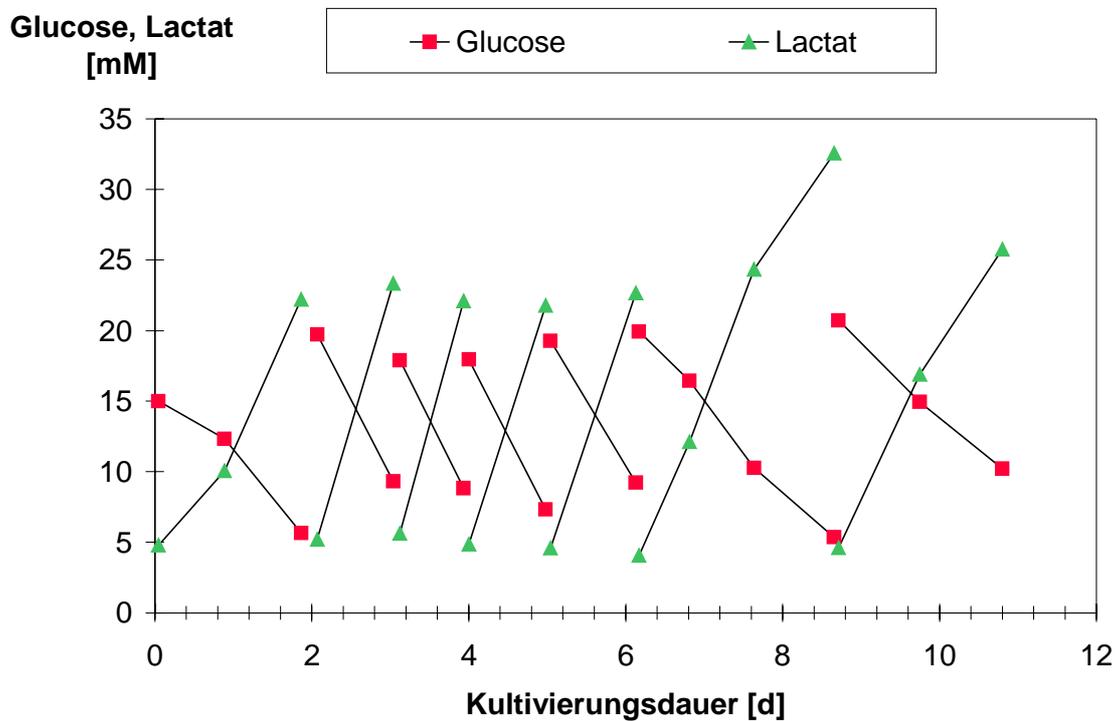


Abbildung 3.3: Verlauf der Glucose- und Lactatkonzentrationen der CSLEX-5 L-Bioreaktorkultur.

Die in Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4 dargestellten Kinetiken der Glucosekonzentration und der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen verdeutlichen, daß keine Limitierung dieser Substrate vorlag. Lediglich die Glutaminkonzentration am Ende des 6. Ansatzes war mit einem Wert von $64,6 \mu\text{M}$ im Bereich des K_S -Wertes für Maus-Hybridomazellen ($30\text{--}70 \mu\text{mol/L}$; Heidemann, 1995). Auffallend ist die Zunahme der extrazellulären Aminosäuren Glutamat und Glycin mit Beginn der Zuführung von proteinfreiem Medium. Auch die Lactatkonzentration erreichte im sechsten Batch einen Spitzenwert von $32,56 \text{ mM}$. Dieser Batch mit einer Dauer von 2,49 Tagen war im Vergleich zu den vorherigen vier allerdings auch um 1,5 Tage länger, wobei die Lactatproduktionsrate von durchschnittlich $12,4 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ (sd $0,7 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$) auf $15,6 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ anstieg.

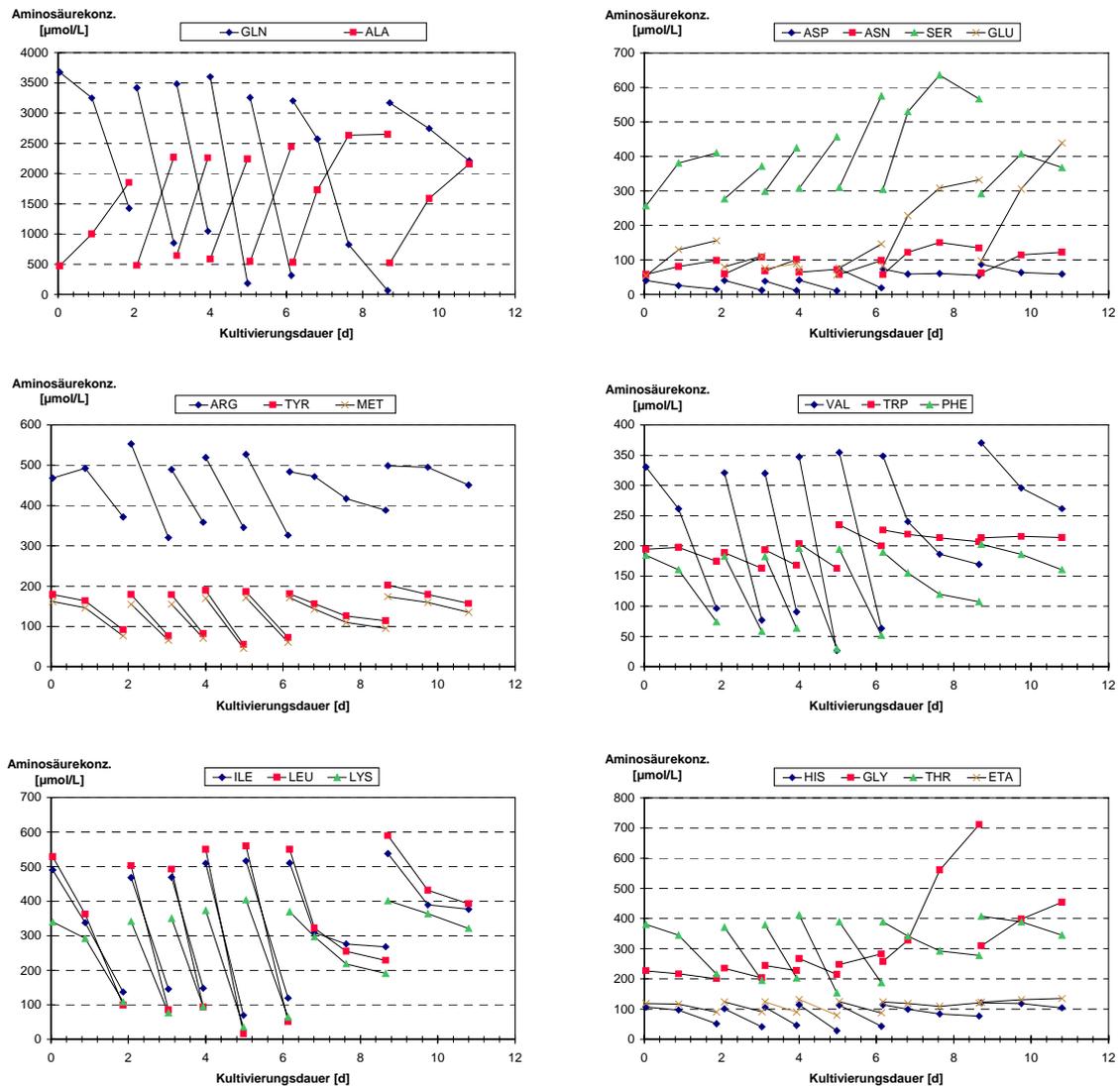


Abbildung 3.4: Verlauf der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen der CSLEX-5 L-Bioreaktorkultur.

Die CSLEX-Zellen verbrauchen in besonderem Maße Glutamin und Glucose und produzieren die Aminosäuren Glutamat, Asparagin, Serin und Alanin. Der hohe Glutaminbedarf des Maus-Maus-Hybridoms von etwa $2000 \text{ nmol}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ erklärt sich aus der weitgehenden Inaktivität der Pyruvat-Dehydrogenase (Wallerius, 1996), die das Endprodukt der Glykolyse – das Pyruvat – normalerweise durch oxidative Decarboxylierung innerhalb der Mitochondrien unter Zugang von NAD^+ und CoA zu Acetyl-Coenzym A katalysiert. Acetyl CoA wird anschließend in den Citratzyklus eingeschleust und dessen aktivierte Acetylgruppe letztendlich zur Gewinnung von ATP vollständig zu CO_2 oxidiert. Statt der möglichen 36 mol ATP pro mol vollständig oxidiertes Glucose werden in der Glykolyse nur 2 mol ATP durch die Phosphoglycerat-Kinase und die Pyruvat-Kinase-reaktion generiert. Die Reduktion des Pyruvats mittels der Lactat-Dehydrogenase zu Lactat erhält durch Generierung von NAD^+ den Ablauf der Glykolyse, die sonst im 6. Schritt, der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion, stoppen würde (Stryer, 1990). Dies erklärt die hohen Konzentrationen von Lactat im Kulturüberstand. Durch die Einschleusung von

Glutamin in den Citratzyklus mittels Desaminierung über Glutamat zu α -Ketoglutarat entstehen bei vollständiger Oxidation zu CO_2 21 mol ATP/mol Glutamin, bei der unvollständigen Oxidation zu Lactat noch 6 mol ATP/mol Glutamin (Zielke *et al.*, 1980). Somit decken die Hybridoma-Zellen ihren Energiebedarf teilweise aus dem Glutaminstoffwechsel.

Tabelle 3.1: Spezifische Umsatzraten und spezifische Wachstumsrate μ der CSLEX-5 L-Bioreaktorkultur.

| Kultur | CSLEX im 5 L-Bioreaktor | | |
|------------------|-------------------------|--------|--|
| Meßzeitraum [d] | 2,07-6,13 | | |
| Substanz | spez. Umsatzrate | sd | Einheit |
| ASP | -25,16 | 8,63 | nmol/(10 ⁶ Zellen·d) |
| GLU | 18,00 | 22,35 | |
| ASN | 23,55 | 10,94 | |
| SER | 114,24 | 48,63 | |
| GLN | -2021,41 | 223,24 | |
| HIS | -48,74 | 6,38 | |
| GLY | -11,22 | 22,75 | |
| THR | -144,21 | 19,74 | |
| ARG | -131,13 | 24,35 | |
| ALA | 1242,63 | 98,90 | |
| TYR | -79,57 | 8,14 | |
| ETA | -27,79 | 4,76 | |
| MET | -72,57 | 10,08 | |
| VAL | -192,93 | 22,48 | |
| TRP | -22,50 | 4,15 | |
| PHE | -98,00 | 10,88 | |
| ILE | -263,78 | 32,01 | |
| LEU | -331,07 | 37,36 | $\mu\text{g}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ |
| LYS | -213,22 | 27,08 | |
| Glucose | -7,14 | 0,20 | $\mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ |
| Lactat | 12,42 | 0,66 | |
| CSLEX-Antikörper | 16,64 | 2,03 | $\mu\text{g}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ |
| μ | 0,86 | 0,26 | d^{-1} |

3.2 Aufarbeitung des CSLEX-Antikörpers

Die Produktstabilität des CSLEX-Antikörpers nach zweistufiger Zentrifugation, Ultra- und Diafiltration, sowie Lyophilisierung und Solvatisierung in CMF-PBS und die Proteinexpression der einzelnen Kulturen wurden durch Gelelektrophoresen überprüft (siehe Abbildung 3.5). Dabei wurden außer den Proteinsupplementen BSA (67 kDa) und Humantransferrin (76 kDa) die CSLEX-IgM mit einem Molekulargewicht von 950 kDa detektiert. Zusätzlich wurden Teilfragmente der pentameren Immunglobuline entdeckt. Das IgM-Gesamtmolekül besteht aus insgesamt 10 schweren Ketten (engl.: heavy chain; H_μ , 68,5 kDa), 10 leichten Ketten (engl.: light chain; L, 25 kDa) und einem Verbindungsprotein (engl.: joining protein; J, 15 kDa), das die innere Gesamtstruktur stabilisiert. Die über Disulfidbrücken verbundenen Ketten dissoziierten bei Langzeitlagerung von 26 Monaten

bei einer Temperatur von +4°C in Teilfragmente (siehe Abbildung 3.5 B, Spur 3), deren erwartete Laufstrecken mit Indices angedeutet sind. Im Vergleich zum bei -20°C gelagerten Überstand (siehe Abbildung 3.5 B, Spur 2) war nach 26monatiger Lagerung bei 4°C die Proteinbande auf Höhe des kompletten IgM-Moleküls fast vollständig verschwunden.

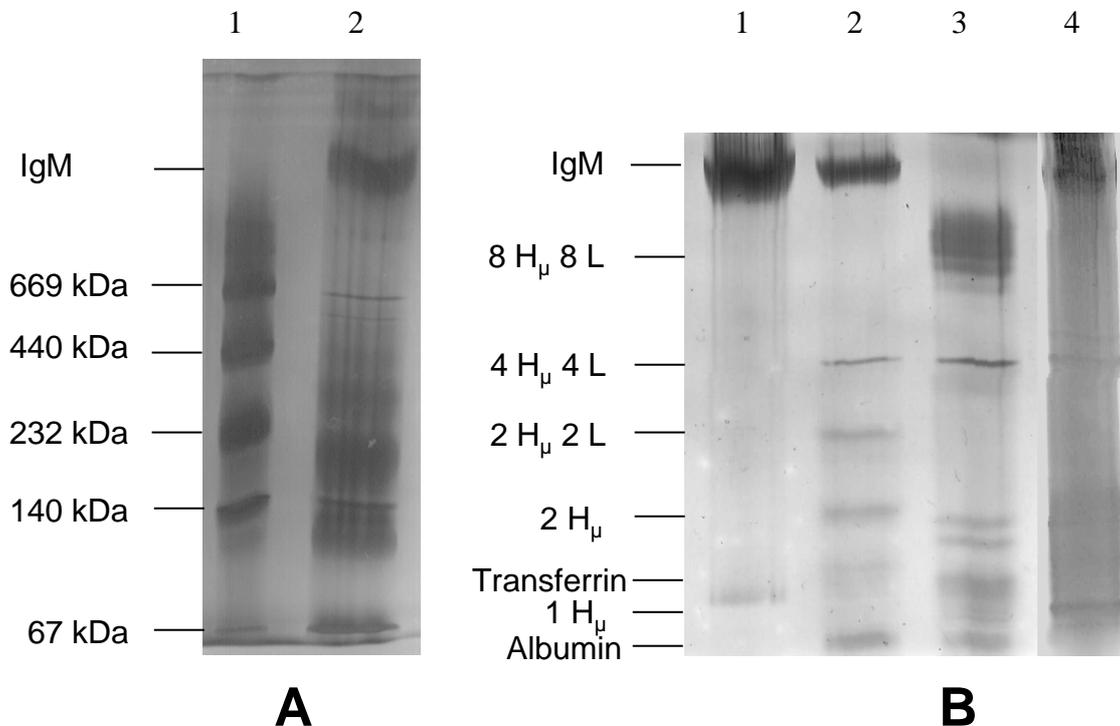


Abbildung 3.5: Ausschnitte der nativen Gradientengele nach Phast-Gelelektrophorese.

A: natives Gradientengel (4-15% Acrylamid) mit

1 HMW-Nativ-Standard und 2 CSLEX-Überstand aus der SuperSpinnerkultur

B: natives Gradientengel (4-15% Acrylamid) mit

1 Eluatfraktion des CSLEX-Konzentrates nach Superdex 200 Gelfiltration

2 Überstand der CSLEX-5 L-Bioreaktorkultur 26 Monate bei -20°C gelagert

3 Überstand der CSLEX-5 L-Bioreaktorkultur 26 Monate bei +4°C gelagert

4 CSLEX-Konzentrat nach kompletter Aufarbeitung und -20°C Lagerung

Das CSLEX-Konzentrat (siehe Abbildung 3.5 B, Spur 4) nach Aufarbeitung und Lagerung bei -20°C enthielt ebenfalls noch Teilfragmente, die jedoch im Vergleich zum Anteil des kompletten Moleküls nur einen geringen Anteil ausmachten. Die per Superdex 200-Gelfiltration aufgereinigte Fraktion des CSLEX-Konzentrates (siehe Abbildung 3.5 B, Spur 1) diente als Vergleichsmaßstab für die Reinheit. Selbst sie enthielt eine weitere Proteinbande mit einem Molekulargewicht < 90 kDa. Die leichten Ketten (L) mit ihren Molekulargewichten von 25 kDa werden in dem Gradientengel dieses Typs (4-15% Acrylamid) nicht aufgetrennt sondern bewegten sich in der Lauffront.

Die absolute Menge des CSLEX-Antikörpers betrug nach der Aufarbeitung der insgesamt 32 L Kulturüberstand 335 mg. Das entspricht einer Gesamtausbeute von 43%.

3.3 Produktion des E-Selektin-IgG-Proteins

Kultivierung in T-Flaschen

Mit dem Ziel der Produktion des chimären E-Selektin-IgG-Proteins wurde zunächst ein Vergleich der Expression in Abhängigkeit des Kulturmediums (DMEM/F12 5% FCS, DMEM/F12 serumfrei, DMEM/F12/MEM serumfrei, MEM serumfrei) in T-Flaschen durchgeführt. Nach Inokulation der CHO-IE-Zellen in T-Flaschen (75 cm² Wachstumsgrundfläche) mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen/mL wurden die Zellen satzweise kultiviert und die E-Selektin-IgG-Konzentration nach fünf Tagen mit einem Sandwich-ELISA gemessen (siehe Abbildung 3.6).

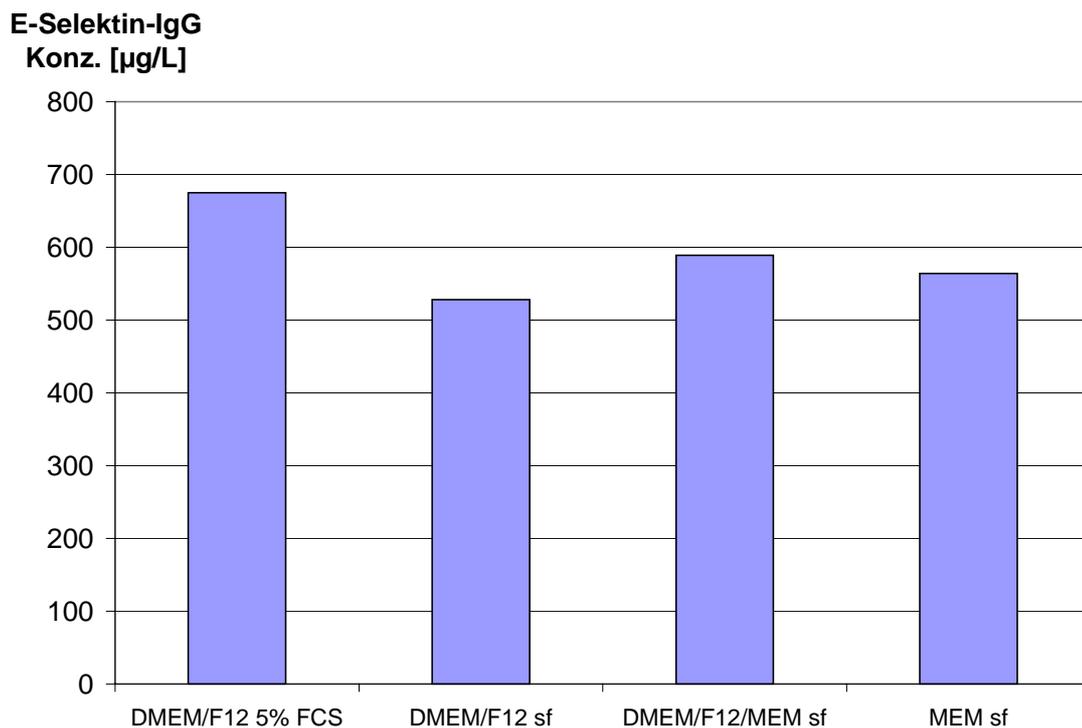


Abbildung 3.6: E-Selektin-IgG-Konzentrationen im Überstand nach 5tägiger CHO-IE-Kultivierung in T-Flaschen mit unterschiedlichen Medien (sf = serumfrei).

Die höchste Konzentration des chimären Proteins (675 $\mu\text{g/L}$) wurde in der serumhaltigen Kultur gefunden. Die drei anderen, an serumfreie Bedingungen adaptierten Kulturen, enthielten 528, 589 und 564 μg E-Selektin-IgG/L. Aufgrund der höheren spezifischen

Wachstumsrate von $0,25 \text{ d}^{-1}$ im DMEM/F12-Medium gegenüber $0,21 \text{ d}^{-1}$ im DMEM/F12/MEM α -Medium (50% DMEM/F12, 50% MEM α) und $0,17 \text{ d}^{-1}$ im MEM α -Medium wurde für die E-Selektin-IgG-Produktion ersteres bevorzugt. Zugunsten einer höheren Produktreinheit wurde allerdings auf den Zusatz von FCS verzichtet und dafür die um 22% niedrigere Protein-Endkonzentration der serumfreien Kultur in Kauf genommen.

Kultivierung in Spinnerflaschen

Im dynamischen Spinner-System zeigte sich der Unterschied der Proteinproduktionsraten zwischen serumfreien und serumhaltigen Kulturbedingungen weitaus deutlicher. In einem direkten Vergleich wurden die CHO-IE-Zellen parallel unter serumfreien Bedingungen (siehe Abbildung 3.7), mit 5% FCS (siehe Abbildung 3.8) sowie mit 5% FCS und 1 g/L makroporösen Gelatinemicrocarriern (CultiSpher G, PERCELL, Schweden) (siehe Abbildung 3.9) für sechs Tage in zwei Ansätzen mit einem Volumen von 100 mL kultiviert. Dabei betrug die spezifische Produktionsrate im zweiten Batch unter serumfreien Bedingungen $17,3 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ bei einer spezifischen Wachstumsrate von $0,30 \text{ d}^{-1}$ (siehe Abbildung 3.7). Die Wachstumsrate in dem 4tägigen Batch war im Vergleich zur statischen T-Flaschenkultur um 20% gesteigert, aber die Maximalkonzentration des chimären Proteins dieser Kultivierung betrug lediglich $73 \text{ }\mu\text{g}/\text{L}$. Für die geringere Proteinmaximalkonzentration ist nur teilweise die geringere Inokulationskonzentration von $1\cdot 10^5 \text{ Zellen}/\text{mL}$ verantwortlich, da die Startzellkonzentration des zweiten Ansatzes $2,4\cdot 10^5 \text{ Zellen}/\text{mL}$ betrug und somit nur 20% geringer war als in der T-Flaschenkultur. Trotzdem war die Produktkonzentration um mehr als das 5fache niedriger.

Die serumhaltige dynamische Kultur erreichte im zweiten Batch eine Produktmaximalkonzentration von $364 \text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ bei einer spezifischen Produktionsrate von $100 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ und einer spezifischen Wachstumsrate von $0,42 \text{ d}^{-1}$ (siehe Abbildung 3.8). Für die Produktionsrate hatte also die Umstellung vom statischen zum dynamischen System den größeren Einfluß auf die serumfreie Kultur.

Dem Entzug der Substratmatrix wurde durch Einsatz von Microcarriern erfolgreich entgegengewirkt. Die Zellen adhärten an die Oberfläche der Carrier und bewuchsen diese bis in die Poren. Dadurch wurde eine Produktmaximalkonzentration von $436 \text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ bei einer spezifischen Produktionsrate von $163 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ und einer spezifischen Wachstumsrate von $0,44 \text{ d}^{-1}$ ermöglicht (siehe Abbildung 3.9). Aufgrund des Kostenfaktors wurde auf den Einsatz von Microcarriern für den Produktionsmaßstab verzichtet.

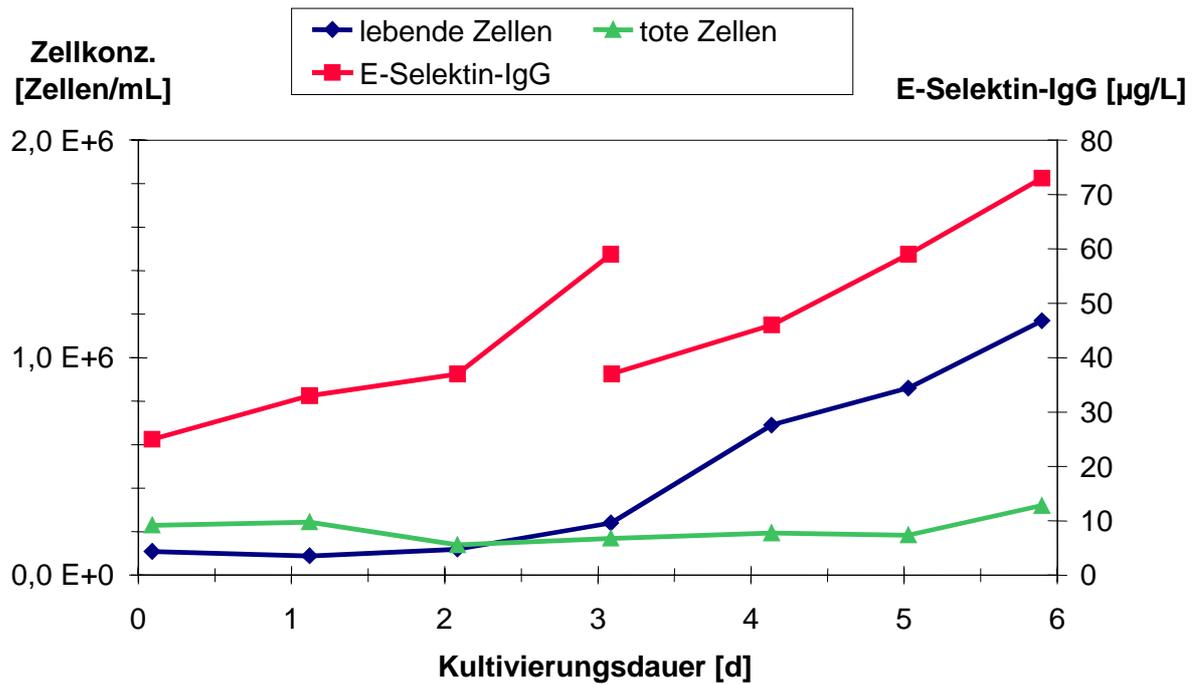


Abbildung 3.7: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration während der serumfreien Kultivierung von CHO-IE-Zellen im Spinner.

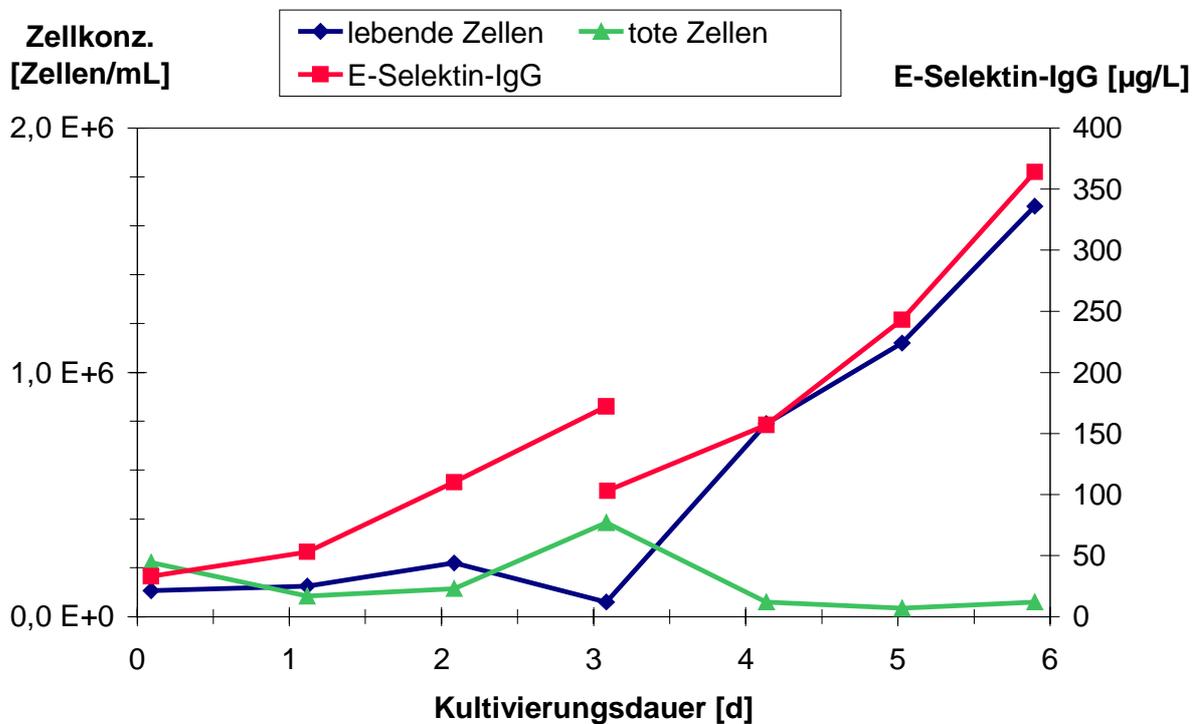


Abbildung 3.8: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration während der Kultivierung von CHO-IE-Zellen mit 5% FCS im Spinner.

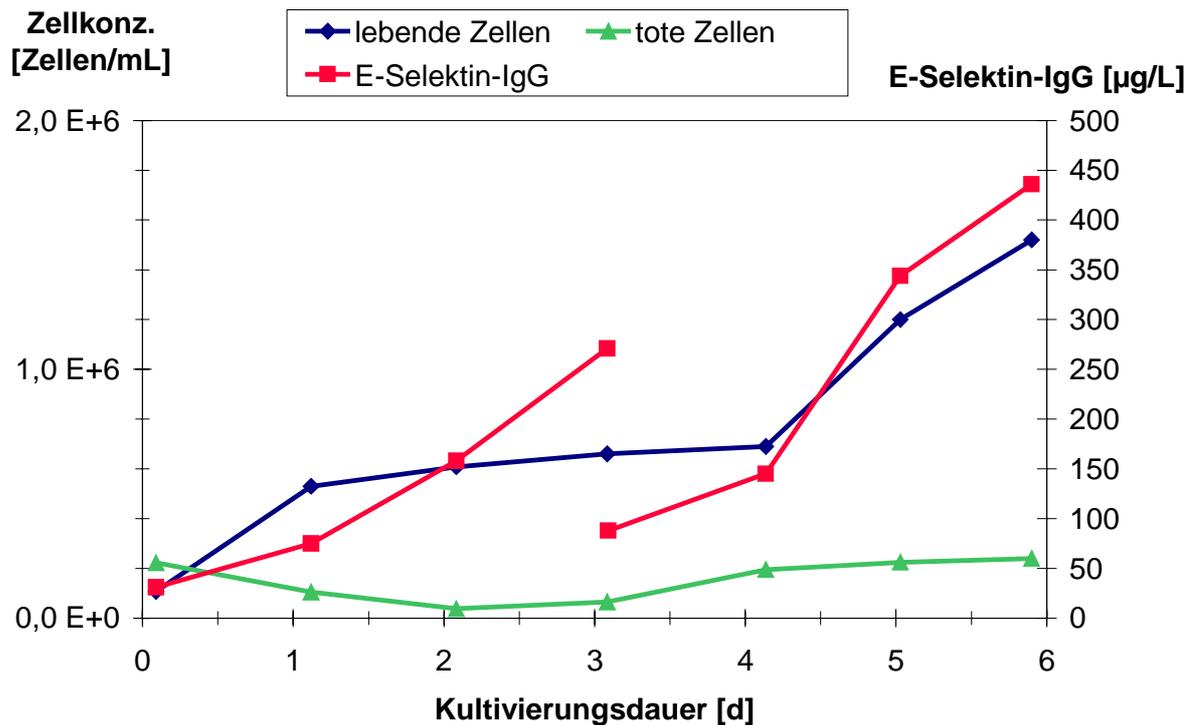


Abbildung 3.9: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration während der Kultivierung von CHO-IE-Zellen mit 5% FCS und 1 g/L CultiSpher G Microcarrier im Spinner.

Kultivierung im 5 L-Bioreaktor und im 10 L-Spinner

Für die Produktion des chimären Proteins wurde zunächst eine Maßstabsvergrößerung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen serumfrei ohne Microcarrier im 5 L-Bioreaktor und 10 L-Spinner kultiviert.

Die Kultur im 5 L-Bioreaktor erreichte innerhalb von 12 Tagen und drei Ansätzen mit einer durchschnittlichen Viabilität von 80,9% (sd 8,2%) bei einer spezifischen Wachstumsrate von $0,16 \text{ d}^{-1}$ und einer spezifischen E-Selektin-IgG-Produktionsrate von $12 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ lediglich eine maximale Produktkonzentration von $109 \mu\text{g/L}$ und eine maximale Lebendzellkonzentration von $1,1 \cdot 10^6 \text{ Zellen/mL}$ am Tag 6 (siehe Abbildung 3.10).

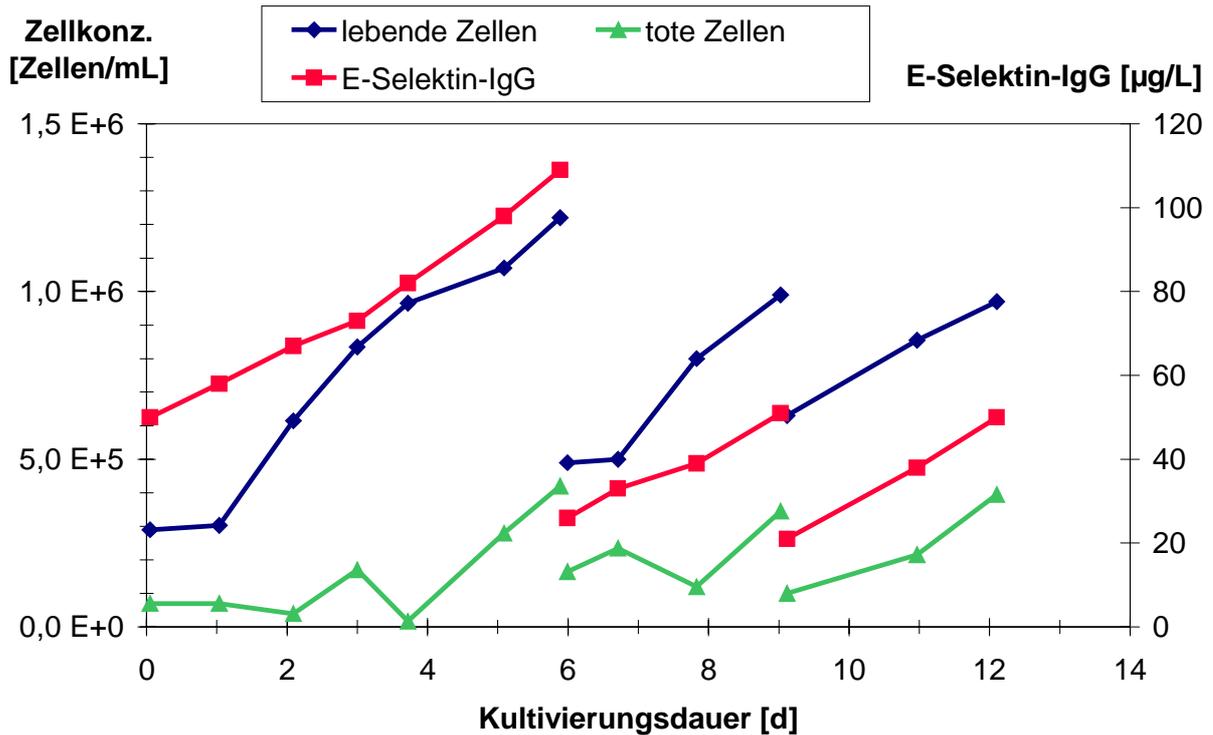


Abbildung 3.10: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration während der Kultivierung von CHO-IE im 5 L-Bioreaktor.

Die Kultur im 10 L Spinner wies innerhalb der ersten sechs Tage eine maximale Zellkonzentration von $4,35 \cdot 10^5$ Zellen/mL und eine maximale Produktkonzentration von $146 \mu\text{g/L}$ auf (siehe Abbildung 3.11). Bei einer im Vergleich zur 5 L-Bioreaktorkultur 2,5mal niedrigeren Zellkonzentration konnte in der gleichen Zeitspanne eine um 34% höhere Produktkonzentration erzielt werden. Innerhalb der 30tägigen Kultivierung in vier Ansätzen wurden eine maximale Lebendzellkonzentration von $3,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL und eine maximale Produktkonzentration von $464 \mu\text{g/L}$ bei einer spezifischen Wachstumsrate von $0,23 \text{ d}^{-1}$ und einer spezifischen Produktionsrate von $17 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ erreicht. Die durchschnittliche Viabilität betrug dabei 77,8% (sd 15,3%).

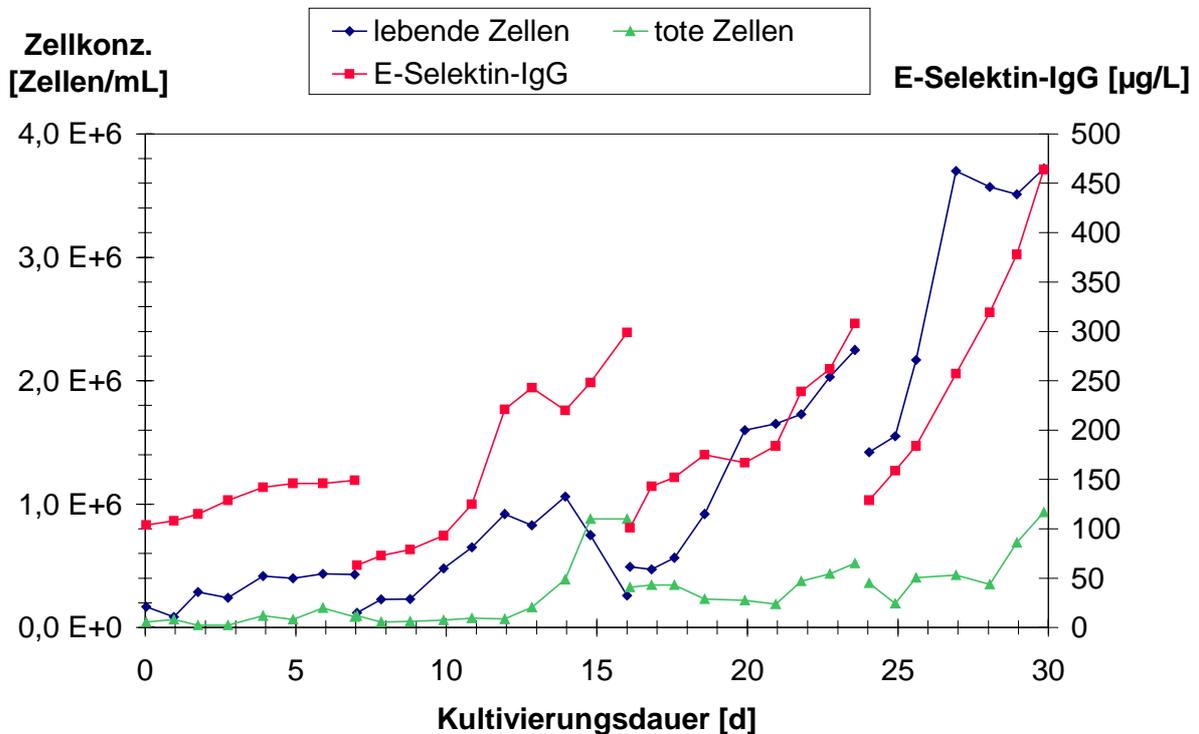


Abbildung 3.11: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration während der Kultivierung der CHO-IE-Zellen im 10 L-Spinner.

Zellklon-Selektionierung auf maximale spezifische Produktionsraten

Um die Menge des chimären E-Selektins weiterhin zu steigern wurden die Zellen auf hohe Proteinproduktionsraten in Spinnern selektiert. Dazu wurden verschiedene Chargen der Arbeitszellbänke aufgetaut und die Zellklone auf ihre Produktivität unter dynamischen Bedingungen getestet. Dabei konnte eine Kultur mit gesteigerter spezifischer Produktionsrate entdeckt werden. Diese wurde auf ihre Stabilität bezüglich der Produktbildungsrate im SuperSpinner im Vergleich zu derjenigen des für die 5 L-Bioreaktor- und 10 L-Spinnerkultur verwendeten Klons untersucht.

Die Kultivierungen der CHO-IE-Zellen in SuperSpinnern vor und nach Selektionierung auf einen Klon mit hoher Produktionsrate sind in Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13 dargestellt. Während der 79tägigen Kultivierung vor der Selektionierung wurde eine Maximalzellkonzentration von $1,1 \cdot 10^7$ Zellen/mL erreicht. Durch Bildung von Sphäroiden, die durch ihre starke Sedimentationsneigung bei Beendigung der einzelnen Ansätze nicht im gleichen Maße wie das Kulturmedium ausverdünnt wurden, erhöhte sich die Zellkonzentration bis zum 29. Tag, von dem an gezielt Sphäroide herauspipettiert wurden, auf $7,8 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die spezifische E-Selektin-IgG-Produktionsrate betrug $30 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ bei einer spezifischen Wachstumsrate von $0,19 \text{ d}^{-1}$.

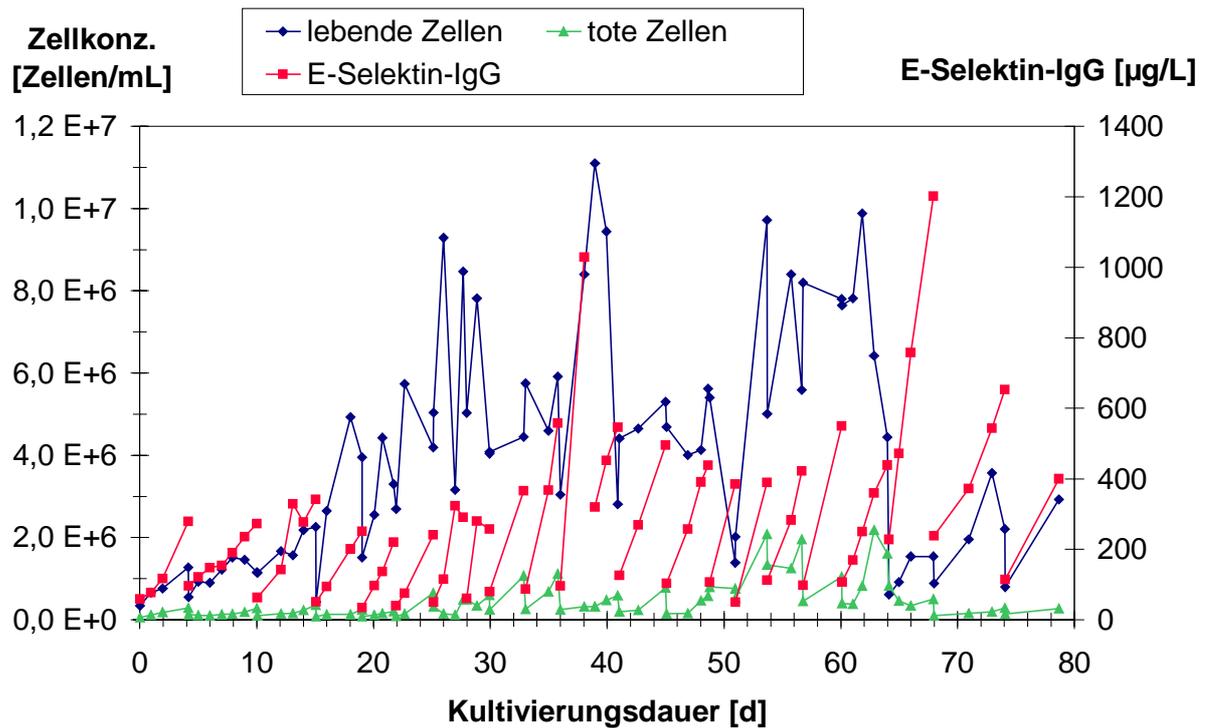


Abbildung 3.12: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration vor Produktrauen-Selektionierung der CHO-IE Zellen.

Nach erfolgter Klon-Selektionierung zeigten die Zellen eine durchschnittliche spezifische Produktionsrate von $205 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ bei einer spezifischen Wachstumsrate von $0,17 \text{ d}^{-1}$ während einer 71tägigen Kultivierung im SuperSpinner. Obwohl die Maximalzellkonzentration mit einem Wert von $3,7 \cdot 10^6 \text{ Zellen/mL}$ um den Faktor drei niedriger war als in der zuvor dargestellten Kultivierung, konnte eine Produktkonzentration von $3660 \mu\text{g/L}$ erreicht werden. Damit wurde durch erfolgreiche Selektionierung eine im Vergleich zur Kultivierung auf Microcarriern unter serumfreien Bedingungen um 26% höhere Produktionsrate bei allerdings halbiertes spezifischer Wachstumsrate erzielt.

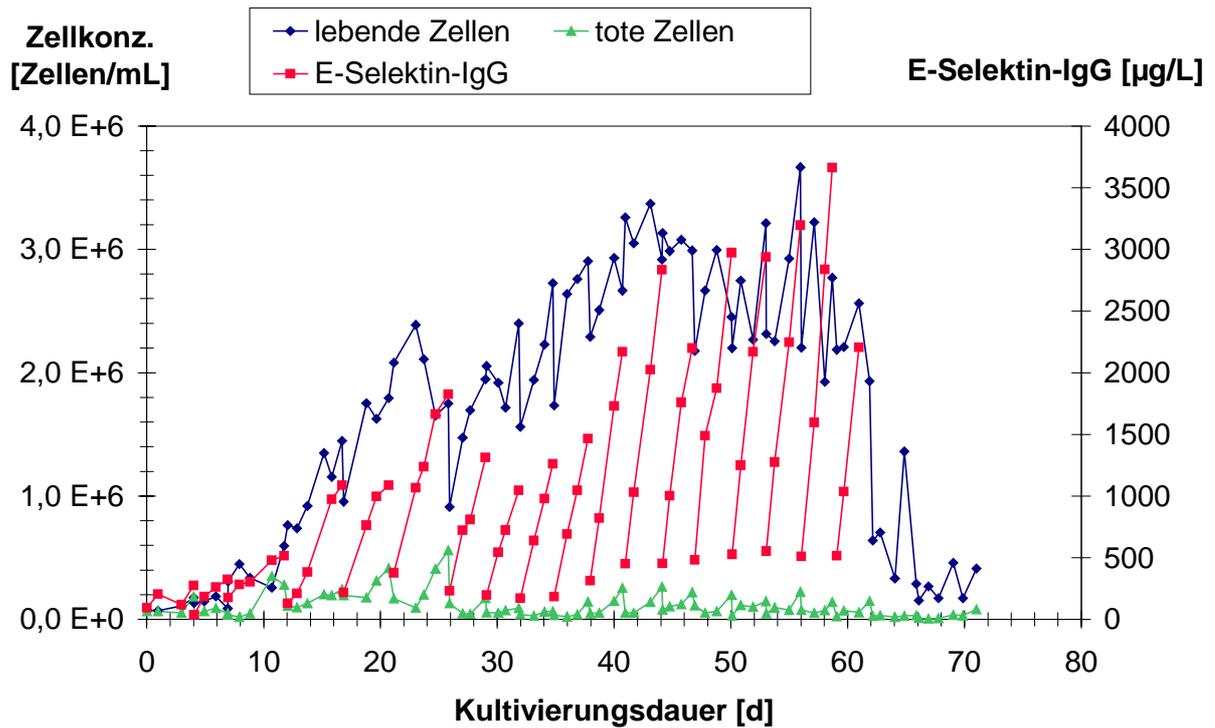


Abbildung 3.13: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration nach Produktraten-Selektionierung der CHO-IE-Zellen.

Optimierung des Mediums

Die Betrachtung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen (siehe Abbildung 3.14) der SuperSpinnerkultur vor Selektionierung offenbarte zwischen dem 19. und 36. Tag ein Absinken der Tryptophan-Konzentration auf Werte zwischen 8 und 18 µmol/L am Ende der jeweiligen Ansätze. Durch Optimierung des Mediums mittels Supplementierung von 50 µmol Tryptophan/L wurde dieser Mangel beseitigt. Auffallend war die Verschiebung des Aspartatstoffwechsels von einer Produktion innerhalb der ersten 15 Tage zu einem kontinuierlichen Verbrauch ab dem 23. Tag. Zum einen wird Aspartat mit α -Ketoglutarat zu Oxalacetat unter Bildung von Glutamat transaminiert, zum anderen entsteht Aspartat durch die umgekehrte Reaktion, der Transaminierung von Glutamat. Der Verbrauch von Aspartat führte vom Tag 45 bis zum Tag 79 zu Konzentrationen von 3 bis 13 µmol/L am Ende der jeweiligen Ansätze. Da diese Aminosäure für CHO-Zellen allerdings nicht essentiell ist, sondern durch Umwandlung von Asparagin zu Aspartat mittels der Asparaginase hydrolysiert wird, wurde für die weiteren Kultivierungen dem Medium 50 µmol/L Asparagin zugesetzt. Um Limitierungen vorzubeugen bzw. dem hohen Verbrauch folgender Aminosäuren gerecht zu werden, wurden ebenfalls 30 µmol/L Methionin, 30 µmol/L Serin und 170 µmol/L des für einige CHO-Klone essentiellen Prolins supplementiert (vgl. Seewöster, 1995).

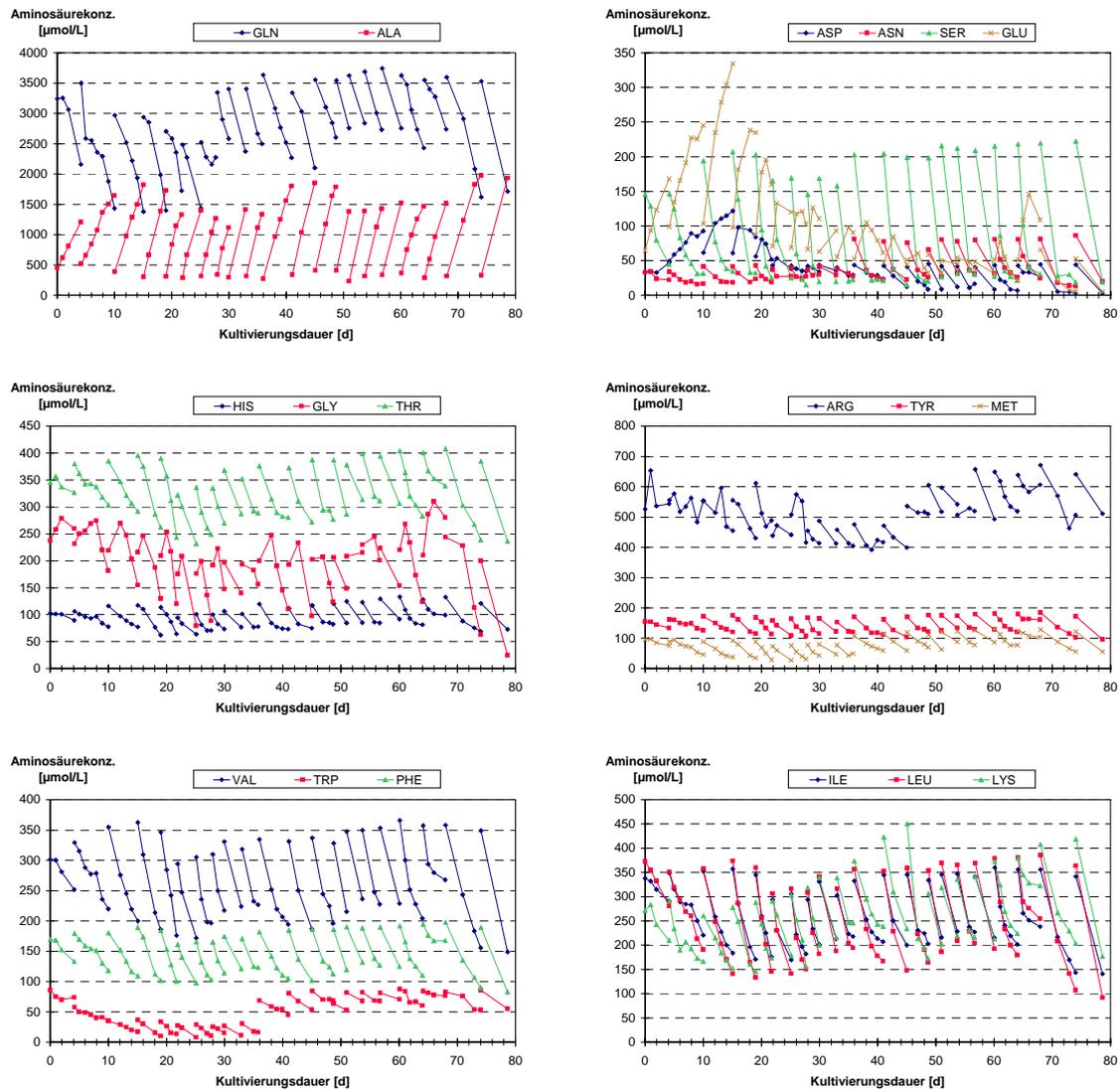


Abbildung 3.14: Verlauf der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen einer CHO-IE-SuperSpinnerkultur.

Der Vergleich der Aminosäureverbrauchsrate unter serumfreien Kulturbedingungen zwischen der Hybridoma-Zelllinie CSLEX (siehe Tabelle 3.1) und der CHO-IE-Zelllinie (siehe Tabelle 3.2) zeigt deutliche qualitative und quantitative Unterschiede der Stoffwechsellmuster. Die Maus-Maus-Hybridomazellen katabolisieren hauptsächlich Glutamin unter Generierung von Glutamat und Asparagin; die Hamsterzellen dagegen benötigten nur ein Zehntel der Glutaminmenge, verbrauchten aber Asparagin und Glutamat. Auch der Serin- und Glycinumsatz war jeweils gegensätzlich. Beide Aminosäuren können über Pyruvat zu Acetyl-CoA abgebaut werden und damit in den Citratzyklus gelangen, oder als glukogene Aminosäuren in Glucose umgewandelt werden. Zusätzlich sind Serin und Glycin durch die Serin-Hydroxymethyl-Transferasereaktion ineinander umwandelbar. Während Alanin von beiden Zelllinien produziert wurde, nahmen die Zellen alle übrigen Aminosäuren auf. Quantitativ benötigten die CSLEX-Zellen im Vergleich zu den CHO-IE-Zellen dabei durchschnittlich die 8,2fache Menge dieser Aminosäuren. Zusätzlich war die Glucoseverbrauchsrate der Hybridoma-Zellen 4,3mal und die Lactatproduktionsrate 4,7mal höher.

Dieser Umstand geht einher mit einer 5,7fach höheren spezifischen Wachstumsrate und einer 77fach höheren gewichtsbezogenen spezifischen Produktionsrate der CSLEX-Zellen. Bezogen auf die molare spezifische Produktionsrate unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von 950 kDa des IgM und der ca.180 kDa des E-Selektin-IgG ergibt sich ein Verhältnis von 14,5:1. Der allgemein höhere Substratbedarf des Hybridoms resultierte also aus dem stärkeren Wachstum gekoppelt mit der höheren Produktionsrate. Die CHO-IE-Zellen exprimierten trotz der Medienoptimierung und Selektionierung vergleichsweise wenig Produkt. Eine unter serumfreien Bedingungen mit 10 mg/L RI, 10 mg/L HT und 500 mg/L BSA in DMEM/F12 (GIBCO) kultivierte CHO DUKX B1-Zelllinie, die durch eine Calciumphosphat-Präzipitation mit zwei HCMV-Promotor-tragenden (humaner Cytomegalovirus) Plasmidvektoren mit der genetischen Information jeweils zur Expression der schweren bzw. leichten Kette des Antikörpers D1.3 (Amit *et al.*, 1986) gegen Hühner-ei-Lysozym transfiziert wurde, erreichte im SuperSpinner spezifische Produktionsraten von 12200 ng/(10⁶ Zellen·d) (Werner, 1997).

Tabelle 3.2: Spezifische Umsatzraten und spezifische Wachstumsrate μ der CHO-IE-1 L-SuperSpinnerkultur nach Medienoptimierung und Zellselektionierung unter serumfreien Bedingungen.

| Kultur | CHO-IE im 1 L-SuperSpinner | | |
|-----------------|----------------------------|-------|--------------------------------------|
| Meßzeitraum [d] | 12,85-15,83 | | |
| Substanz | spez. Umsatzrate | sd | Einheit |
| ASP | -7,51 | 5,09 | nmol/(10 ⁶ Zellen·d) |
| GLU | -8,68 | 7,87 | |
| ASN | -3,24 | 3,95 | |
| SER | -32,98 | 17,58 | |
| GLN | -196,11 | 89,83 | |
| HIS | -12,26 | 9,45 | |
| GLY | 3,48 | 9,81 | |
| THR | -26,09 | 20,26 | |
| ARG | -16,93 | 10,52 | |
| ALA | 243,68 | 46,62 | |
| TYR | -4,14 | 14,24 | |
| ETA | -1,06 | 0,50 | |
| MET | -9,37 | 6,89 | |
| VAL | -27,57 | 16,10 | |
| TRP | -2,35 | 0,76 | |
| PHE | -13,92 | 8,47 | |
| ILE | -34,87 | 19,38 | |
| LEU | -42,41 | 21,86 | |
| LYS | -17,95 | 8,21 | |
| Glucose | -1,65 | 0,62 | μ mol/(10 ⁶ Zellen·d) |
| Lactat | 2,65 | 0,90 | |
| E-Selektin-IgG | 217 | 81 | ng/(10 ⁶ Zellen·d) |
| μ | 0,15 | 0,05 | d ⁻¹ |

Kultivierung im 2 L-Perfusions- und im 100 L-Bioreaktor

Unter den optimierten Medienbedingungen wurden die Zellen serumfrei ohne Microcarrier im 2 L-Perfusionsbioreaktor und 100 L-Bioreaktor kultiviert.

Die höchsten Zellkonzentrationen aller dargestellten Kultivierungen wurden in der 2 L-Perfusionskultur mit Spinfilter-Zellrückhaltung gemessen (Abbildung 3.15). In einem Zeitraum von 29 Tagen betrug die maximale Lebendzellkonzentration $1,65 \cdot 10^7$ Zellen/mL bei einer durchschnittlichen Viabilität von 84,0% (sd 7,5%). Das entspricht dem 4,5fachen der Kultur im 10 L-Spinner. Am 18. Kultivierungstag wurde eine Zellernte zur Inokulation des 100 L-Bioreaktors durchgeführt. Die Lebendzellkonzentration sank somit von $1,51 \cdot 10^6$ Zellen/mL auf $5,0 \cdot 10^5$ Zellen/mL. Bedingt durch die, im Vergleich zu den satzweise geführten Kultivierungen, hohe Lebendzellkonzentration, kam es zu einer maximalen Produktkonzentration von 1810 $\mu\text{g/L}$. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate betrug $0,21 \text{ d}^{-1}$ bei einer spezifischen Produktionsrate von $121 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$.

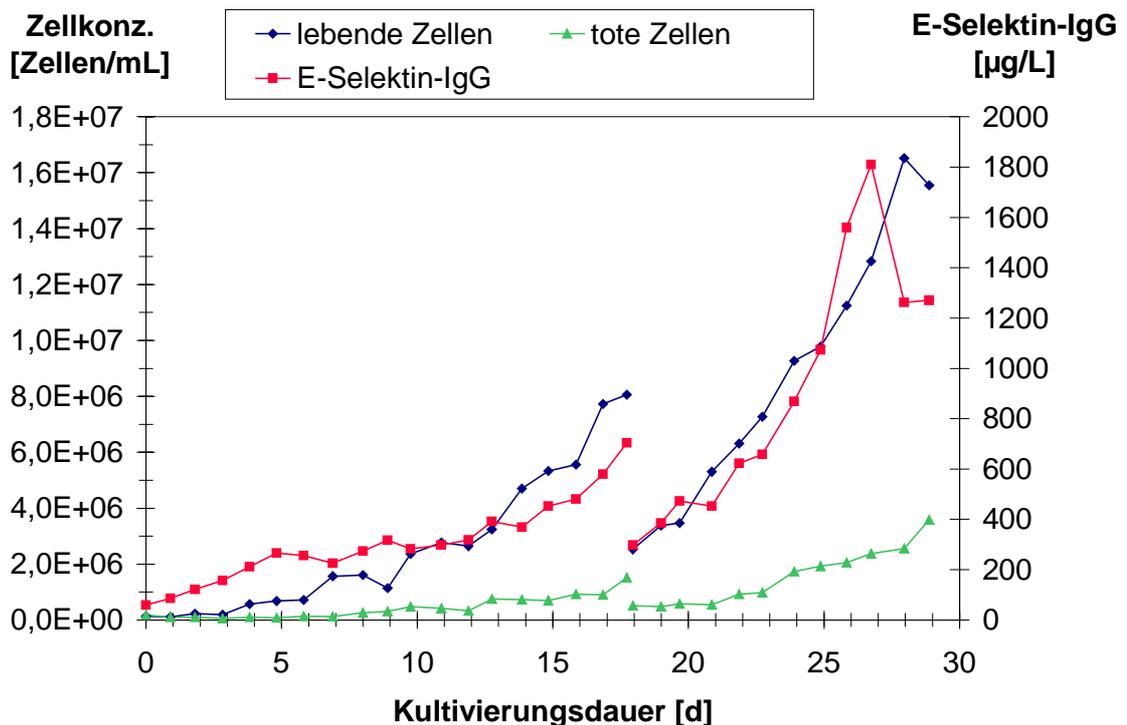


Abbildung 3.15: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration während der Kultivierung der CHO-IE-Zellen im 2 L-Perfusionsbioreaktor.

Die 15tägige Kultivierung im 100 L-Bioreaktor ergab innerhalb der drei Ansätze eine maximale Lebendzellkonzentration von $9,7 \cdot 10^5$ Zellen/mL (siehe Abbildung 3.16). Im dritten Batch wuchsen die Zellen mit einer durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate von $0,29 \text{ d}^{-1}$ bei einer durchschnittlichen spezifischen Produktionsrate von $145 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$. Die maximale E-Selektin-IgG-Konzentration betrug $643 \mu\text{g/L}$ im zweiten und $554 \mu\text{g/L}$ im dritten Batch.

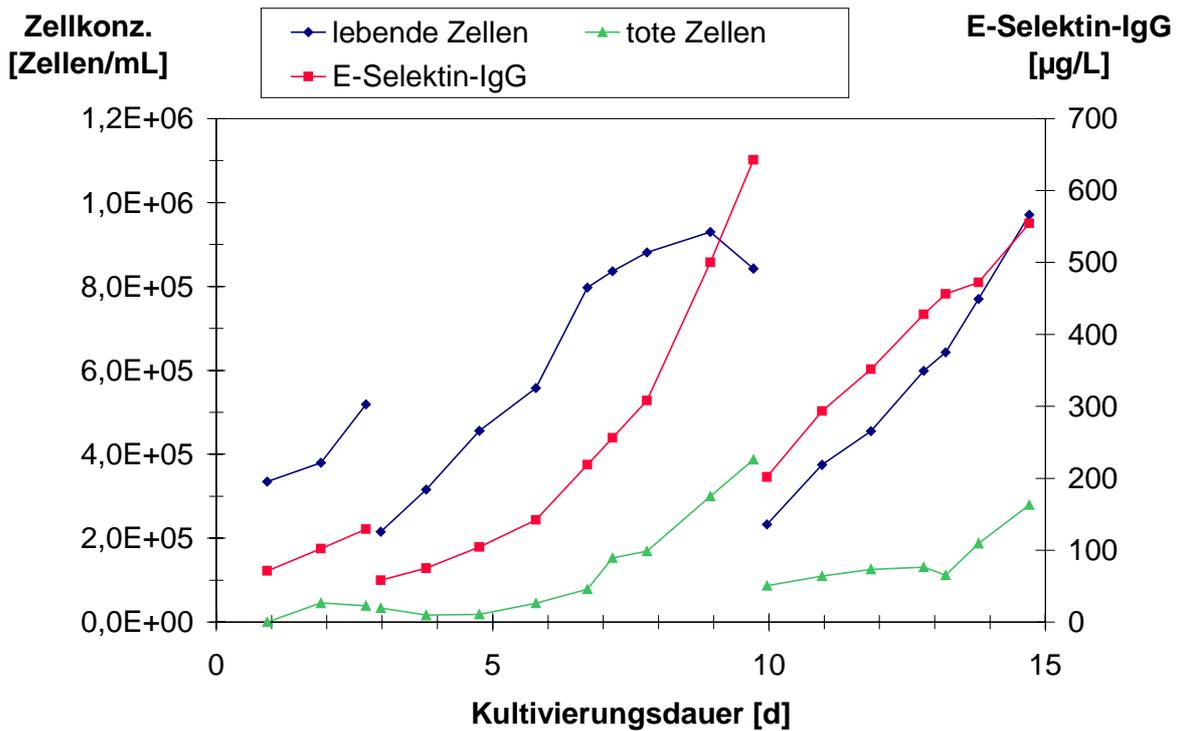


Abbildung 3.16: Verlauf der Lebend- und Totzell- sowie der E-Selektin-IgG-Konzentration während der Kultivierung der CHO-IE-Zellen im 100 L-Bioreaktor.

Vergleich der spezifischen E-Selektin-IgG-Produktionsraten

Der Vergleich der spezifischen Produktionsraten der vier Produktions-Kultivierungen im Maßstab über einem Liter ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Die spezifische Produktionsrate der noch nicht optimierten Kultur im 5 L-Bioreaktor war am ersten Tag maximal $29 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ und sank dann im ersten Ansatz auf eine Rate von $12 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$, die bis zum dritten Batch etwa konstant blieb. Im Gegensatz dazu stieg die spezifische Produktionsrate der ebenfalls nicht optimierten Kultur im 10 L-Spinner von anfangs $34 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ innerhalb von drei Tagen auf $53 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$, um schließlich auf einen Wert von $7 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$ am Ende des ersten Ansatzes zu fallen. Im zweiten Batch traten größere Schwankungen auf, die am Ende bedingt wurden durch das Freiwerden von intrazellulärem Produkt aus lysierenden Zellen. Der Maximalwert betrug hier $112 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d})$. Während des dritten Satzes fiel

die spezifische Produktionsrate von $121 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ am Ende auf einen Wert von $26 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$. Im vierten Ansatz blieb die Rate zwischen 15 und $27 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ mit einem Mittelwert von $20 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$.

Innerhalb der ersten fünf Tage der 2 L-Perfusionskultur, in denen die Kultur im Satzbetrieb geführt wurde, sank die spezifische Produktionsrate von $252 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ auf $88 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$. Mit Beginn des Perfusionsbetriebes pendelte sie sich im Bereich von 74 bis $196 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ für die restliche Kultivierungsdauer ein.

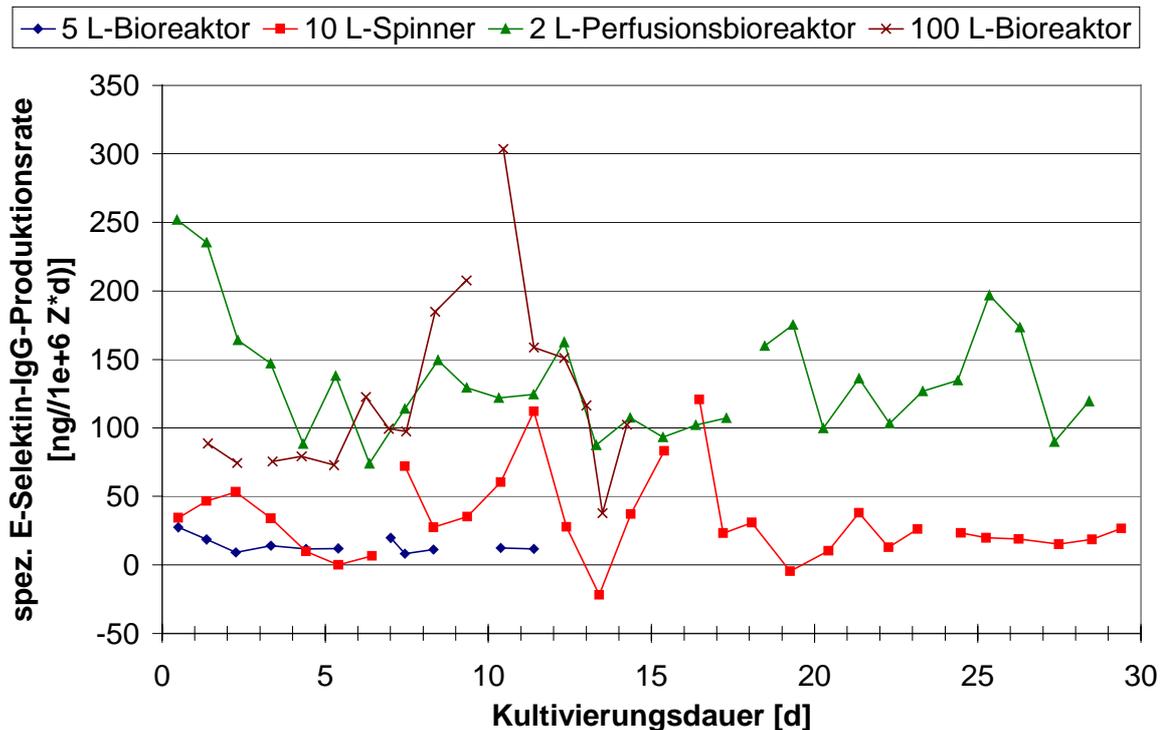


Abbildung 3.17: Verlauf der spezifischen Produktionsraten der CHO-IE-Kulturen im 2 L-, 5 L- und 100 L-Bioreaktor sowie im 10 L-Spinner.

Die größten Schwankungen der spezifischen Produktionsrate waren während der Kultivierung im 100 L-Bioreaktor festzustellen. Ausgehend von einer Rate von $76 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ stieg diese auf $208 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ am Ende des zweiten Ansatzes, gipfelte in einem Wert von $304 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ am Anfang des dritten Ansatzes und endete mit einer Rate von $102 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$.

Damit konnten im perfundierten 2 L-Bioreaktor und im großvolumigen 100 L-Bioreaktor die größten Mengen des E-Selektin-IgG-Proteins hergestellt werden (siehe Abbildung 3.18). Insgesamt wurden im 5 L-Bioreaktor 0,8 mg, im 10 L-Spinner 8,5 mg, im 2 L-Perfusionsbioreaktor 35,2 mg und im 100 L-Bioreaktor 105,6 mg E-Selektin-IgG in den Überstand sezerniert.

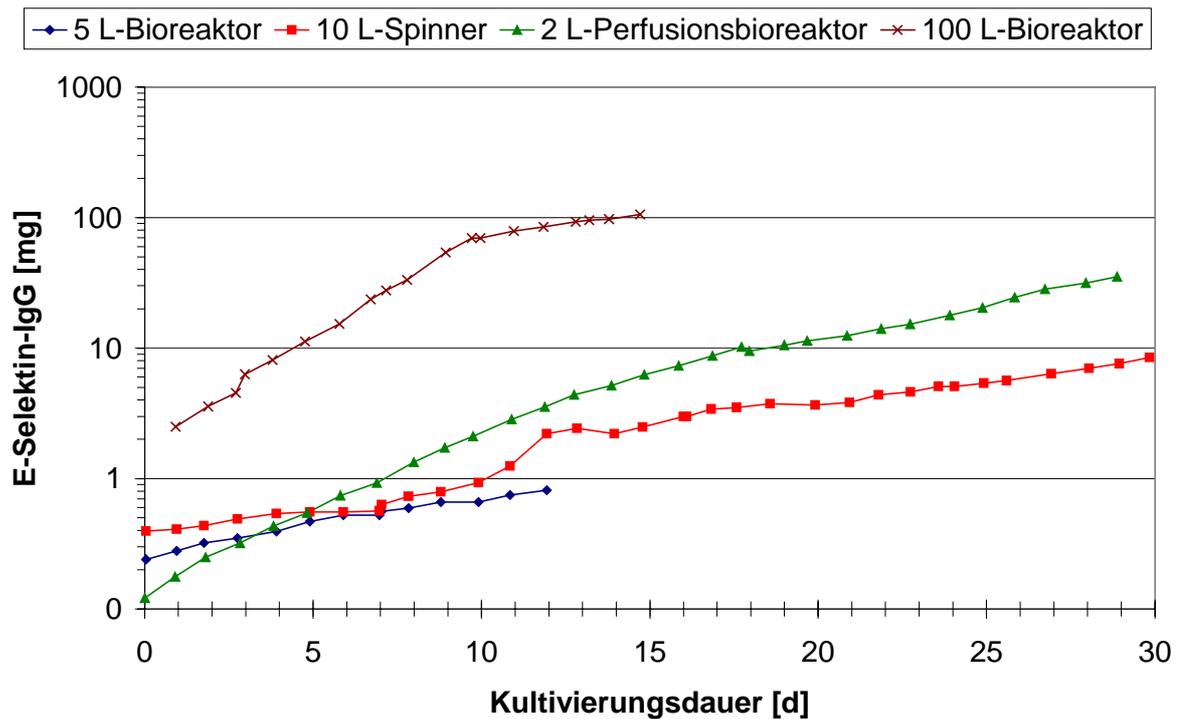


Abbildung 3.18: Akkumuliertes E-Selektin-IgG-Produkt aus den Kultivierungen der CHO-IE-Kulturen im 2 L-, 5 L- und 100 L-Bioreaktor sowie im 10 L-Spinner.

3.4 Aufarbeitung des E-Selektin-IgG-Proteins

Die Überstände der 2 L-Perfusionsbioreaktor- und der 100 L-Bioreaktorkultur wurden separat aufgearbeitet. Dazu wurden die Suspensionen zunächst bei 3543·g zellfrei zentrifugiert, durch einen Tiefenfilter mit einer nominellen Ausschlußgrenze von 3 µm filtriert und mittels einer Ultrafiltrationskartusche mit einer nominellen Ausschlußgrenze von 10 kDa ankonzentriert. Nach der Affinitätschromatographie mit rekombinantem Protein A erfolgte die Aliquotierung und das Einfrieren bei -80°C . Die Reinheit der Fraktionen nach den einzelnen Schritten wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert (siehe Abbildung 3.19).

Das Gel zeigte, daß im Überstand der 100 L-Bioreaktorkultur hauptsächlich BSA mit einem Molekulargewicht von 67 kDa vorhanden war (Spur 2). Außerdem wurden Banden zwischen 140 und 180 kDa sowie eine Bande bei 116 kDa detektiert. In der Spur 3 des Ultrafiltrationskonzentrates wurden zusätzlich weitere Banden unterhalb von 67 kDa deutlich. Erst nach der Protein A Affinitätschromatographie waren diese abgereinigt, wodurch sich nur noch drei scharfe Banden abzeichneten. Die unterste Bande aus Molekülen eines Molekulargewichts von 55 kDa ist unbekannter Herkunft. Es könnte sich dabei um Fragmente des E-Selektin-IgGs mit den CH1- und CH2-Domänen handeln, die eine Affinität zu Protein A zeigen, aufgrund dessen diese Moleküle im Eluat zu finden waren. Weiterhin waren noch BSA (67 kDa) und das E-Selektin-IgG (180 kDa) vorhanden. Als Vergleichs-

maßstab für die Reinheit dienten Fraktionen nach einer Gelfiltration des Eluats. Mittels Gelfiltration konnte das E-Selektin-IgG (Spur 6) und das BSA (Spur 7) getrennt werden.

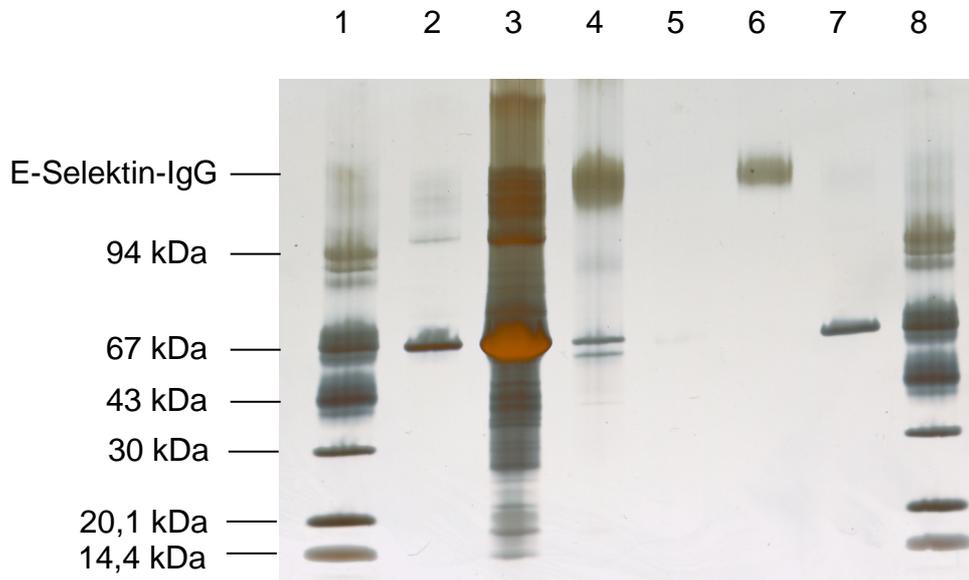


Abbildung 3.19: Phast-Gradientengel (8-25% Acrylamid) nach SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung.

- | | |
|-----|--------------------------------------|
| 1+8 | LMW-SDS-Standard |
| 2 | Überstand der 100 L-Bioreaktorkultur |
| 3 | Ultrafiltrationskonzentrat |
| 4 | Protein A Eluat |
| 5 | Gelfiltrationsfraktion 9 |
| 6 | Gelfiltrationsfraktion 21 |
| 7 | Gelfiltrationsfraktion 32 |

Für die Inhibitionstests der Zell-Zell-Adhäsion wurde auf diese weitere Aufreinigung verzichtet, da die meisten Experimente mit 5% FCS durchgeführt wurden, welches ebenfalls BSA enthält. Nach vollendeter Aufarbeitung mit Ausbeuten von 52,0% bzw. 67,7% konnten aus der 2 L-Perfusionsbioreaktorkultur 18,3 mg und aus der 100 L-Bioreaktorkultur 71,5 mg E-Selektin-IgG in aufgereinigter Form erhalten werden. Für die Inhibitionstests der Zell-Zell-Adhäsion und die HPTLC-Overlays wurden aufgereinigte Aliquots aus der Ernte der 100 L-Bioreaktorkultur verwendet.

3.5 Humane Hirn-, Granulocyten- und HL-60-Ganglioside

Die aufgereinigten humanen Hirn-, Granulocyten- und HL-60-Ganglioside wurden von PD Dr. J. Müthing zur Verfügung gestellt. Eine massenspektrometrische Analyse sollte zu-

nächst Aufschluß über die gemeinsamen Bestandteile der Granulocyt- und HL-60-Gangliosidfraktionen liefern.

3.5.1 Massenspektrometrische Analyse der Gangliosidfraktionen

Die Massen/Ladungszahl-Diagramme der HL-60-Gangliosidfraktion JM08/72-1 (siehe Abbildung 3.20) sowie der Granulocytfraktion JM07/7-4 (siehe Abbildung 3.21) zeigten im Bereich von 1150 bis 1995 m/z eine annähernd gleiche Peakverteilung. Hier konnten Strukturen identifiziert werden, die bereits für humane Granulocyten bekannt sind (Müthing *et al.*, 1996). Es handelt sich dabei um C16- oder C24-Fettsäuren enthaltende Ganglioside der Neolacto-Serie, die terminal an Position IV oder VI sialyliert sind (siehe Tabelle 3.3). Die im Diagramm dargestellte relative Signalstärke ist nicht proportional zu der Anzahl der zugehörigen Moleküle in der Probe, da je nach Energieeintrag eine variable Fragmentierung massereicher Moleküle auftritt, die die Anzahl bzw. die Intensität der kleineren Fragmente beeinflusst.

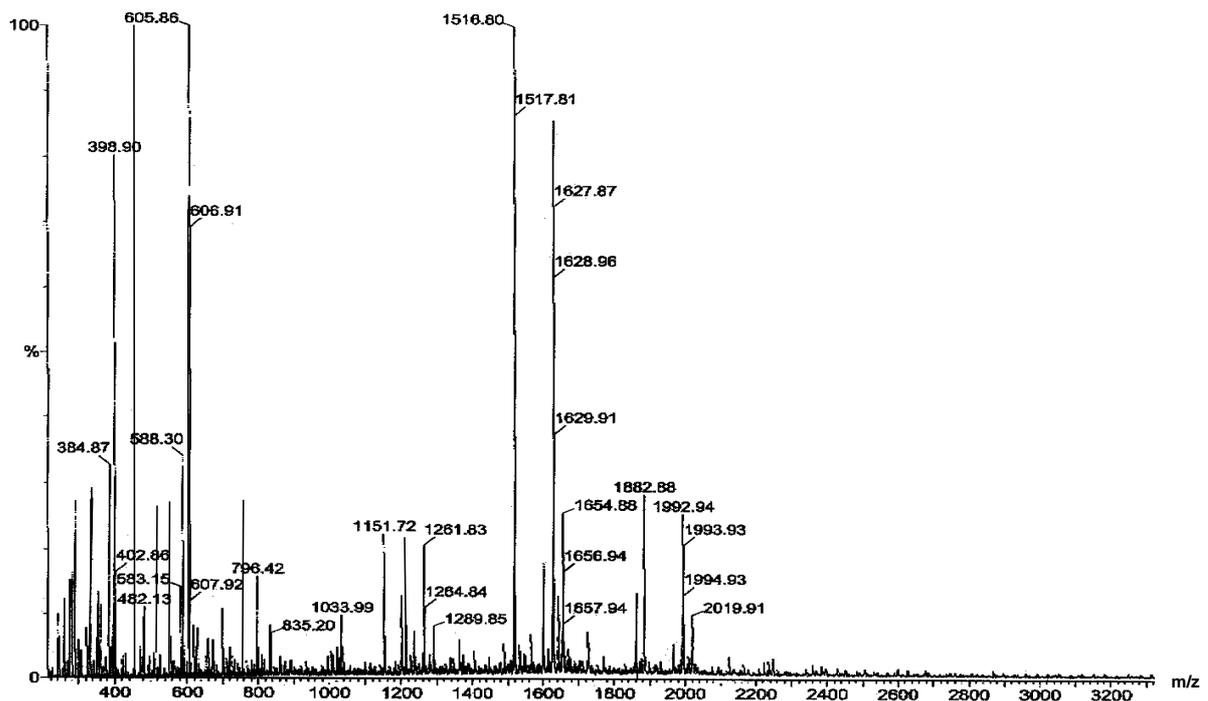


Abbildung 3.20: Nano-ESI QTOF Massenspektrum der Gangliosidfraktion JM08/72-1 aus HL-60 Zellen.

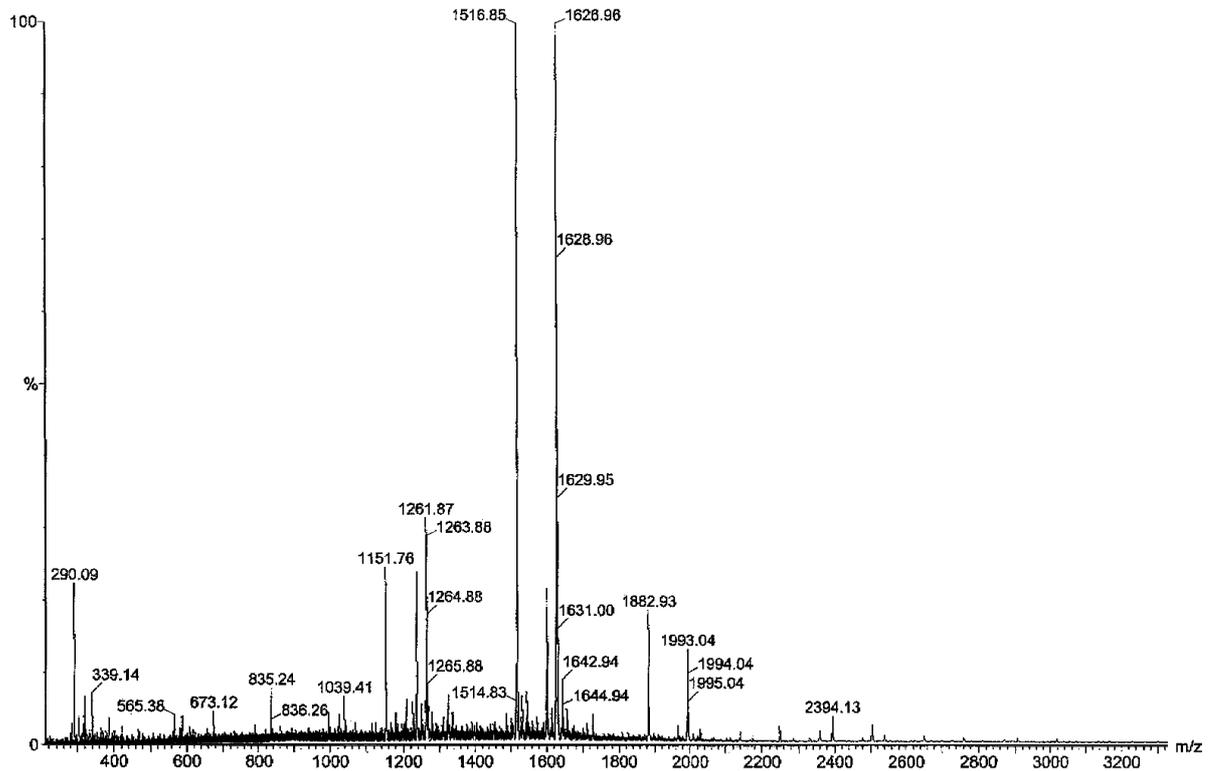


Abbildung 3.21: Nano-ESI QTOF Massenspektrum der aufgereinigten Gangliosidfraktion JM07/7-4 aus humanen Granulocyten.

Tabelle 3.3: Aus den Massezahlen abgeleitete Strukturen der Gangliosidfraktionen.

| Massenzahl [M-H ⁺] | Struktur | Granulocyten | HL-60 |
|--------------------------------|--|--------------|-------|
| 1151 | II ³ Neu5Ac-LacCer (C _{16:0}) | + | + |
| 1261 | II ³ Neu5Ac-LacCer (C _{24:1}) | + | + |
| 1516 | IV ⁶ Neu5Ac-nLc ₄ Cer (C _{16:0}) | + | + |
| 1626 | IV ⁶ Neu5Ac-nLc ₄ Cer (C _{24:1}) | + | + |
| 1881 | VI ³ Neu5Ac-nLc ₆ Cer (C _{16:0}) | + | + |
| 1992 | VI ³ Neu5Ac-nLc ₆ Cer (C _{24:1}) | + | + |
| 2247 | VIII ³ Neu5Ac-nLc ₈ Cer (C _{16:0}) | + | + |
| 2357 | VIII ³ Neu5Ac-nLc ₈ Cer (C _{24:1}) | + | + |
| 2393 | VIII ³ Neu5Ac, V ³ Fuc-nLc ₈ Cer (C _{16:0}) | + | + |
| 2504 | VIII ³ Neu5Ac, V ³ Fuc-nLc ₈ Cer (C _{24:1}) | + | + |
| 2539 | VIII ³ Neu5Ac, VII ³ Fuc, V ³ Fuc-nLc ₈ Cer (C _{16:0}) | + | + |
| 2650 | VIII ³ Neu5Ac, VII ³ Fuc, V ³ Fuc-nLc ₈ Cer (C _{24:1}) | + | + |
| 2759 | X ³ Neu5Ac, VII ³ Fuc-nLc ₁₀ Cer (C _{16:0}) | + | + |
| 2869 | X ³ Neu5Ac, VII ³ Fuc-nLc ₁₀ Cer (C _{24:1}) | + | + |
| 2905 | X ³ Neu5Ac, IX ³ Fuc, V ³ Fuc-nLc ₁₀ Cer (C _{16:0}) | + | + |
| 3017 | X ³ Neu5Ac, IX ³ Fuc, V ³ Fuc-nLc ₁₀ Cer (C _{24:1}) | + | + |

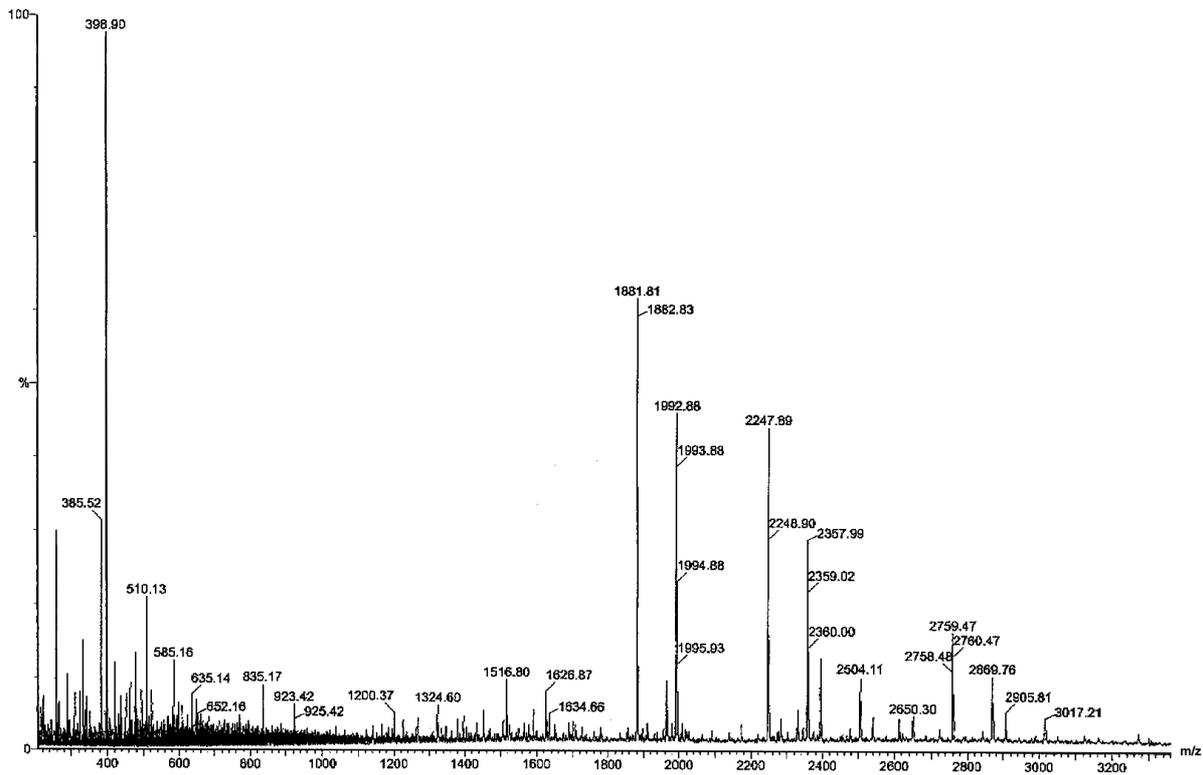


Abbildung 3.22: Nano-ESI QTOF Massenspektrum der Gangliosidfraktion JM07/7-3S aus humanen Granulocyten.

In der JM07/7-3S-Granulocytenfraktion wurden zusätzlich starke Signale oberhalb von 2200 m/z detektiert (siehe Abbildung 3.22). Die daraus abgeleiteten Strukturen sind im unteren Teil der Tabelle 3.3 abgebildet. In Sediment-Gangliosidfraktionen aus HL-60 Zellen wurden diese ebenfalls - allerdings in geringerer Quantität - entdeckt (nicht dargestellt). Sämtliche identifizierten Ganglioside in den Fraktionen aus Granulocyten konnten auch bei Fraktionen aus HL-60 Zellen nachgewiesen werden. Dieser Nachweis rechtfertigt den Einsatz der HL-60 Zellen statt primärer Granulocyten im Zell-Zell-Adhäsionssystem. Die Untersuchung der Hirngangliosidfraktion ergab die Detektion von mono-, di- und tri-sialylierten Strukturen der Ganglioserie (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Identifizierte Strukturen der Hirngangliosidfraktion.

| Struktur | Symbol nach (Svennerholm, 1963) |
|--|---------------------------------|
| $\text{II}^3\text{Neu5Ac-Gg}_4\text{Cer}$ | G_{M1} |
| $\text{IV}^3\text{Neu5Ac,II}^3\text{Neu5Ac-Gg}_4\text{Cer}$ | G_{D1a} |
| $\text{II}^3(\text{Neu5Ac})_2\text{-Gg}_4\text{Cer}$ | G_{D1b} |
| $\text{IV}^3\text{Neu5Ac,II}^3(\text{Neu5Ac})_2\text{-Gg}_4\text{Cer}$ | G_{T1b} |

3.5.2 Detektion der E-Selektin-bindenden Ganglioside

Die einzelnen Gangliosidfraktionen wurden mittels Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (engl.: High Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC) auf Kieselgel 60 HPTLC-Fertigplatten zur Detektion von E-Selektin-bindenden Komponenten getrennt. Die Orcinfärbung der Kohlenhydratanteile offenbarte die Anzahl der Bestandteile der jeweiligen Fraktion (siehe Abbildung 3.23, a). Der Overlay-Assay mit dem CSLEX-Antikörper gab Aufschluß über die Komponenten mit dem für den IgM zugänglichen sLe^x-Epitop (siehe Abbildung 3.23, b) und der E-Selektin-IgG-Overlay ermittelte die E-Selektin-bindenden Anteile (siehe Abbildung 3.23, c). In der Hirngangliosidfraktion dominierten die Strukturen G_{M1}, G_{D1a}, G_{D1b} und G_{T1b}, die sämtlich keine Bindung mit dem CSLEX-Antikörper und dem E-Selektin-IgG-Protein eingingen. Jedoch wurde von dem E-Selektin-IgG eine Struktur gebunden, bei der es sich vermutlich um eine sialylierte Komponente handelt, die in geringer Konzentration vorhanden war. Die HPTLC der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-1 ergab nach der Orcinfärbung eine Anzahl von 16 Banden, von denen 10 aus Doppelbanden bestanden. Demnach enthielt diese Fraktion mindestens 26 ihrem Laufverhalten nach trennbare Komponenten. Die Doppelbanden bestanden vorwiegend aus Molekülen, die sich nur in ihrem Fettsäureanteil (C₁₆ bzw. C₂₄) unterschieden, wobei die C₂₄-gebundene Komponente in dem unpolarem Laufmittel weiter wanderte. Die Einteilung der HPTLC-Platten in Bandenregionen ergab für die Hirngangliosidprobe vier und für die Granulocytengangliosidfraktionen 12 Hauptregionen. Die von Dipl. Chem. Regine Lümen (Lümen, 2001) nach HPTLC-Auftrennung mit anschließender Massenspektrometrie ermittelten Strukturen in diesen Regionen sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

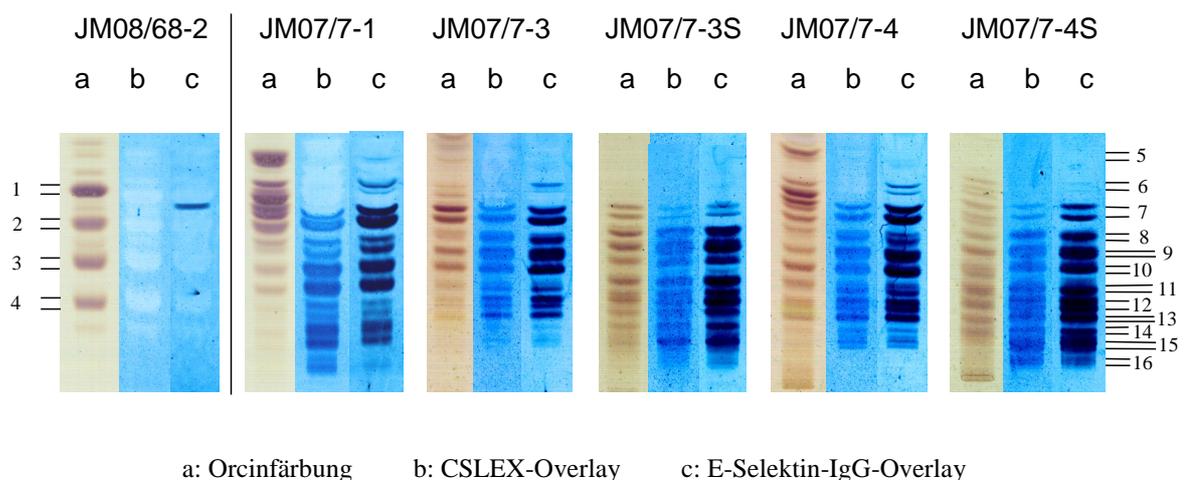


Abbildung 3.23: Nachweis von CSLEX- und E-Selektin-IgG-bindenden Gangliosiden in Gangliosidfraktionen aus humanem Hirn und humanen Granulocysten im HPTLC-Overlay.

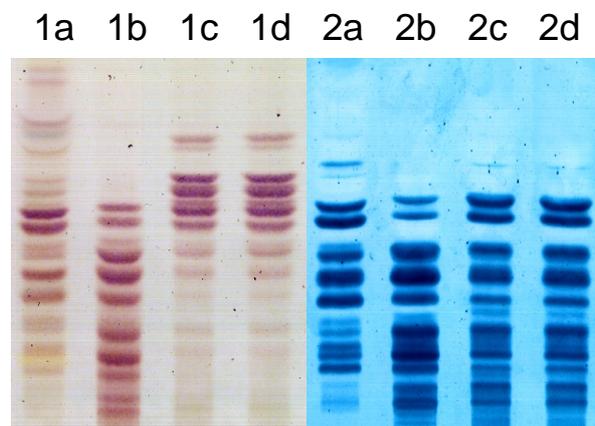
Tabelle 3.5: Strukturen in den Bandenregionen der Gangliosidfraktionen. Unterstrichene Anteile bezeichnen inhärente Epitope bzw. interne Fucosylierungen.

| Bandenregion | Strukturen |
|--------------|---|
| 1 | G _{M1} |
| 2 | G _{D1a} |
| 3 | G _{D1b} |
| 4 | G _{T1b} |
| 5 | G _{M3} |
| 6 | nLc ₄ Cer (C ₁₆ , C ₂₄) |
| 7 | nLc ₄ Cer (C ₁₆), nLc ₆ Cer (C ₁₆ , C ₂₄), nLc ₆ Cer (C ₂₄) mit <u>sLe^x</u> , 1Fuc |
| 8 | nLc ₆ Cer (C ₁₆) mit <u>sLe^x</u> , 1Fuc, nLc ₈ Cer (C ₂₄) |
| 9 | nLc ₈ Cer (C ₁₆), nLc ₈ Cer (C ₂₄) mit <u>sLe^x</u> , 1Fuc |
| 10 | nLc ₈ Cer (C ₁₆) mit <u>sLe^x</u> , 1Fuc, nLc ₈ Cer (C ₂₄) mit <u>sLe^x</u> , 2Fuc, nLc ₈ Cer (C ₂₄) mit <u>1Fuc</u> |
| 11 | nLc ₈ Cer (C ₁₆) mit <u>sLe^x</u> , 1Fuc, nLc ₈ Cer (C ₁₆) mit <u>2Fuc</u> , nLc ₁₀ Cer (C ₂₄) mit <u>VIM2</u> , 1Fuc |
| 12 | nLc ₁₀ Cer (C ₁₆), nLc ₁₀ Cer (C ₂₄) mit <u>1Fuc</u> , nLc ₁₀ Cer (C ₂₄) mit <u>2Fuc</u> |
| 13 | nLc ₁₀ Cer (C ₁₆) mit <u>VIM2</u> , 1Fuc, nLc ₁₀ Cer (C ₂₄) mit <u>2Fuc</u> , nLc ₁₀ Cer (C ₂₄) mit <u>3Fuc</u> |
| 14 | nLc ₁₀ Cer (C ₁₆) mit <u>VIM2</u> , 1Fuc, nLc ₁₀ Cer (C ₁₆) mit <u>sLe^x</u> , 2Fuc, nLc ₁₂ Cer (C ₂₄) mit <u>VIM2</u> , 2Fuc |
| 15 | unbekannt |
| 16 | unbekannt |

Der Hauptanteil der Gangliosidfraktion JM07/7-1 bestand aus G_{M3} sowie Tetra- und Hexaosylceramiden der Neolacto-Serie. Es wurden in den Overlay-Assays mit CSLEX und E-Selektin-IgG die Regionen 8, 9, 10, 11, 14 und 15 deutlich angefärbt, in denen längerket- tige Kohlenhydratstrukturen vorhanden waren. Die Fraktion JM07/7-3 enthielt hauptsäch- lich Komponenten der Regionen 7, 9 und 10. Nach dem Overlay wurden aber verstärkt die Bereiche 12 und 13 statt 14 und 15 angefärbt, die unter anderem Strukturen mit dem

VIM2-Epitop enthielten. Die JM07/7-3S Fraktion beinhaltete noch längere Strukturen, die in den Regionen 15 und 16 detektiert wurden. Dabei resultierte im Bereich 15 ein stärkeres Farbsignal. Die Fraktion JM7/7-4 umfaßte wiederum zusätzliche kürzere Strukturen in den Regionen 5, 6 sowie zwischen 6 und 7, die allerdings keine Bindung im Overlay zeigten. Der Hauptanteil der Fraktion JM7/7-4S war in den Bereichen 9 und 11 bis 14 zu finden. Der Vergleich der von dem CSLEX-Antikörper und dem E-Selektin-IgG-Protein erkannten Komponenten belegte eine identische Übereinstimmung. Das E-Selektin-IgG detektierte allerdings zusätzlich noch Strukturen im Bereich 6 sowie eine Hirngangliosidkomponente. Damit läßt sich zusammenfassend feststellen, daß die Granulocytengangliosidfraktionen mindestens 18 unterschiedliche terminal α 2-3-sialylierte Neolacto-Ganglioside enthielten, die z.T. das sLe^x-Epitop und interne Fucosylierungen trugen und somit E-Selektin-bindende Eigenschaften aufwiesen.

Da im Zell-Zell-Adhäsionstest HL-60-Zellen statt Granulocyten eingesetzt wurden, war es notwendig, die E-Selektin-bindenden Ganglioside von beiden Zelltypen zu vergleichen, um die Aussagefähigkeit des *in vitro*-Adhäsionssystems zu überprüfen. In Abbildung 3.24 sind die Orcinfärbungen (1) und die E-Selektin-IgG-Overlay-Tests (2) nach HPTLC der jeweiligen Gangliosidfraktionen dargestellt.



1: Orcinfärbung
Granulocytenganglioside
HL-60 Ganglioside

2: E-Selektin-IgG-Overlay
a: JM07/7-3 b: JM07/7-3S
c: JM08/72-1 d: JM08/72-2

Abbildung 3.24: Nachweis von E-Selektin-IgG-bindenden Gangliosiden in Gangliosidfraktionen von Granulocyten und HL-60 Zellen im HPTLC-Overlay.

Der Vergleich der Orcinfärbungen zeigte, daß in der Fraktion JM08/72-1 bzw. JM08/72-2 der HL-60 Zellen (siehe Abbildung 3.24, 1c und 1d) quantitativ hauptsächlich Strukturen der Bandenregionen 6 und 7 (vgl. Abbildung 3.23 und Tabelle 3.5) vorhanden waren. In

den Fraktionen JM07/7-3 und JM07/7-3S aus Granulocyten (siehe Abbildung 3.23, 1a und 1b) waren dagegen vorwiegend Ganglioside mit längeren Neutralzuckerketten detektierbar. Qualitativ war das Bandenmuster des E-Selektin-IgG-Overlays der HL-60 Zellen (2c, 2d) jedoch mit dem der JM07/7-3S-Gangliosidfraktion aus den Granulocyten (2b) nahezu identisch. Daraus wurde eine zumindest überwiegende Übereinstimmung E-Selektin-bindender Strukturen abgeleitet und der Einsatz der HL-60-Zellen im zellulären Adhäsionstest gerechtfertigt.

3.6 Das statische Adhäsionssystem

Für eine Wechselwirkung zwischen den membranintegrierten Oberflächenmolekülen der leukocytären und der E-Selektin-exprimierenden Zellen ist ein Kontakt der verschiedenen Zelltypen notwendig. Ein Testsystem sollte möglichst viele Zell-Zell-Kontakte zulassen, um die Signalintensität, also die Anzahl der interagierenden Zellen, zu maximieren. Nicht- oder nur schwach bindende Zellen sollten dagegen für ein hohes Signal/Rauschverhältnis sämtlich entfernt werden. Dazu ist es zweckmäßig, den einen Zelltypus an eine statische Trägermatrix zu binden und den anderen in einem Fluid als Suspension zuzugeben. Als Trägermatrix wurden 96well-Mikrotiterplatten verwendet, in die die adhären-wachsenden HUVEC, CHO-E und CHO-K1 Zellen eingesät wurden, die das Endothel simulierten. Nach Eintreten der Konfluenz wurden durch Zugabe einer HL-60-Suspension definierter Konzentration die Zell-Zell-Adhäsion ermöglicht.

3.6.1 Etablierung des Systems

Für die Etablierung des statischen Systems wurde zunächst nach Möglichkeiten gesucht, die Zell-Zellkontakte zwischen den HL-60 und den E-Selektin-exprimierenden Zellen herzustellen. Die ersten Experimente dienten zur Bestimmung der günstigsten Applikationsmethode der HL-60 Zellen. Diese sollten in möglichst kurzer Zeit vollständig auf den Grund der Kavitäten transferiert werden, wo sie mit dem Layer in Wechselwirkung treten konnten. Dazu wurde ein Vergleich zwischen Sedimentationen mit unterschiedlicher Zelldichte und Zentrifugation der HL-60 Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 3.25).

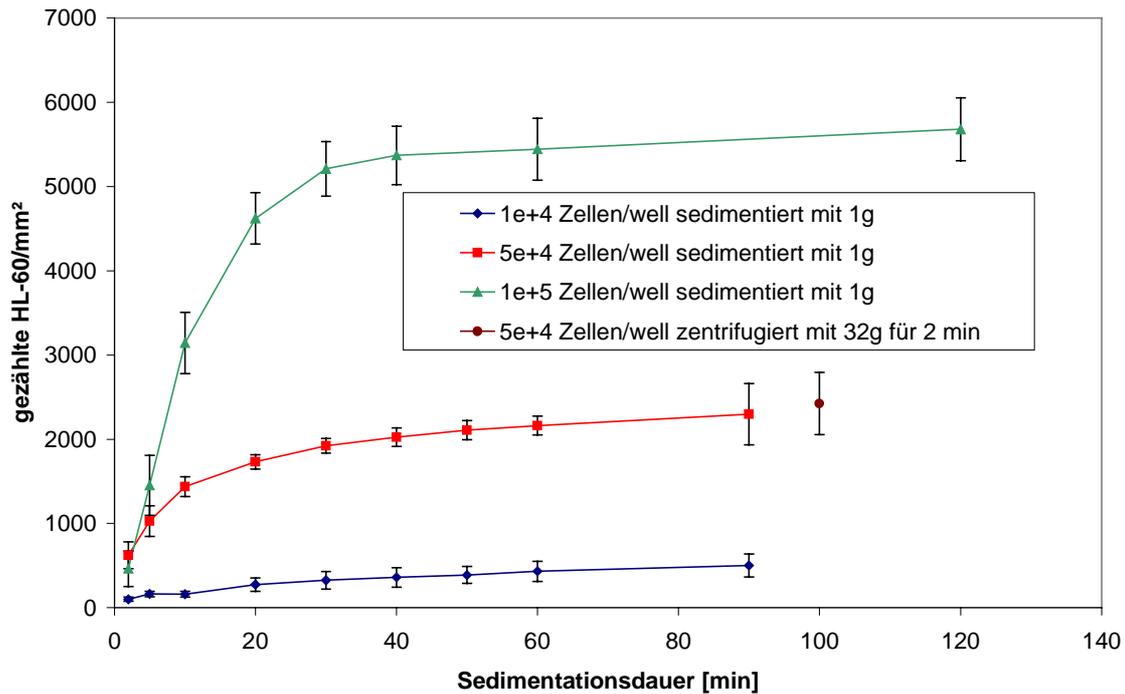


Abbildung 3.25: Anzahl der HL-60 Zellen/mm² auf dem Grund der Kavitäten bei Sedimentation (1·g) und Zentrifugation (32·g).

In diesem Experiment wurden 12 parallele Kavitäten mit $1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ Zellen in einem Volumen von je $100 \mu\text{L}$ Medium/well befüllt und die am Grund befindlichen Zellen auf einer Fläche von 4 mm^2 mit dem Adhex-System ausgezählt. Nach einer Sedimentationsdauer von 10 Minuten waren 32% der niedrig-, 45% der mittel- und 56% der hochkonzentrierten Suspension bezogen auf die Vergleichswerte bei 90 Minuten am Grund angelangt. Selbst bei einer Dauer von 60 Minuten sind noch nicht alle Zellen bis zum Boden sedimentiert, da eine Zunahme der Anzahl von 432 auf 502, 2162 auf 2296 bzw. 5444 auf 5681 Zellen/mm² zum Ende des jeweiligen Ansatzes gemessen wurde. Eine Zentrifugation bei 32·g für zwei Minuten ergab einen Wert von 2424 Zellen/mm². Dabei wurde zur Vermeidung von hohen Querschleunigungen, die ein Rollen der Zellen über den Grund verursachen, die Bremse der Zentrifuge deaktiviert, so daß sich die zweiminütige Zentrifugation um weitere zwei Minuten mit langsam abnehmender Zentrifugalbeschleunigung verlängerte. Daraus erklärt sich der im Vergleich zur Sedimentation bei 64 Minuten um 11% höhere Zählwert. Eine Verlängerung der Zentrifugationsdauer auf 10 Minuten ergab ebensowenig eine Zunahme der Zellen am Grund, wie Zentrifugationen bei 49·g für eine Dauer von zwei bis zehn Minuten. Dagegen wurden bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 18·g erst nach 10 Minuten die maximalen Zählwerte registriert. Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Zentrifugation bei 32·g für zwei Minuten mit ausgeschalteter Zentrifugenbremse als optimale Methode der HL-60 Applikation.

Entscheidend für die genaue Quantifizierung der Interaktion zwischen den HL-60 Zellen und den E-Selektin-exprimierenden Zellen ist das Entfernen der nicht-adhären HL-60 Zellen. Dabei sollte auf sämtliche Zellen die gleiche Ablösekraft wirken.

Versuche mit puffergefüllten Kammern, in denen die 96well-Mikrotiterplatten zur Entfernung der nicht-adhären HL-60 Zellen mit der Oberseite nach unten gedreht wurden, erwiesen sich als ebenso unpraktikabel wie eine Zentrifugation mit umgedrehter Platte. Entweder war die Kraft bei der Sedimentation nicht ausreichend, oder Luftblasen drangen in einzelne wells ein, bewegten sich über den Zellayer und lösten damit HL-60 Zellen ab. Zur Lösung des Problems wurde ein programmierbarer Spülautomat für Mikrotiterplatten verwendet. Ausgerüstet mit 12 Düsen zum Einspritzen und 12 Rüsseln zum Absaugen sollte dieser für eine standardisierte und reproduzierbare Entfernung nicht-gebundener Zellen und somit für eine Reproduzierbarkeit der Zählergebnisse sorgen, die bei Spülung mit einer 12Kanalpipette von Hand aufgrund individueller Bedienung nicht möglich ist. Für eine variable Einstellmöglichkeit der Ablösekraft wurde daher auf ein homogenes Kraftfeld im well verzichtet. Streng genommen wird das statische System durch das turbulente Eindüsen zu einem dynamischen System während des Ablösevorgangs der Zellen. Das System ist jedoch statisch bezüglich des Adhäsionsvorganges. Die Bezeichnung „statisches System“ wurde daher beibehalten. Da mit dem Adhex-System fest programmierbaren Bereiche der Kavitäten ausgezählt wurden, war eine Quantifizierung unter standardisierten Bedingungen möglich.

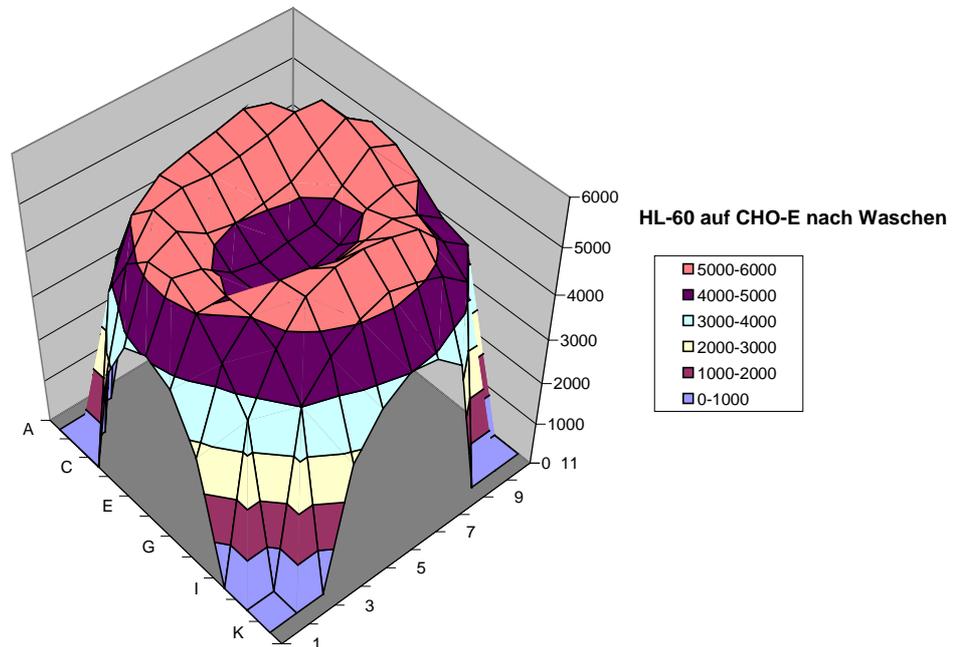


Abbildung 3.26: Adhäsionsprofil der Anzahl adhärenter HL-60 Zellen auf einem CHO-E-Zellayer in einer Kavität nach Waschen mit dem Mikrotiterplattenspülgerät.

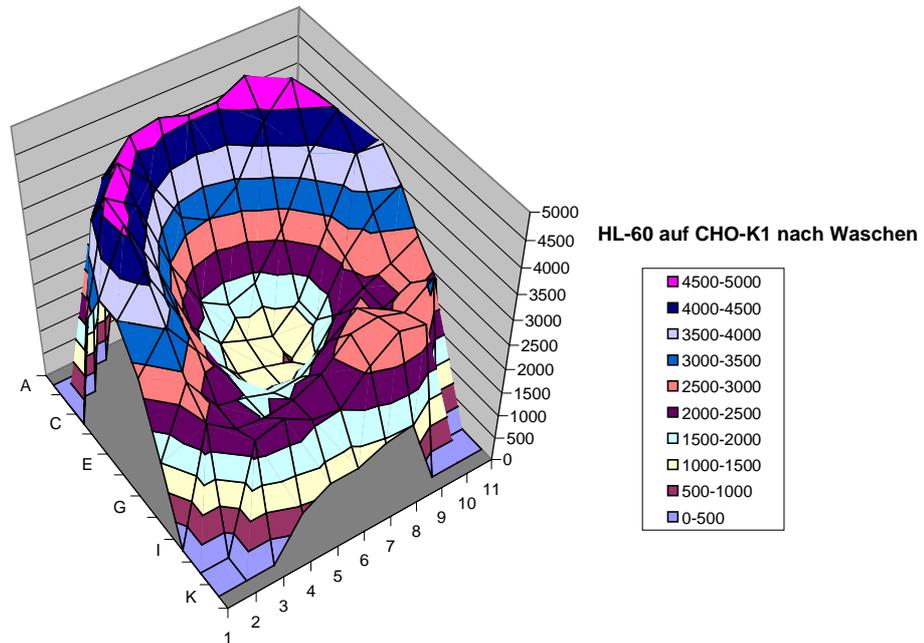


Abbildung 3.27: Adhäsionsprofil der Anzahl adhärierter HL-60 Zellen auf einem CHO-K1-Zellayer (Negativkontrolle) in einer Kavität nach Waschen mit dem Mikrotiterplattenspülgerät.

Die Inhomogenität der Verteilung der adhärerten HL-60 Zellen nach dem Spülen wird durch Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27 verdeutlicht. Nach Zugabe von $1,35 \cdot 10^5$ HL-60 Zellen in einem Volumen von je $100 \mu\text{L}$ Medium/well wurde ein noch nicht optimiertes Spülprogramm angewendet. Es unterschied sich von der endgültigen Version in der Aspirationstiefe, auf die der Meniskus nach jedem Spülvorgang abgesaugt wird (*aspiration depth*: 11,0 mm), der Absaugtiefe beim gleichzeitigen Eindüsen (*overflow hite*: 10,0 mm), der Eindüsgeschwindigkeit (*fluid flow*: -2) und der Anzahl der Zyklen (*cycles*: 4). Dabei sind die Zahlenangaben in mm Geräte- und Mikrotiterplatten-bedingt. Die Entfernung wird vom Düsenarm aus angegeben. Für den verwendeten Plattentyp galt eine Beschränkung von 13 mm als maximale Tiefe, bei der der Plattengrund berührt wurde, und 6 mm als minimale Tiefe, bei der die *wells* fast vollständig befüllt waren. Ein *Scan* der kompletten *wells* zeigte zum Rand hin ein bis auf Null absinkendes Zählergebnis, das aufgrund eines Schatteneffektes verursacht durch Lichtbrechung am Meniskus der Fluidoberfläche zustande kam. Dieser Effekt war bedingt durch die Ausschlußparameter der Mustererkennungsoftware. Des weiteren war ein ringförmiger Bereich maximaler Anzahl HL-60 Zellen zu erkennen. Proximal zum Eindüspunkt wurde eine abnehmende Zahl ermittelt, deren Minimum direkt am Eindüspunkt lag. Dort wurden auf einer Fläche von 4 mm^2 im Durchschnitt 4854 (sd 242) HL-60/ mm^2 CHO-E-Layer und 1222 (sd 332) HL-60/ mm^2 CHO-K1-Layer ermittelt. Die Position dieses Bereiches (siehe Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27

E5, G5, E7, G7) wurde in der Adhex-Software als Muster gespeichert und für alle Kavitäten der 96well-Mikrotiterplatten zur Auszählung angefahren.

Das Spülprogramm wurde weiterhin optimiert, da mit den obigen Einstellungen noch etwa 1200 HL-60 Zellen/mm² auf dem CHO-K1-Layer E-Selektin-unspezifisch verblieben.

Zunächst wurde die Anzahl der notwendigen Spülwiederholungen ermittelt, die zur vollständigen Entfernung der HL-60 Zellen aus dem fixierten Zählbereich unbewachsener wells notwendig waren. Dies war erforderlich, um eine E-Selektin-unspezifische Wechselwirkung der HL-60 mit CHO-K1 Zellen detektieren zu können. Dabei wurde vorausgesetzt, daß die Suspensionszellen nicht während der Versuchsdauer an den Polystyrol-Mikrotiterplattenboden binden.

Im Unterschied zu den oben genannten Einstellungen wurde die Eindüsgeschwindigkeit auf das Minimum (*fluid flow*: -5) reduziert, da sich bei vorherigen Spülexperimenten mit einer Geschwindigkeitseinstellung von -2 in einigen wells Zellen aus dem CHO-K1-Layer gelöst hatten. Für eine spätere schrittweise Anpassung an ein maximales, aber Layer-schonendes Spülen wurde bereits für dieses Experiment ohne CHO-E oder CHO-K1 Zellen die Spülgeschwindigkeit reduziert.

Jeweils $1 \cdot 10^5$ HL-60 Zellen wurden in Volumina von 100 μ L pro Kavität einpipettiert und für 30 Minuten sedimentiert. Dabei wurden pro Spülansatz zehn parallele wells befüllt. Anschließend wurden die Zellen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Spülwiederholungen aus den wells gewaschen und die Zählbereiche ausgewertet (siehe Abbildung 3.28).

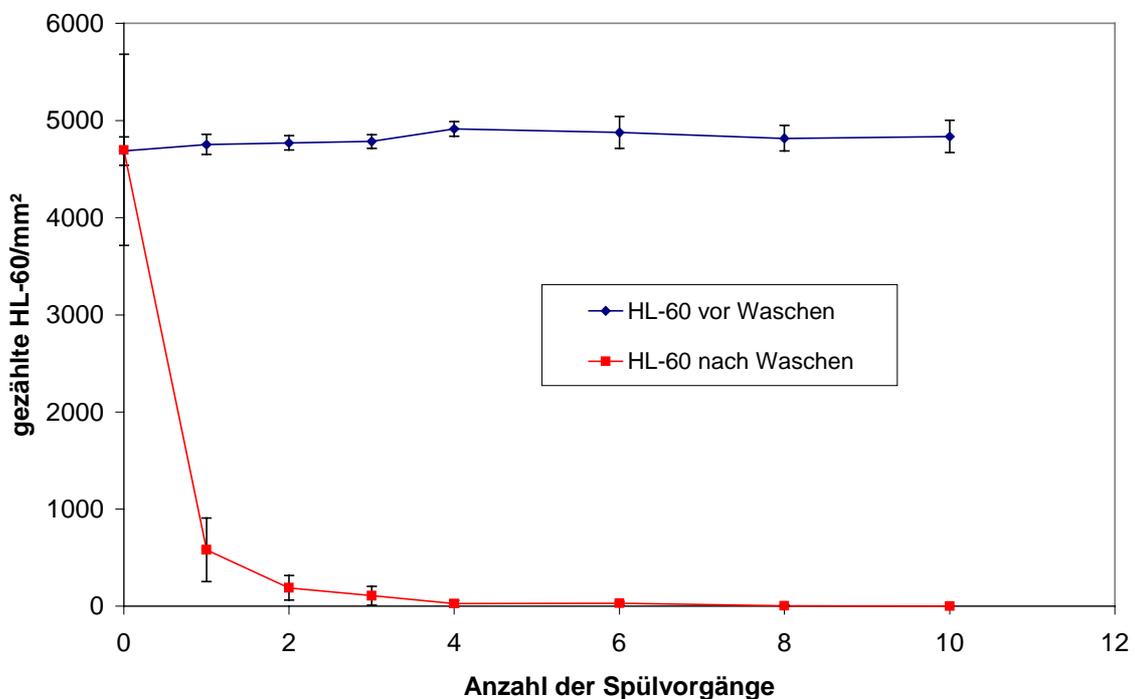


Abbildung 3.28: Am Boden verbleibende HL-60 Zellen in Kavitäten ohne CHO-Layer in Abhängigkeit der Anzahl der Spülvorgänge.

Die Anzahl der am Boden befindlichen HL-60 Zellen vor dem Spülen betrug 4687 bis 4913 Zellen/mm² mit einem durchschnittlichen Wert von 4805 (sd 67). Bereits nach einem Spülvorgang wurde die Anzahl um 88% auf 582 (sd 326) vermindert. Nach zwei Spülvorgängen befanden sich noch 191 (sd 126), nach drei 108 (sd 97), vier 29 (sd 33), sechs 30 (sd 21), acht 4 (sd 6) und nach zehn Spülungen nur noch eine (sd 1) Zelle im Zählbereich. Zur Beschränkung des Spülpufferverbrauchs wurde die Anzahl der Spülvorgänge auf sechs eingestellt und letztendlich ein Fehler von 0,6% der Zellen, die als adhärenz gezählt wurden, akzeptiert.

Weiterhin wurde der Einfluß der Aspirationstiefe bei jedem Spülvorgang ermittelt. Es wurden in jeweils 12 parallele wells pro Spülansatz $1,35 \cdot 10^5$ HL-60 Zellen in Volumina von 100 µL pro Kavität einpipettiert, für zwei Minuten mit 32·g auf konfluente CHO-E- bzw. CHO-K1-Layer zentrifugiert, bei variierter Aspirationstiefe gespült und ausgezählt (siehe Abbildung 3.29). Vor dem Waschen wurden durchschnittlich 422 (sd 231) mehr HL-60 Zellen auf dem CHO-K1-Layer als auf dem CHO-E-Layer gezählt, obwohl in alle Kavitäten die gleiche Suspension pipettiert wurde. Aufgrund der kugelförmigen Morphologie einiger CHO-K1 Zellen, die sich trotz Konfluenz noch teilten und auf der Layeroberfläche zu finden waren, wurden diese vom Mustererkennungsoperator als HL-60 Zellen „erkannt“.

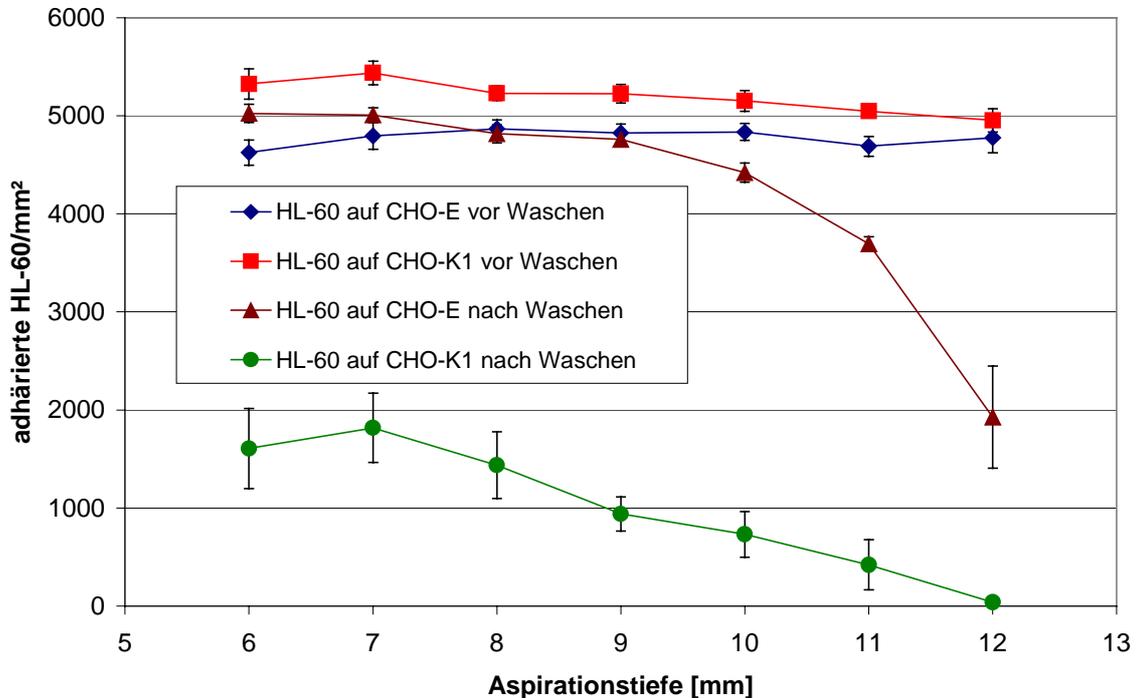


Abbildung 3.29: Adhärenz HL-60 Zellen/mm² auf CHO-E- und CHO-K1-Layer vor und nach Waschen mit variierter Aspirationstiefe.

Die CHO-E Zellen zeigten diese Eigenschaft nicht. Eine Aspirationstiefe von 6 bis 8 mm ergab keine Ablösung der an die CHO-E gebundenen HL-60 Zellen. Es adhärten mit Werten zwischen 4816 und 5025 Zellen/mm² gleich viele, oder sogar mehr Zellen als vor dem Waschen. Die Anzahl der gezählten HL-60 Zellen auf dem CHO-K1-Layer wurde dagegen bereits deutlich von 5230 bis 5437 auf 1436 bis 1816 Zellen/mm² vermindert.

Ab einer Aspirationstiefe von 10 bis 12 mm wurden HL-60 Zellen auch von dem CHO-E-Layer abgelöst (siehe Abbildung 3.29). Die Einstellung von 12 mm führte zu einer Reduktion der adhärten Zellen von 4777 (sd 155) auf 1927 (sd 522) Zellen/mm² auf dem CHO-E-Layer und von 4953 (sd 118) auf 39 (sd 13) Zellen/mm² auf dem CHO-K1-Layer. Das bedeutet, daß unter diesen Bedingungen die spezifische E-Selektin-sLe^x-Bindung zwischen CHO-E und HL-60 Zellen ab einer Aspirationstiefe von 10 mm aufgehoben wird und sich die HL-60 Zellen vom CHO-E Zellayer ablösen. Weiterhin wurden bei dieser Einstellung auch etwa 380 CHO-K1 Zellen/mm², die als HL-60 Zellen gewertet wurden, mit abgelöst. Für das Spülprogramm wurde also eine Aspirationstiefe von 9 mm eingestellt und die Spülgeschwindigkeit von -5 auf -4 erhöht.

Um die Adhäsion der HL-60 Zellen an alle E-Selektin-Moleküle zu garantieren sollten die HL-60 Zellen im Verhältnis zu der potentiellen Bindungsfläche des CHO-E-Layers im Überschuß vorhanden sein. Dazu wurden $1,08 \cdot 10^6$ Zellen und sieben in 1:2 Schritten verdünnte HL-60 Zellsuspensionen bis zu einer Anzahl von $8,44 \cdot 10^3$ Zellen in 100 µL Volumina pro well einpipettiert, für zwei Minuten mit 32·g auf die CHO-Layer zentrifugiert, gezählt, mit dem Spülautomaten gewaschen und anschließend erneut ausgezählt. Sechs parallele Kavitäten wurden für jeden Konzentrationsansatz ausgewertet (siehe Abbildung 3.30).

Bis zu einer Anzahl von $1,35 \cdot 10^5$ Zellen/well nahm die Anzahl adhärterter HL-60 Zellen vor dem Waschen linear zu. In dieser Anzahl bedeckten 5085 (sd 187) Zellen 60% der dargebotenen Fläche pro mm². Mit einer weiteren Steigerung zählte das Mustererkennungsprogramm aufgrund der Transparenz der HL-60 Zellen auch noch aufliegende Zellen bis zu einem Spitzenwert von 7963 (sd 11) Zellen/mm². Dies entspricht einer Überdeckung von 93% der Layeroberfläche. Bedingt durch die kugelförmige Morphologie der HL-60 Zellen ist auch bei idealer Packdichte ohne Deformation der Zellen mit einer Schicht nur eine Abdeckung von 86% der Oberfläche möglich. Die Randbereiche der Zellen überschneiden sich derart, daß die morphologischen Charakteristika optisch für den Zähloperator an eine Grenze geraten. Dies wird auch deutlich durch die geringen Standardabweichungen ab einer Zellzahl von mehr als 7200 Zellen/mm², die um den Faktor 3 bis 34 niedriger sind als im geringeren Konzentrationsbereich. Nach dem Waschen verbleiben bei den Ansätzen mit hohen Zellkonzentrationen 5533 (sd 110) Zellen/mm² auf dem CHO-E-Layer bei 65%iger Ausnutzung der dargebotenen Fläche.

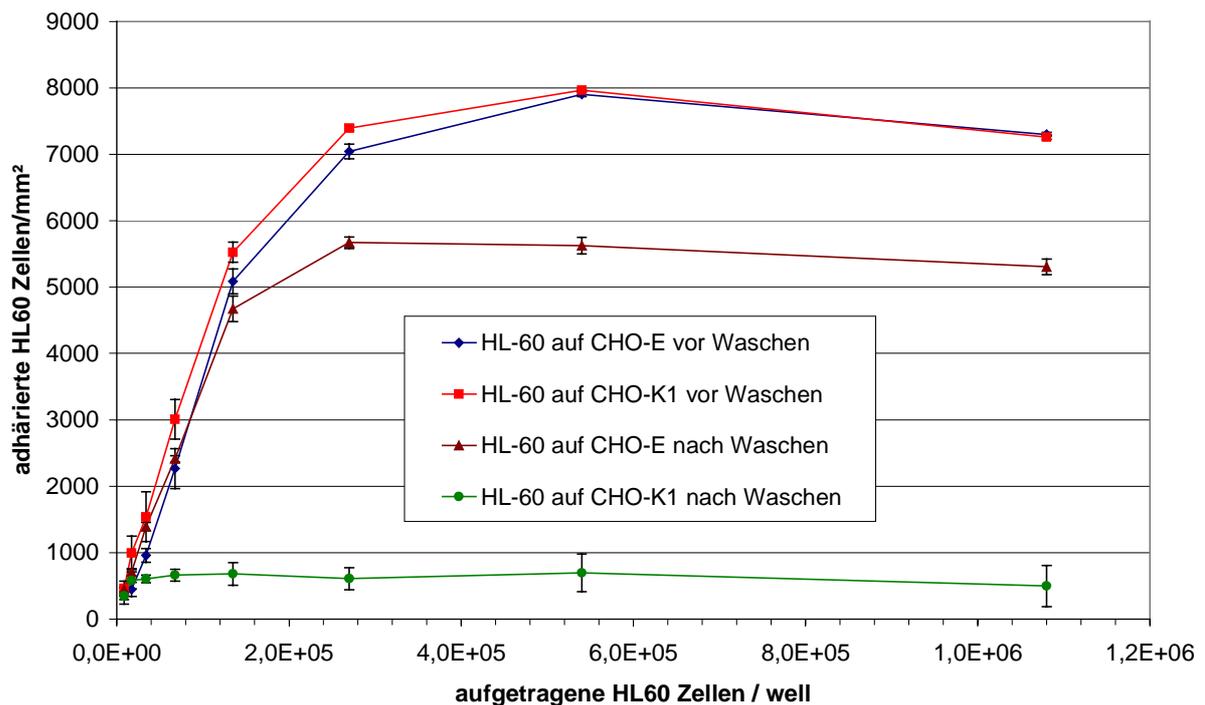


Abbildung 3.30: Anzahl adhärierter HL-60 Zellen/mm² auf CHO-E- bzw. CHO-K1-Zellayer vor und nach Waschen in Abhängigkeit der applizierten HL-60 Anzahl.

Die Anzahl der nach dem Waschen auf dem CHO-K1-Layer verbleibenden HL-60 Zellen war sehr niedrig und ergab unabhängig von der aufgetragenen Zellzahl einen relativ konstanten Wert von 585 (sd 116) HL-60 Zellen/mm². Die Anzahl der HL-60 Zellen, die für die statischen Adhäsionstests pro Kavität eingesetzt wurden, wurde auf einen Wert von $1,35 \cdot 10^5$ Zellen/well begrenzt, da eine Verdoppelung der eingesetzten Konzentration durchschnittlich lediglich ein um 12% höheres Zählergebnis ergab. Aus ökonomischen Gründen war somit eine größere Zellkonzentration im Adhäsionstest nicht sinnvoll da mit den folgenden Experimenten die sLe^x-Antigene der HL-60 Zellen mit dem produzierten CSLEX-Antikörper und dem E-Selektin-IgG-Protein maskiert werden sollten.

Das System wurde auf die Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Zählergebnisse nach Zentrifugation der HL-60 auf einen CHO-E-Layer ohne Waschen und nach dem Waschen mit dem Spülautomaten geprüft. Die Programmeinstellungen entsprachen den in Kapitel 2.8.1 angegebenen Werten. Nach Zugabe von $1,35 \cdot 10^5$ HL-60/well in 100 μ L Volumina folgte eine 2minütige Zentrifugation bei 32-g und das anschließende Zählen mit dem Adhex-System. Die erhaltenen Zellzahlen sind in Abbildung 3.31 jeweils in den linken Säulen dargestellt. Sie stellen die Mittelwerte aus den Zählergebnissen der Kavitäten B bis G für jede der 12 Spalten der 96well-Mikrotiterplatte dar. Nach dem Auftragen der HL-60 Zellen und der Zentrifugation wurde eine mittlere Zellzahl von 5437 (sd 61) HL-60 Zellen/mm² CHO-E-Layer festgestellt. Die durch die Pipettierung und die Zentrifugation

entstandene mittlere Ungenauigkeit im Vergleich der Spalten betrug somit 2,2%. Die Abweichung innerhalb jeder einzelnen Spalte variierte in Bereichen zwischen 3,0% in Spalte 2 und 8,6% in Spalte 1, mit einem mittleren Fehler von 5,2%.

Nach Anwendung des Spülprogramms war ein Vergleich der Zählergebnisse in Abhängigkeit von der jeweiligen Düse möglich. Die erhaltenen Werte sind in den rechten Säulen der Abbildung 3.31 dargestellt. Die mittlere Zellzahl aller 12 Spalten betrug 5171 (sd 84) HL-60 Zellen/mm² CHO-E-Layer. Somit wurden im Mittel 266 HL-60 Zellen aus jeder Kavität ausgewaschen. Die Ungenauigkeit der Ergebnisse bezogen auf die Spalten untereinander war mit einem Wert von 3,2% geringfügig größer als vor dem Spülen. Die kleinste Abweichung innerhalb der einzelnen Spalten wurde in Spalte 11 mit einem Wert von 2,4%, die größte in Spalte 12 mit einem Wert von 11,0% gemessen. Der mittlere Fehler innerhalb der einzelnen Spalten betrug 4,8%.

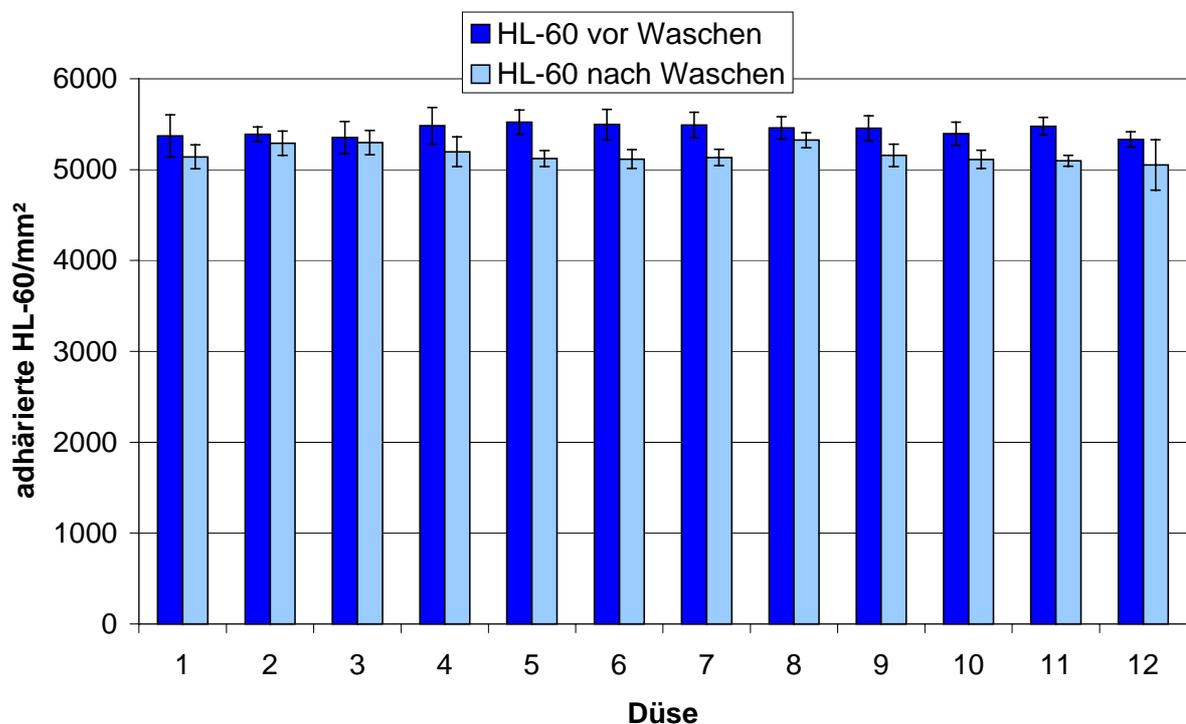


Abbildung 3.31: Zählergebnisse von adhären HL-60 Zellen auf einem CHO-E-Layer vor und nach Anwendung des Spülprogramms „ADHEX 96“.

Die ermittelte Ungenauigkeit von 4,8% des statischen Systems nach der kompletten Testdurchführung mit CHO-E Zellen wurde als ausreichend gewertet und die Prozedur somit für alle weiteren Experimente unverändert übernommen.

Für die Etablierung des statischen Adhäsionssystems mit HUVEC wurden ebenfalls Experimente mit unterschiedlicher Aspirationstiefe, auf die der Meniskus nach jedem Spülvorgang abgesaugt wird (*aspiration depth*), Absaugtiefe beim gleichzeitigen Eindüsen (*overflow hite*), Eindüsgeschwindigkeit (*fluid flow*) und Anzahl der Spülzyklen (*cycles*) durchgeführt. HUVEC lösten sich im Vergleich zu CHO-E-Zellen wesentlich leichter vom Un-

tergrund ab, folglich mußte das System auf die schonendsten Bedingungen eingestellt werden, da sonst Endothelzellen am Eindüspunkt abgespült wurden. Die Aspirationstiefe wurde von 9 auf 6 mm reduziert, um eine höhere Flüssigkeitssäule zu erhalten, die die Strömungsgeschwindigkeit am Grund und damit die Ablösekraft verringerte. Die Strömungsgeschwindigkeit wurde auf das Minimum von -5 gesetzt, und nur ein Spülzyklus durchgeführt. Nach einer vierstündigen Inkubation der HUVEC mit $50 \text{ ng/mL IL-1}\beta$ zur Induktion der E-Selektin-Expression wurde der statische Adhäsionstest unter Zugabe von $1,35 \cdot 10^5$ HL-60 Zellen in Volumina von $100 \mu\text{L}$ pro Kavität durchgeführt. Die Mittelwerte aus den Kavitäten E bis G, der auf dem Endothelzellayer für die Spalten 1 bis 12 verbleibenden HL-60 Zellen nach Ablauf der Prozedur, sind in Abbildung 3.32 dargestellt.

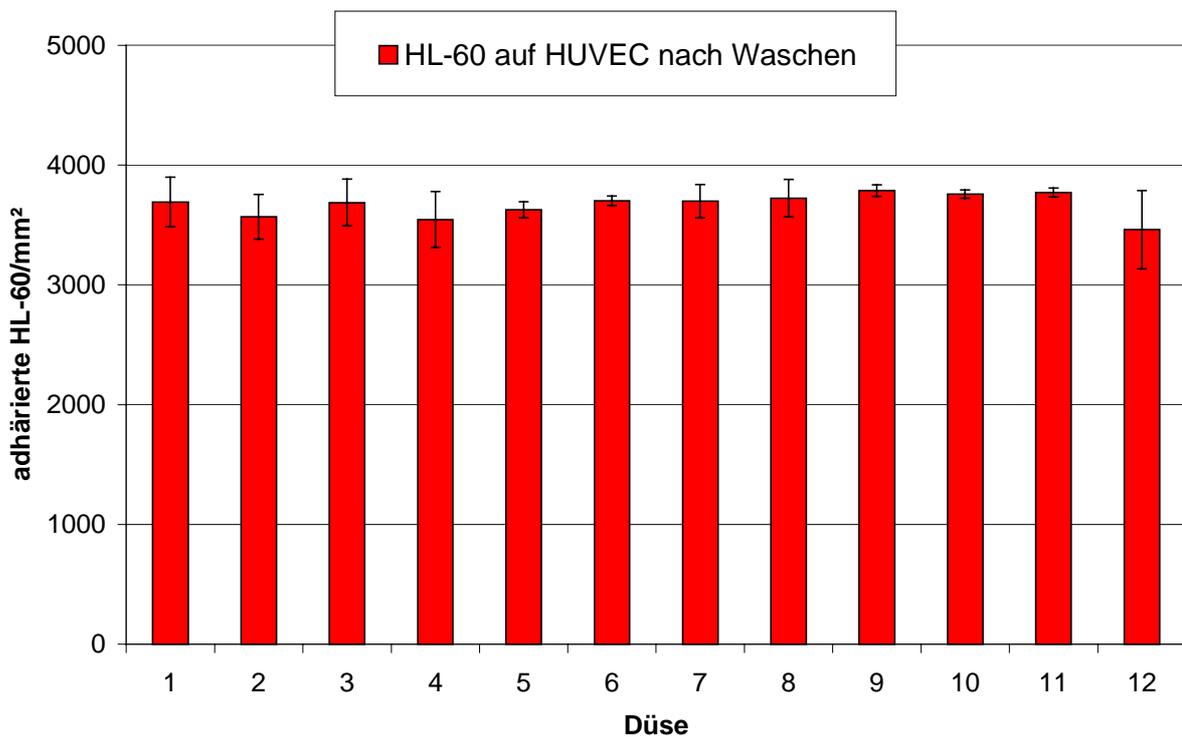


Abbildung 3.32: Zählergebnisse von adhärennten HL-60 Zellen auf einem für vier Stunden mit $50 \text{ ng/mL IL-1}\beta$ induzierten HUVEC-Layer nach Anwendung des Spülprogramms „HUVEC 96“.

Die mittlere Zellzahl aller 12 Spalten betrug 3669 (sd 139) HL-60/mm² HUVEC-Layer. Somit wurde eine, bezogen auf diese Zellzahl, mittlere Abweichung der Zählergebnisse von $7,6\%$ festgestellt. Die größten Abweichungen innerhalb einer Spalte wurden dabei in Spalte 12 mit einer Schwankungsbreite von $18,9\%$ und die niedrigsten in Spalte 11 mit 2% registriert. Der mittlere Fehler betrug dabei $7,7\%$. Bedingt durch das einmalige Spülen verblieben noch HL-60 Zellen in dem Puffer oberhalb des HUVEC-Layers, die innerhalb der ca. 26 Minuten bei der optischen Auswertung pro Platte sedimentierten. Aus diesem Grunde wurde eine Vergleichszählung ohne HUVEC durchgeführt, bei der im Mittel 106 (sd 30) HL-60 Zellen in den ausgezählten Regionen auf dem Polystyrol verblieben. Zusammen addierte sich damit die Ungenauigkeit des statischen Systems mit den HUVEC-

Layern auf 9,7%. Sie war im Vergleich zur Prozedur mit CHO-E Zellen somit etwa doppelt so hoch.

3.6.2 Zell-Zell-Adhäsion

Der Einfluß von bovinen Serumbestandteilen auf die Zell-Zell Adhäsion

Zunächst wurde der Einfluß von bovinen Serumbestandteilen auf die HL-60/CHO-E Zell-adhäsion untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene FCS-Chargen, eine NCS-Charge (engl.: newborn calf serum), sowie serumfreies Medium verwendet. Jeweils die Hälfte dieser Seren wurde für 30 Minuten bei 56°C hitzeinkubiert, um die in den Seren enthaltenen Complement-Proteine zu inaktivieren. Anschließend erfolgte die Applikation der Seren, die in seriellen 1:2-Verdünnungsreihen in serumfreiem DMEM/F12 Medium pipettiert wurden, sowie die Zugabe der HL-60 Zellen in HEPES-Puffer, so daß letztendlich Serumkonzentrationen von 0-16,7% (v/v) vorlagen. Nach Durchführung des statischen Adhäsionsassays ergab sich aus den Zählergebnissen weder eine quantitative noch eine qualitative Beeinflussung der Zell-Zell-Adhäsion durch Serumbestandteile. Die Hitzeinaktivierung hatte ebenfalls keinen Einfluß auf das Adhäsionsvermögen. Die Zählergebnisse lagen in ihrer Gesamtheit in einem Fehlerbereich von 3,3% und damit unterhalb der Test-Fehlerbreite von 4,8%.

Die Adhäsion von HL-60 Zellen an murines P-Selektin

Die Adhäsionsfähigkeit der HL-60 Zellen an P-Selektin exprimierende CHO-P Zellen wurde im folgenden untersucht (siehe Abbildung 3.33). Von 5252 (sd 303) pro mm² aufgegebenen HL-60 Zellen wurden nach Beendigung der Prozedur im Durchschnitt 4,7 (sd 1,6) Zellen/mm² auf dem CHO-P-Layer wiedergefunden. Somit zeigten die HL-60 Zellen in diesem statischen Adhäsionssystem keine Affinität zu P-Selektin. Dies ließ den Schluß zu, daß die von der ATCC gelieferten HL-60 Zellen kein PSGL-1 (engl.: P-selectin glycoprotein ligand-1) exprimierten (Lenter *et al.*, 1994) oder die post-translationalen Modifikationen nicht vollständig durchführten, da dieses Molekül normalerweise eine Bindung über das HECA-452 Epitop (Tu *et al.*, 1999) zu P-Selektin ausbildet (Ma *et al.*, 1994). Notwendig für eine Bindung ist eine Sialylierung und Fucosylierung der O-glykosidisch gebundenen Poly-N-Acetyl-Lactosamine sowie eine Tyrosinsulfatierung (Moore *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996; Snapp *et al.*, 1998). PSGL-1 wurde auf humanen Neutrophilen, Monocyten und Eosinophilen detektiert (Davenpeck *et al.*, 2000). Es scheint auch E-Selektin binden zu können, jedoch mit einer 50fach niedrigeren Affinität als P-Selektin (Moore *et al.*, 1994). Der für diese Arbeit verwendete HL60-Zellklon unterschied sich aufgrund der P-Selektin-negativen Bindungseigenschaften von dem HL-60 Klon, der im Genetics Institute (Massachusetts, U.S.A.) positiv in bezug auf seine PSGL-1 Expression getestet und von dem das

PSGL-1 kloniert wurde (Sako *et al.*, 1993). Dadurch konnten Einflüsse dieses Moleküls auf das Adhäsionsverhalten ausgeschlossen werden.

Die Adhäsion von HL-60 Zellen an murines E-Selektin

Die HL-60 Zellen wiesen eine hohe Affinität zu den E-Selektin-exprimierenden CHO-E Zellen auf (siehe Abbildung 3.33 und Abbildung 3.35). Von durchschnittlich 4607 (sd 150) pro mm^2 zugegebenen HL-60 Zellen wurden nach Durchführung des Adhäsionsassays 4782 (sd 89) detektiert. Damit adhärten statistisch sämtliche HL-60 Zellen nach der Spülprozedur noch auf dem CHO-E-Layer.

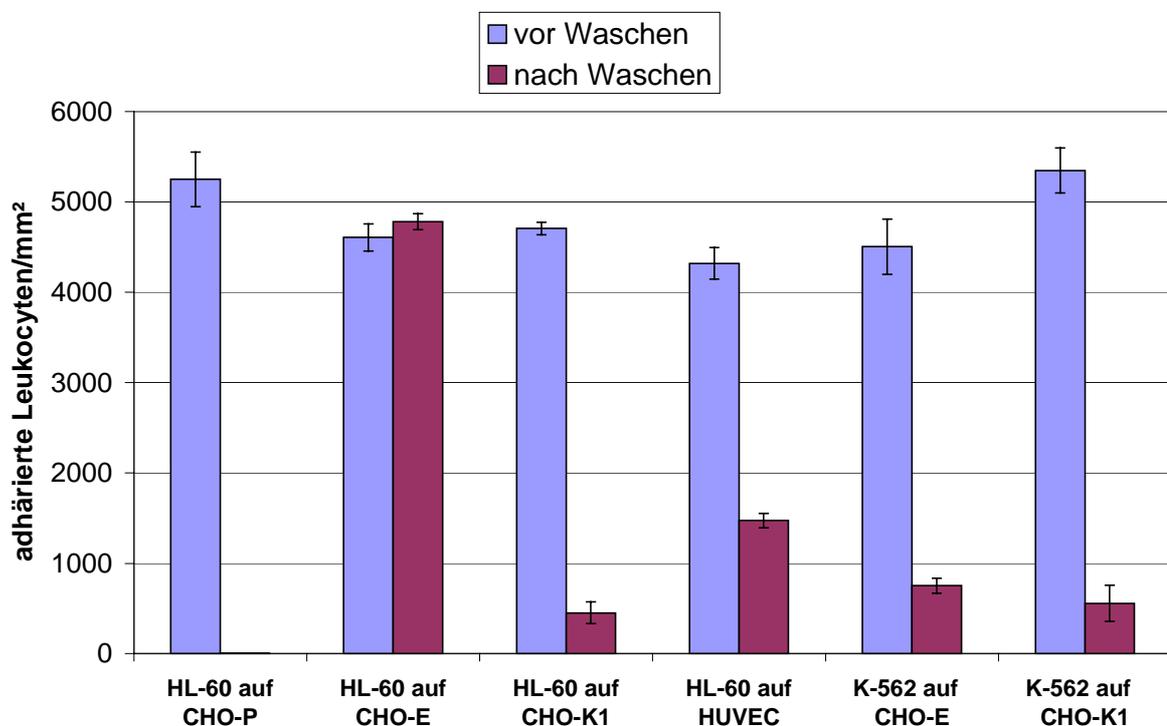


Abbildung 3.33: Anzahl der adhärten HL-60 bzw. K-562 auf CHO-P, CHO-E, CHO-K1 und HUVEC vor und nach Anwendung des Spülprogramms.

Auf den als Negativkontrolle eingesetzten CHO-K1 Zellen verblieben von den anfänglich 4705 (sd 68) HL-60/ mm^2 weniger als 100. Das Adhex-System ermittelte eine durchschnittliche Anzahl von 452 (sd 120) HL-60/ mm^2 . Dabei „erkannte“ das Mustererkennungsprogramm die auf dem Layer befindlichen kugelförmigen CHO-K1 Zellen, die nicht durch das Spülen abgewaschen wurden als HL-60 Zellen (siehe Abbildung 3.34). Dies wurde durch das Auszählen von konfluenten Kavitäten mit CHO-K1 Zellen bestätigt. Da aber auch ein vorheriges Quantifizieren dieser Zellen keine Aussage über die Anzahl der nach Zugabe von HL-60 Zellen und anschließender Waschprozedur verbleibenden CHO-

K1 Zellen liefern konnte, wurde dieser Zählfehler akzeptiert. Die HL-60 Zellen hatten demzufolge eine vernachlässigbare Affinität zu CHO-K1 Zellen, da lediglich 2% der Ausgangszahl nach der Spülprozedur adhärierte.

Aus den Ergebnissen der beiden Experimente konnte geschlossen werden, daß die HL-60 Zellen spezifisch an E-Selektin binden und nicht an ein CHO-zellspezifisches Membran-gebundenes Molekül.

Die Adhäsion von HL-60 Zellen an humanes E-Selektin

Die Verwendung von primären HUVEC sollte klären, ob die Affinität der humanen HL-60 Zellen für humanes E-Selektin vorhanden war. Das membranständige E-Selektin der CHO-E Zellen ist der Sequenz nach Maus-homolog. Dabei weisen die Aminosäuren des murinen E-Selektins eine 73% Übereinstimmung zum humanen Pendant auf (Becker-André *et al.*, 1992). Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Hamsterzellen dem Protein eine andersartige post-translationale Modifikation zufügen, die letztendlich einen Einfluß auf das Bindungsverhalten haben könnte. Aus diesem Grunde wurde das Adhäsionsverhalten der HL-60 Zellen auf HUVEC-Layern getestet, deren E-Selektin-Expression zuvor durch vierstündige Inkubation mit 50 ng/mL Interleukin-1 β induziert wurde.

Von 4320 (sd 175) zugegebenen HL-60 Zellen pro mm² HUVEC-Layer verblieben nach der Waschprozedur 1474 (sd 81) und damit 34,1% der Ausgangszellzahl (siehe Abbildung 3.36). Jedoch war die bei Konfluenz präsentierte Membranoberfläche einer einzelnen Zelle des HUVEC-Layers mit einem Wert von 1380 μm^2 /Zelle um den Faktor 3,5 größer als derjenige für CHO-E Zellen, die bei Konfluenz eine zellspezifische Oberfläche von 400 μm^2 /Zelle besaßen. Bei gleicher Syntheserate müßte also die membranständige E-Selektindichte bei den CHO-E Zellen größer sein, was auch tatsächlich anhand von Fluoreszenzaufnahmen mit markierten Antikörpern nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurde nicht jede Zelle in dem gleichen Maße zur E-Selektin-Expression stimuliert. Etwa ein Drittel der Endothelzellen waren vollständig von HL-60 Zellen freigespült. Hingegen waren zum Eindüspunkt (in den gezeigten Adhex-generierten Bildern jeweils oben rechts) einige Zellen noch vollkommen mit HL-60 Zellen überdeckt. Aus dieser Heterogenität innerhalb gleicher Radien und damit annähernd gleicher Spülkräfte resultierte der Schluß, daß etwa 35% der Endothelzellen E-Selektin nicht oder nur unzureichend exprimierten. Die aus diesem System mit HUVEC erhaltenen maximalen Zählergebnisse waren deshalb entsprechend niedriger als diejenigen des CHO-E Adhäsionstests. Folglich wurde eine E-Selektin-spezifische Adhäsion der HL-60 Zellen mit den humanen Endothelzellen festgestellt.

Die Adhäsion von K-562 Zellen an murines E-Selektin

Die K-562 Zellen wurden zur Kontrolle der Sialyl-Lewis^x-Abhängigkeit der E-Selektin-vermittelten Adhäsion eingesetzt. Lediglich 2% der Zellen dieser Zelllinie exprimieren sLe^x

und 33% synthetisieren Lewis^x-Strukturen. Dagegen sind 80% der Zellen positiv für VIM2 Epitope (Schlossman, 1995). Von 4506 (sd 305) pro mm² zugegebenen K-562-Zellen adhärten nach Ablauf des Spülprogramms noch 752 (sd 85) auf dem CHO-E-Layer. Im Vergleich zu der E-Selektin-Negativkontrolle mit dem CHO-K1-Layer, auf dem nach Zugabe von 5348 (sd 248) HL-60/mm² noch 556 (sd 248), abzüglich der etwa 400 mitgezählten CHO-K1 Zellen auf dem Layer, also ca. 150 Zellen verblieben, wiesen die K-562-Zellen eine fünffach höhere Affinität zum CHO-E-Layer auf. Insgesamt verblieben 16,7% der eingesetzten Zellen auf dem CHO-E-Layer, wobei im Bereich des Eindüspunktes in der Kavität alle K-562-Zellen abgespült wurden (siehe Abbildung 3.37). Das VIM2-Epitop schien damit keine relevante Bedeutung für die E-Selektin-vermittelte Adhäsion zu haben. HL-60 Zellen eignen sich für E-Selektin-Bindungstests besser.

Die vom Adhex-System generierten Bilder der Adhäsionsstudien sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Gezeigt wird jeweils das linke untere der vier Bilder pro ausgezählter Kavität. Die Eindüspunkte sind dementsprechend rechts oberhalb der Bilddiagonalenverlängerung. Dabei beträgt die dargestellte Kantenlänge der Bilder im *well* 1 mm.

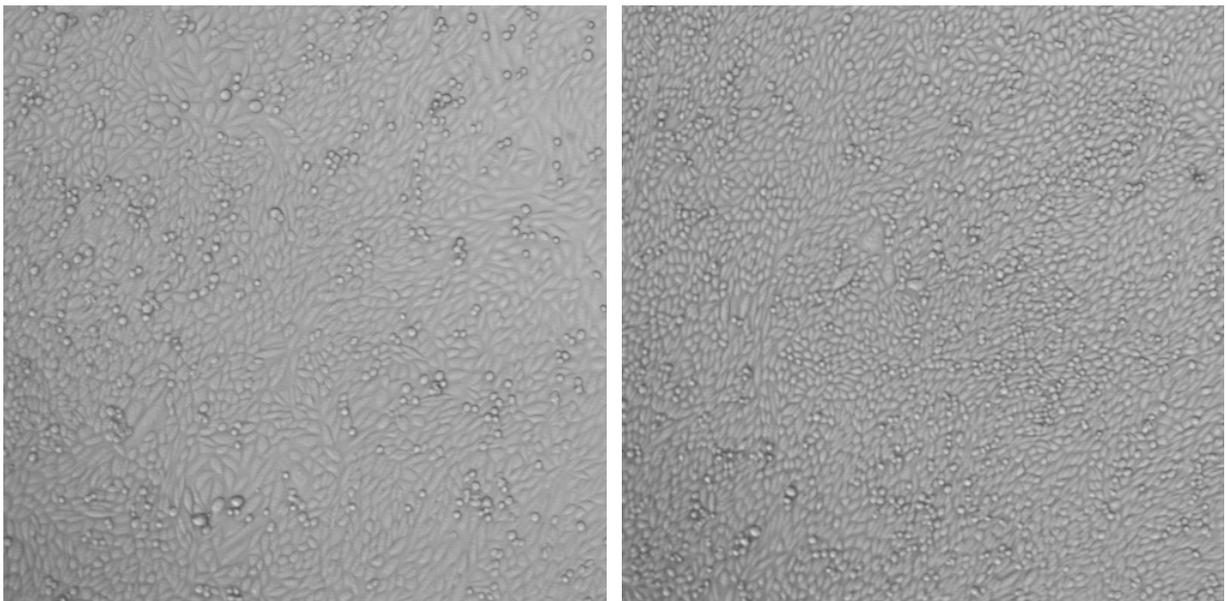


Abbildung 3.34: links: CHO-K1-Layer vor Zugabe der HL-60 Zellen.
rechts: HL-60 auf CHO-K1 nach Anwendung des Spülprogramms.

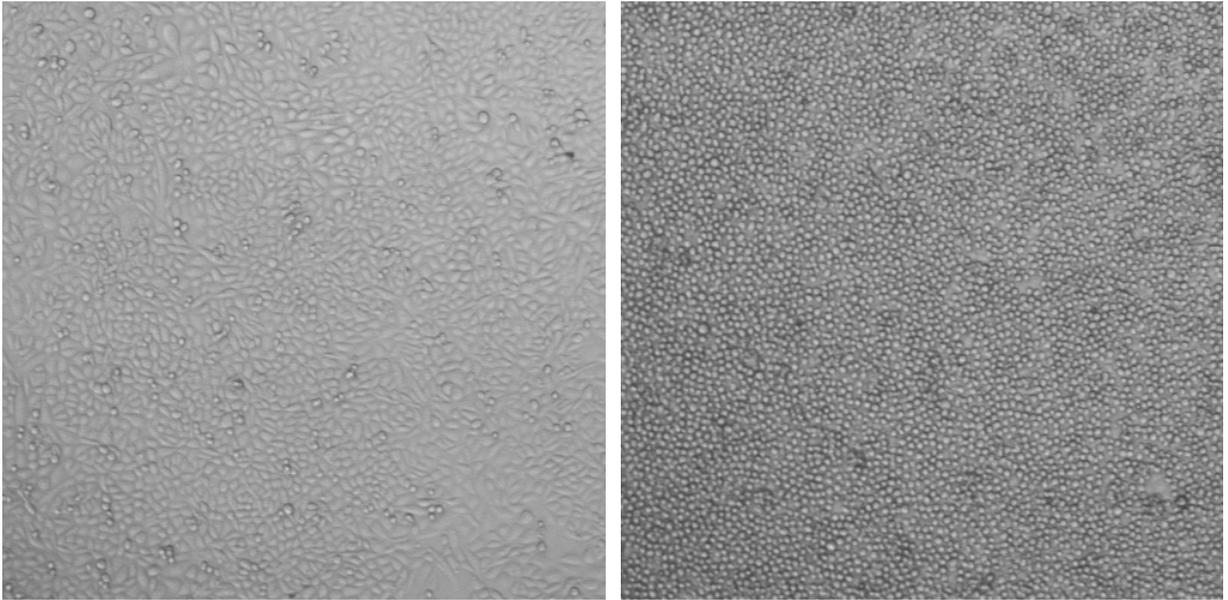


Abbildung 3.35: links: CHO-E-Layer vor Zugabe der HL-60 Zellen.
rechts: HL-60 auf CHO-E nach Anwendung des Spülprogramms.

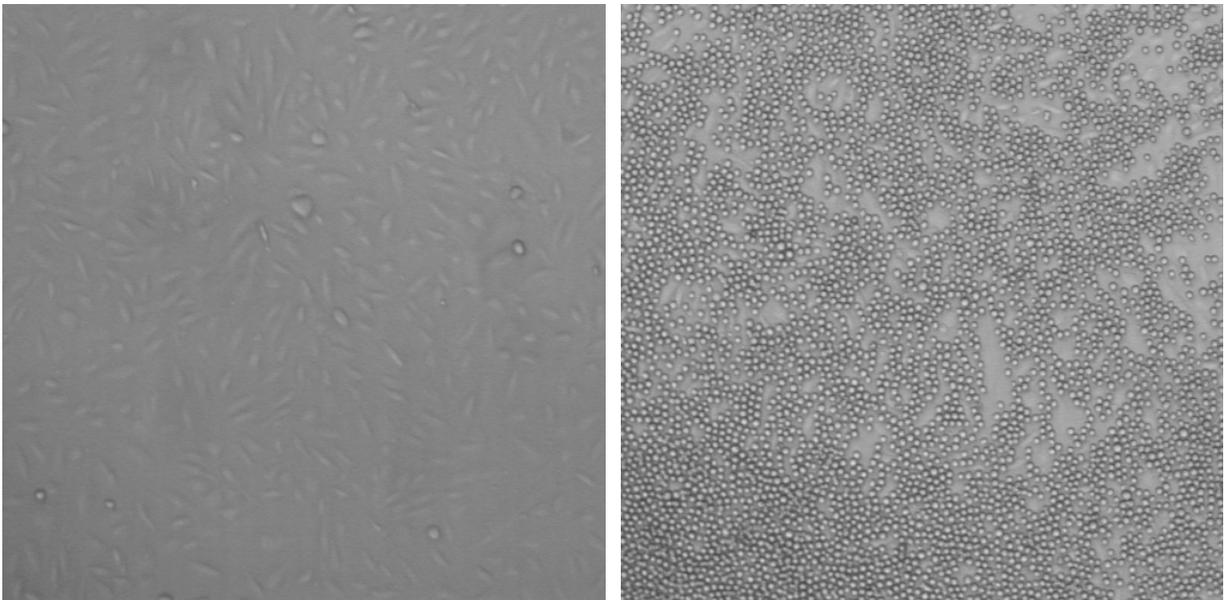


Abbildung 3.36: links: HUVEC-Layer vor Zugabe der HL-60 Zellen.
rechts: HL-60 auf HUVEC nach Anwendung des Spülprogramms.

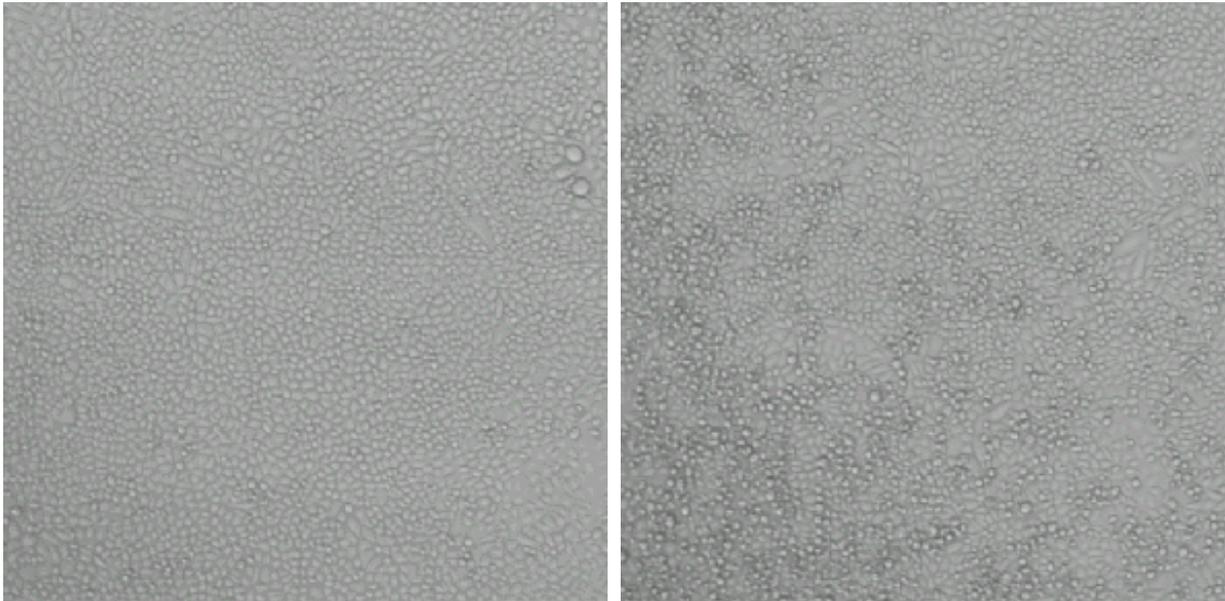


Abbildung 3.37: links: CHO-E-Layer vor Zugabe der K-562 Zellen.
rechts: K-562 auf CHO-E nach Anwendung des Spülprogramms.

Der Einfluß leukocytärer Integrine auf die HL-60/HUVEC Adhäsion

Die Adhäsion der HL-60 Zellen auf den mit IL-1 β induzierten HUVEC stellt noch keinen zwingenden Beweis für eine ursächliche Wechselwirkung der sLe^x-Epitope mit E-Selektin dar. Insgesamt sind zwischen diesen beiden Zelltypen, im Gegensatz zu der Wechselwirkung von HL-60 Zellen mit CHO Zellen, theoretisch mindestens sieben weitere Adhäsionsmechanismen denkbar (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Potentielle Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden der HL-60/HUVEC Zell-Zell-Adhäsion.

| HL-60-Membran-gebundene Komponente | HUVEC- Membran-gebundene Komponente |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| sLe ^x | E-Selektin |
| PSGL-1 | P-Selektin, (E-Selektin) |
| L-Selektin | CD 34 |
| LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) | ICAM-1, ICAM-2 |
| Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) | ICAM-1 |
| VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) | VCAM-1 |

Da die HL-60 Zellen in dem statischen Adhäsionssystem auf den HUVEC-Layer zentrifugiert wurden und bis zum Abspülen ca. vier Minuten Zeit vergingen, kann der unter Um-

ständen vorhandene Beitrag einer Integrin/Adhäsion-Wechselwirkung zur Zell-Zell-Adhäsion während des statischen Zustandes nicht absolut ausgeschlossen werden.

Der Einfluß des PSGL-1 wurde bereits durch die Unfähigkeit der HL-60 Zellen an P-Selektin zu binden als nicht existent betrachtet. Aufgrund der PSGL-1 Defizienz ist auch die um den Faktor 50 schwächere Bindungsstärke dieses Moleküls zu E-Selektin für die betreffende Zell-Zell-Adhäsion irrelevant.

Eine weitere mögliche Ursache der zellulären Adhäsion war eine Wechselwirkung von L-Selektin zu dem CD34 Antigen. Allerdings wird die CD34-Expression auf HUVEC nach Zugabe von IL-1 β bzw. TNF- α vollständig eingestellt (Delia, *et al.*, 1993; Norton *et al.*, 1993), so daß auch dieser Bindungsmechanismus für diese Studien unerheblich war.

Die verbleibenden vier vorgeschlagenen Interaktionen beruhen auf der Wechselwirkung von HL-60-Integrinen mit HUVEC-Adhäsinen der Immunglobulin-Gensuperfamilie. Die Integrine bestehen aus einer α - und einer β -Polypeptidkette, die nicht-kovalent assoziiert sind. Sie werden konstitutiv auf der Zellmembranoberfläche in einem inaktiven Zustand exprimiert und besitzen auf der α -Untereinheit mehrere Ca²⁺-Bindungsstellen. Nach Aktivierung des Integrins durch ein Zell-spezifisches Signal interagiert ein Integrinaktivator-komplex mit der cytoplasmatischen Domäne, so daß sich die Konformation des Proteins ändert und es von einem niedrigaffinen in einen hochaffinen Zustand überführt wird. Integrine sind für die statische Adhäsion, den dritten Schritt der Adhäsionskaskade nach dem Tethering und Rolling, verantwortlich.

Das LFA-1 (engl.: lymphocyte function-associated antigen-1) besteht aus der α_L - und der β_2 -Polypeptidkette. Es ist somit den β_2 -Integrinen zugehörig. Eine Mutation in dem β_2 -Gen bewirkt eine beim Menschen beobachtete Leukocytenadhäsionsdefizienz (engl.: leukocyte adhesion deficiency; LAD I), bei der es aufgrund des Fehlens der β_2 -Integrine zu keiner statischen Adhäsion der Leukocyten am Endothel kommt (Buckley, 1993). Die I-Domäne (engl.: insertion domain) der α -Kette des LFA-1 bindet an die erste Ig-Domäne der interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 (Casanovas, *et al.*, 1997, Bella *et al.*, 1999) und ist auf 25-95% der unstimulierten HL-60 Zellen präsent (Miller *et al.*, 1986; Prieto *et al.*, 1994). Ein weiteres β_2 -Integrin ist der Complementrezeptor 3, dessen geläufiger Name „Mac-1“ sich von „Makrophage“ (engl.: macrophage), auf dem er besonders häufig vorkommt, ableitet (Springer *et al.*, 1979). Die $\alpha_M\beta_2$ -Einheit wird jedoch nur von 0-20% der HL-60 Zellen exprimiert. Allerdings ist dieses Integrin hauptverantwortlich für die statische Adhäsion von Granulocyten auf Endothelzellen, da 10% aller Oberflächen-Mac-1-Moleküle noch 90% der gesamten funktionalen Aktivität aufweisen (Diamond and Springer, 1993). Es bindet an ICAM-1, nicht aber an ICAM-2.

Aus der Tatsache, daß Endothelzellen konstitutiv ICAM-2 exprimieren, ergab sich die Möglichkeit, den quantitativen Beitrag der LFA-1/ICAM-2-Bindung zu ermitteln. Dazu wurden nicht-induzierte HUVEC in dem statischen Adhäsionsystem verwendet. Im Zählergebnis wurden im Mittel eine Anzahl von 244 (sd 84) HL-60/mm² bestimmt. Abzüglich der 106 (sd 30) HL-60/mm², die während der Meßdauer aus dem überstehenden Puffer sedimentierten, adhärten also 2,7% der Ausgangszellzahl möglicherweise aufgrund der LFA-1/ICAM-2-Wechselwirkung.

Ein weiteres Heterodimer aus $\alpha_4\beta_7$ -Untereinheiten, früher als „LPAM-1“ bezeichnet, wird nur auf einer Lymphocytensubpopulation exprimiert (Schweighoffer *et al.*, 1993). HL-60 sind defizient für die β_7 -Kettenexpression. Deshalb fehlt ihnen dieses Integrin (Prieto *et al.*, 1994). Folglich findet die sonst mögliche $\alpha_4\beta_7$ /VCAM-1-Interaktion zwischen HL-60 und Endothelzellen nicht statt.

Das β_1 -Integrin VLA-4 (engl.: very late antigen-4) wird von 25-90% unstimulierter HL-60 Zellen synthetisiert (Bohnsack and Chang, 1994; Prieto *et al.*, 1994) und bindet an VCAM-1 (engl.: vascular cell adhesion molecule-1), ein Adhäsins der Immunglobulin-Gensuperfamilie (Elices *et al.*, 1990). VCAM-1 wird nicht konstitutiv sondern nach Induktion durch IL-1 β oder TNF- α von Endothelzellen exprimiert. Die maximale Expressionsrate ist nach 6-12 Stunden erreicht; nach 24 Stunden werden noch etwa 85% und nach 48 Stunden noch 64% auf der Endothelzellmembran exponiert (Masinovsky *et al.*, 1990; Swerlick *et al.*, 1992).

Der Einfluß der möglichen LFA-1/ICAM-1, Mac-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1 Interaktionen im statischen Adhäsionssystem zwischen HL-60 und HUVEC wurde im folgenden untersucht. Da weder anti-VCAM-1 bzw. anti-ICAM-1 Antikörper in ausreichender Menge für die zellulären Assays noch primäre E-Selektin-defiziente HUVEC als Negativkontrolle vorhanden waren, wurde zunächst die Calcium-Abhängigkeit der Zell-Zell-Wechselwirkung zwischen den HL-60/CHO-E und den HL-60/HUVEC ermittelt. Dazu wurden HL-60 Zellen in PBS gewaschen und zu den - für zwei Minuten mit EDTA/PBS inkubierten - Layern gegeben. Als Chelatbildner komplexiert EDTA zweiwertige Kationen, wodurch die, für eine Selektin- und Integrin-Wechselwirkung mit den jeweiligen Bindungspartnern notwendigen, Ca^{2+} -Ionen entzogen werden. Nach Ablauf der Prozedur adhärten auf dem CHO-E-Layer 3880 (sd 602) HL-60 Zellen/ mm^2 in PBS ohne EDTA-Einfluß (siehe Abbildung 3.38). Eine Konzentration von 100 mM EDTA führte zu einer Anzahl von 7 (sd 5) HL-60/ mm^2 . Höhere EDTA-Konzentrationen resultierten in einer Ablösung des Zellayers. Die halbmaximale Inhibition wurde bei einer EDTA-Konzentration von 12,5 mM mit einer Anzahl von 1747 (sd 94) HL-60 Zellen bereits überschritten. Somit konnte die strikte Calciumabhängigkeit der E-Selektin-vermittelten Adhäsion bestätigt werden.

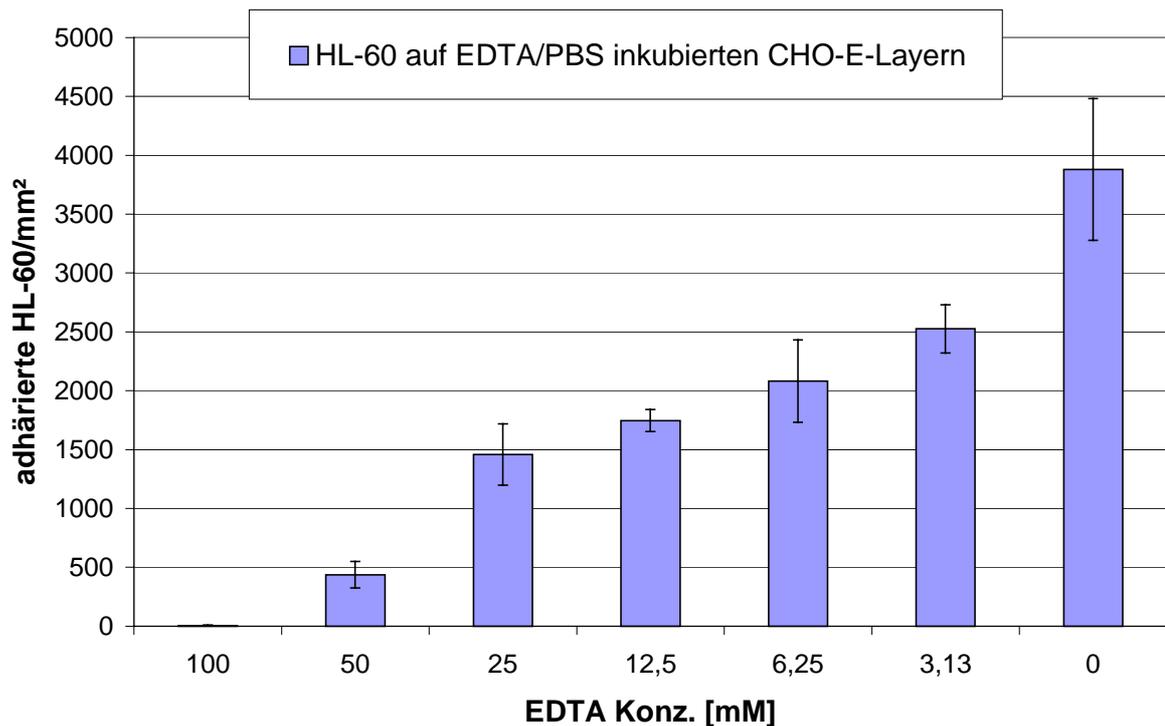


Abbildung 3.38: Anzahl adhärierter HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern bei Entzug von Ca^{2+} -Ionen durch EDTA zum Nachweis der Calcium-Abhängigkeit der E-Selektin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion.

Das gleiche Experiment wurde mit induzierten HUVEC durchgeführt, die zuvor für vier Stunden einer Konzentration von 50 ng/mL IL-1 β ausgesetzt waren (siehe Abbildung 3.39). Dabei adhärten ohne EDTA-Einfluß 1983 (sd 515) HL-60 Zellen/mm². Bereits eine Konzentration von 3,13 mM reduzierte diesen Wert um 75,1% auf 493 (sd 170). Somit war die Calcium-abhängige Wechselwirkung zwischen HL-60 Zellen und HUVEC mindestens um den Faktor vier schwächer als die Wechselwirkung zwischen HL-60 und CHO-E Zellen. Die EDTA-Konzentration von 100 mM führte zu einer adhärten Anzahl von 308 (sd 124) HL-60 Zellen/mm². Berücksichtigt man die durch Sedimentation der verbleibenden HL-60 Zellen verursachte zu subtrahierende Zellzahl von 106 (sd 30) Zellen/mm², waren de facto 4% der HL-60 Zellen nicht durch Calcium-Entzug zu entfernen. Auch in diesem Fall führten höhere EDTA-Konzentrationen zu einem Ablösen des Layers. Die postulierten 2,7% der ursprünglich zugegebenen HL-60 Zellen, die aufgrund von LFA-1/ICAM-2-Interaktion binden sollten (siehe oben), adhärten also durch nicht-Selektin- oder Integrin-vermittelte Wechselwirkungen. Insgesamt betrachtet war der überwiegende Anteil von 96% der Zell-Zell-Adhäsion zwischen HL-60 Zellen und HUVEC nach IL-1 β -Induktion Calcium-abhängig. Die Adhäsion beruhte demzufolge auf E-Selektin- bzw. Integrin-abhängigen Mechanismen.

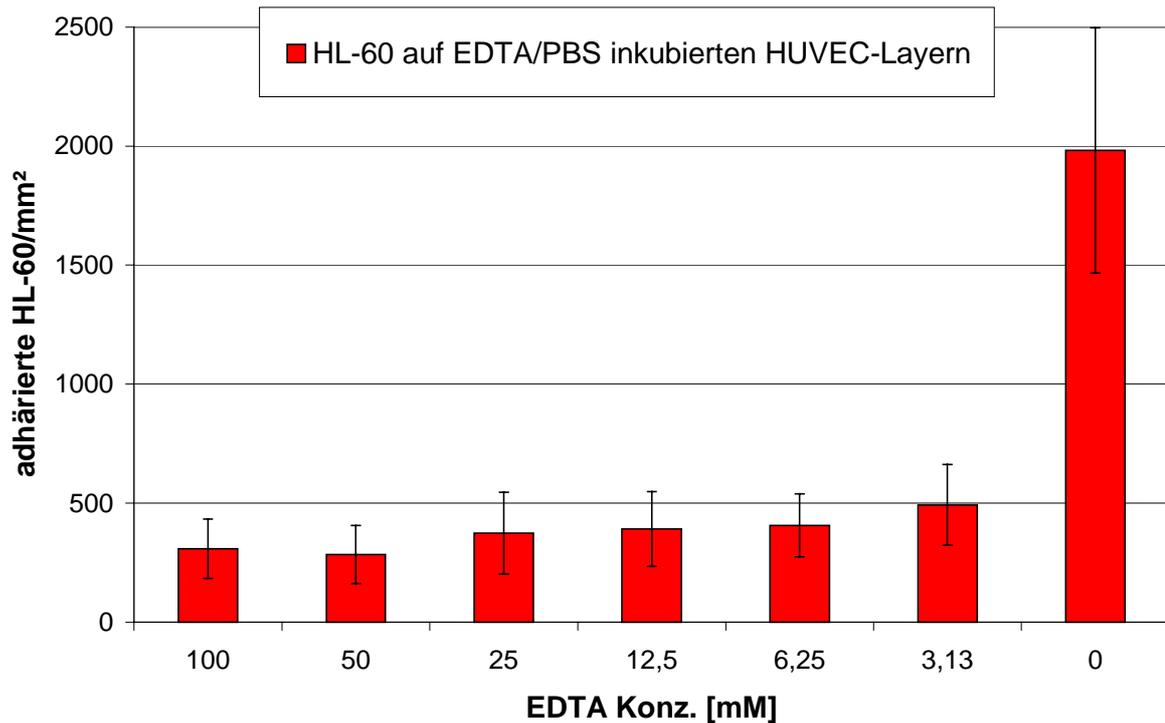


Abbildung 3.39: Anzahl adhärterter HL-60 Zellen auf IL-1 β -induzierten HUVEC-Layern bei Entzug von Ca²⁺-Ionen durch EDTA zum Nachweis der Calcium-Abhängigkeit der E-Selektin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion.

Eine Unterscheidung zwischen E-Selektin- und Integrin-vermittelter Adhäsion wurde mit den HUVEC anhand der zeitlich abhängigen Expressionsraten der Selektine und der zellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 vorgenommen. Die maximale E-Selektin-Expression wird nach 4-6 Stunden Induktion mit IL-1 β bzw. TNF- α erreicht. Der Anteil der ICAM-1 Expression bezogen auf sein Maximum beträgt in diesem Zeitraum ca. 45% und der der VCAM-1 Expression etwa 50%. Nach 24stündiger Inkubation sinkt die Zahl der exponierten E-Selektin-Moleküle auf ca. 30%, wohingegen die ICAM-1 Expression ihr Maximum und die VCAM-1 Expression noch ca. 85% der maximalen Expression erreichen (Imhof and Dunon, 1995).

Für diesen Test wurden HUVEC 4 bzw. 24 Stunden mit einer Konzentration von 50 ng/mL IL-1 β bzw. TNF- α induziert und anschließend der statische Adhäsionsassay durchgeführt. Nach vierstündiger Inkubation adhärten bei IL-1 β -Induktion 1930 (sd 305) und bei TNF- α -Induktion 1871 (sd 397) HL-60 Zellen/mm². Zwischen der Wirkung der beiden Induktoren konnte bezüglich der gezählten Anzahl adhärterter HL-60 Zellen auf HUVEC-Layern nach 4stündiger Inkubation ebensowenig ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wie nach 24stündiger Inkubation, bei der im Falle von IL-1 β 1289 (sd 172) und nach TNF α -Stimulation 1320 (sd 171) HL-60 Zellen/mm² adhärten (siehe Abbildung 3.40).

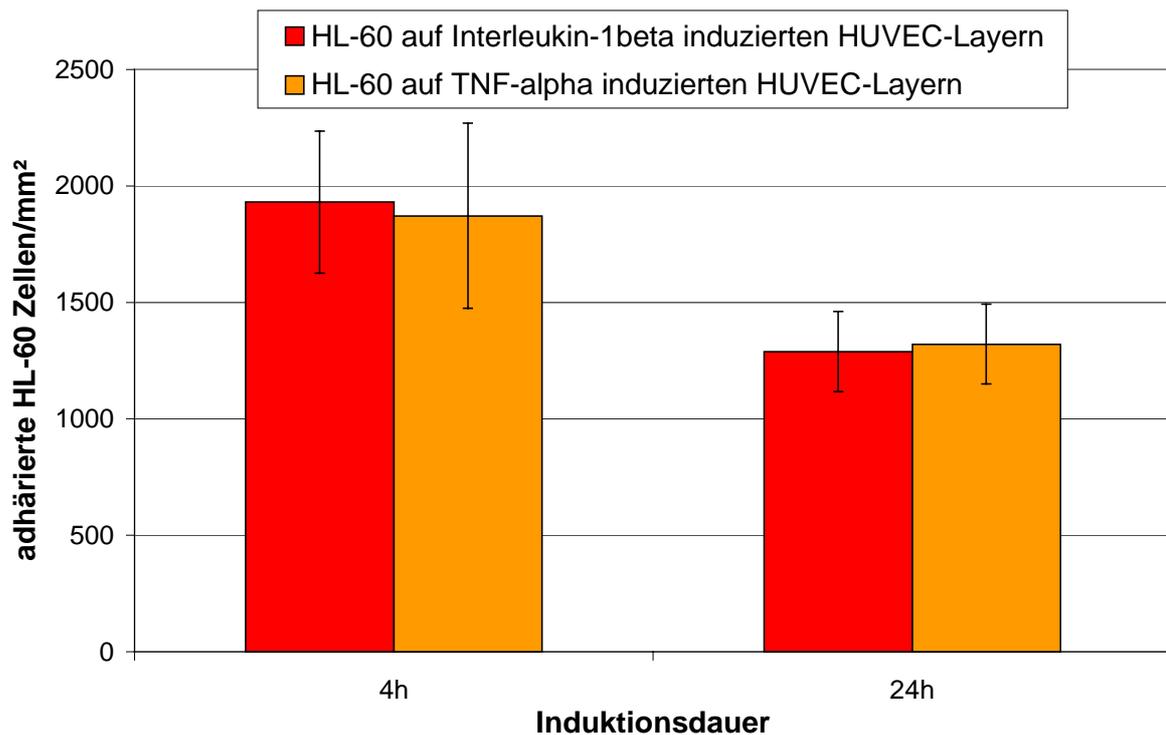


Abbildung 3.40: Vergleich der Anzahl adhärerter HL-60 Zellen nach 4 und 24stündiger Inkubation des HUVEC-Layers mit 50 ng/mL IL-1 β bzw. 50 ng/mL TNF- α .

Die Anzahl der gebundenen HL-60 Zellen verringerte sich bei 24stündiger Inkubation im Vergleich zu der bei 4stündiger Inkubation um 33,2% (IL-1 β) bzw. 29,4% (TNF- α). Die Abnahme der E-Selektin-Expression konnte also nicht durch die Zunahme der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, die mit den Integrinen wechselwirken, bezüglich der HL-60 Bindungskapazität kompensiert werden. Bei Annahme eines Beitrages von 320 Zellen/mm² durch die ICAM-1- und VCAM-1-Affinitäten zu den Integrinen der HL-60 Zellen sowie einer Calcium-unabhängigen Bindung von ca. 250 HL-60 Zellen/mm² würde der Anteil der E-Selektin-gebundenen Zellen mit einem Wert von 1330 Zellen/mm² etwa 70% aller gebundenen HL-60 Zellen ausmachen. Interpoliert auf die gemessene Zellzahl nach 24stündiger Induktion würde durch eine 70% Reduktion der E-Selektin-Expression die Anzahl der aufgrund dieser Affinität gebundenen HL-60 auf 400 Zellen/mm² absinken. Die Verdoppelung der ICAM-1- und VCAM-1-Expression hätte dagegen eine Adhäsion von 640 HL-60/mm² zur Folge. In Addition der ca. 250 Calcium-unabhängig bindenden Zellen/mm² ergäbe sich letztendlich eine resultierende HL-60 Anzahl von 1290/mm², also etwa der Wert, der nach der 24stündigen Inkubation gemessen wurde.

Dieses Berechnungs-Modell läßt keine Aussagen über die tatsächlichen quantitativen Beiträge der jeweiligen Molekülklassen zu der HL-60 Adhäsion auf HUVEC-Layern zu. Hierfür sind Adhäsionsstudien nach Maskierung der jeweiligen Proteine mit spezifischen Antikörpern notwendig (siehe Kapitel 0).

3.6.3 Enzymatische Hydrolyse von E-Selektin und seinen Liganden

Eine zentrale Frage ist die Molekülklasse der E-Selektin-Liganden. Dabei könnte es sich um Glykoproteine und/oder um Ganglioside handeln. Die qualitative Aussage über die für die HL-60 Adhäsion auf CHO-E Zellen verantwortlichen Molekülklassen ließ sich mit Hilfe von Enzymen durchführen.

Zu diesem Zweck wurden HL-60 Zellen 30 Minuten mit Trypsinaktivitäten von 0-1250 U/mL bei 37°C inkubiert, um die auf der Zellmembran präsentierten Proteine zu hydrolysieren. Dieses Pankreas-Enzym spaltet Polypeptidketten hochspezifisch auf der Carboxylseite von Arginin- und Lysinresten. Trotz der mit hoher Aktivität eingesetzten Enzyminkubation wurde keine Inhibition der Adhäsion von Membranprotein-hydrolysierten HL-60 auf den CHO-E Zellen beobachtet (siehe Abbildung 3.41). Im Vergleich zur nicht-Protease-behandelten Kontrolle adhärten sogar bis zu 11,9% mehr HL-60 Zellen. Die Adhäsion von seiten der HL-60 Zellen wurde somit nicht durch Trypsin-abdaubare Proteine vermittelt. Allerdings kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß das Enzym sterisch, z.B. durch Glykosylierungen, an der Hydrolyse relevanter Proteine gehindert wurde.

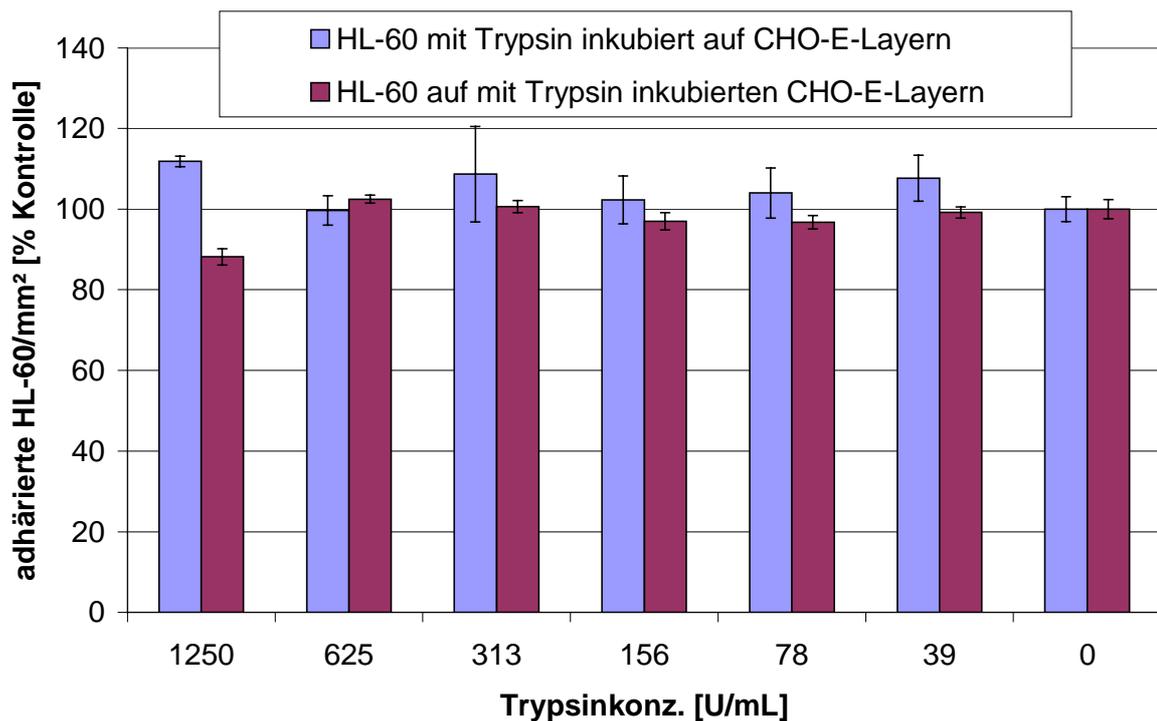


Abbildung 3.41: Adhärerte HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach 30minütiger Inkubation der HL-60 Zellen bzw. 1minütiger Inkubation der CHO-E Zellen mit porcinem Trypsin.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit den HL-60 Zellen reichte die Inkubation der CHO-E Zellen mit einer Trypsinaktivität von 1250 U/mL für eine Minute bei Raumtemperatur aus, um die Anzahl der adhärerten HL-60 Zellen um 11,8% im Vergleich zur nicht-

Enzym-inkubierten Kontrolle zu reduzieren. Längere Inkubationszeiten oder höhere Inkubationstemperaturen führten zu einem frühzeitigen Ablösen des CHO-E-Layers. Aus diesem Experiment konnte ein Trypsin-verdaubares Protein auf der Membranoberfläche der CHO-E Zellen als Adhäsionsvermittelndes Molekül ermittelt werden. Da CHO-E Zellen im Unterschied zu CHO-K1 Zellen - an die die HL-60 Zellen nicht signifikant binden - E-Selektin exprimieren, mußte E-Selektin für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich sein.

HL-60 Zellen besitzen F_c -Rezeptoren für Immunglobuline G (Brackman *et al.*, 1995). Dadurch sind sie prinzipiell in der Lage, eine IgG-vermittelte Zell-Antigenbindung einzugehen. Gäbe es im verwendeten FCS CHO-xenoreaktive Antikörper, die an Oberflächenantigene binden, und würden die F_c -Rezeptoren der HL-60 Zellen mit den F_c -Domänen boviner Immunglobuline kreuzreagieren, käme es zu einer dadurch verursachten Zell-Zell-Adhäsion. Das Enzym Papain aus *Carica papaya* ist eine Thiolprotease, die IgG-Moleküle in der Hinge-Region zwischen der C1- und C2-Domäne spaltet. Dadurch entstehen zwei Teilfragmente, das F_{ab} und das F_c -Fragment. Bei Papaininkubation von Zellen, die aufgrund einer IgG-vermittelten Zell-Antigenbindung adhären, sollten sich diese trennen lassen. Daher wurden HL-60 Zellen für 60 Minuten und CHO-E Zellen für 2 Minuten mit Papainaktivitäten von 0-183 mU/mL inkubiert. Durch die Enzyminkubation der HL-60 Zellen adhärten im Vergleich zu der nicht-Enzym-inkubierten Kontrolle bis zu 24%, und nach CHO-E-Inkubation bis zu 38% mehr Zellen (siehe Abbildung 3.42).

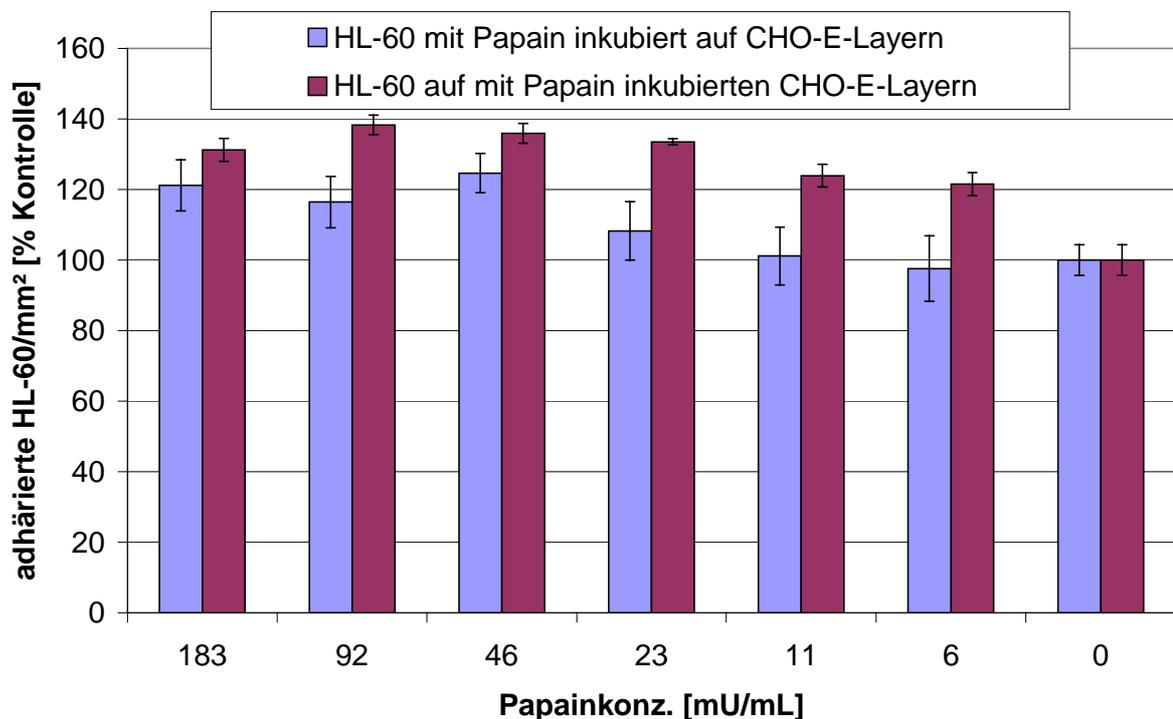


Abbildung 3.42: Adhärerte HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach 60minütiger Inkubation der HL-60 bzw. 2minütiger Inkubation der CHO-E Zellen mit Papain.

Die HL-60/CHO-E-Zelladhäsion beruhte eindeutig nicht auf Antikörper-vermittelter Bindung, da sich durch die Enzymanwendung keine HL-60 Zellen ablösen ließen. Die höheren HL-60-Anzahlen nach Enzyminkubation ließen die Vermutung zu, daß Papain-sensitive-Proteine sterisch die Adhäsion behinderten. E-Selektin war nicht mit Papain hydrolysierbar.

Die Ermittlung der E-Selektin-bindenden Molekülklassen auf der HL-60-Membranoberfläche wurde anschließend mit Kohlenhydrat-abbauenden Enzymen durchgeführt (siehe Abbildung 3.43). Dazu wurden zwei Sialidasen, eine rekombinante cytosolische CHO-Sialidase (rCHO), die in *E. coli* kloniert und exprimiert wurde (Burg and Müthing, 2001), und eine Sialidase aus *Vibrio cholerae* (VC), verwendet (Barman, 1969). Diese beiden Enzyme spalten an Neutralzuckerketten gebundene Sialinsäuren von Sialoglykoproteinen und Gangliosiden ab. Die CHO-Sialidase ist ein 69 kDa großes Fusionsprotein aus Sialidase und Glutathion-S-Transferase. Sie hydrolysiert bevorzugt terminal $\alpha 2$ -3-gebundene Sialinsäuren (Müthing and Burg, 2001), jedoch in geringerem Ausmaß als die VC-Sialidase. Die Substratspezifität der Sialidase aus *V. cholerae* ist deutlich breiter gefaßt. Diese hydrolysiert O-ketosidische $\alpha 2$ -3, $\alpha 2$ -6 und $\alpha 2$ -8-Bindungen endständiger Sialinsäuren von Oligo-, Poly- und Mucopolysacchariden sowie von Glykoproteinen und Glykolipiden.

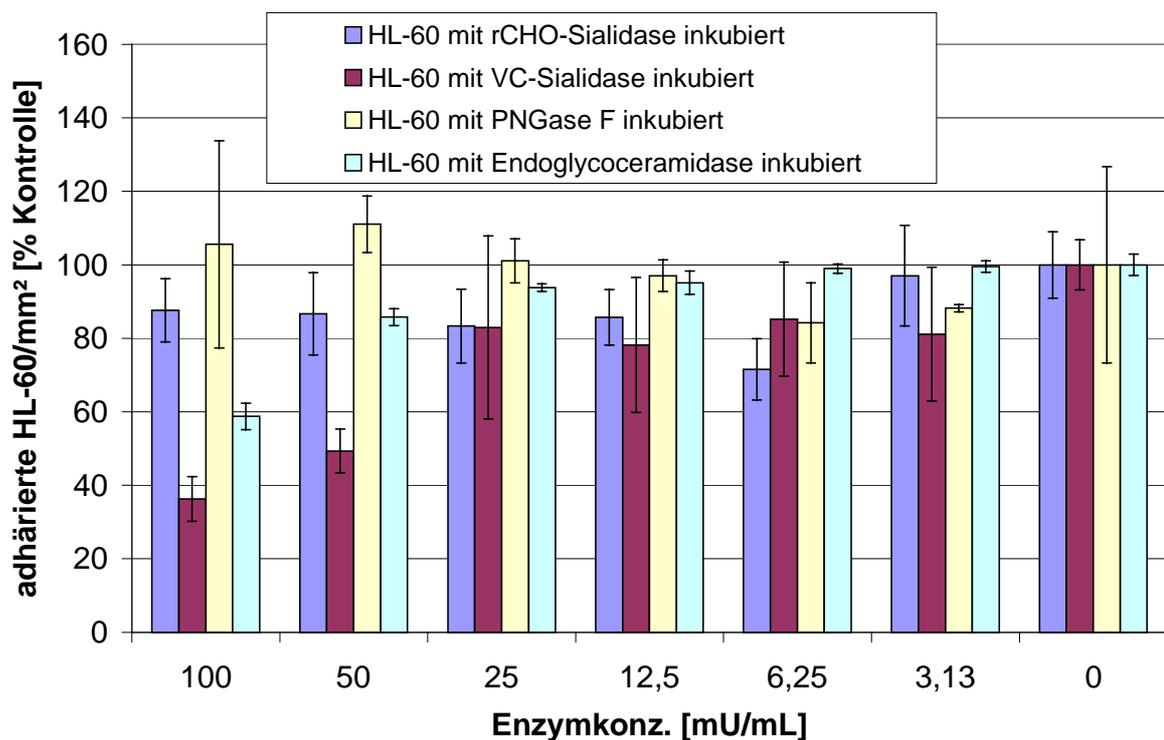


Abbildung 3.43: Adhärerte HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach sechsständiger Inkubation der HL-60 mit Endoglycoceramidase bzw. 1,5ständiger Inkubation mit rCHO-Sialidase, *Vibrio cholerae* Sialidase oder PNGase F.

Weiterhin wurde die rekombinant in *E. coli* exprimierte Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) eingesetzt, die alle Typen N-glykosidisch-gebundener Glykanketten von Glykoproteinen spaltet. Dabei ist Voraussetzung, daß sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen.

Außerdem wurde die rekombinant in *E. coli* exprimierte Endoglykoceramidase aus *Rhodococcus* eingesetzt, die spezifisch Oligosaccharide nur von Glykosphingolipiden am Ceramidteil trennt (Ito and Yamagata, 1989).

Die HL-60 Zellen wurden in getrennten Ansätzen für sechs Stunden mit der Endoglykoceramidase, bzw. für 1,5 Stunden mit einem der drei anderen Enzyme in einem Aktivitätsbereich von 0-100 mU/mL inkubiert.

Mit der rekombinanten CHO-Sialidase wurden mit der höchsten Konzentration eine Reduktion der Anzahl an gebundenen HL-60 von 12,7% erreicht. Die *V. cholerae*-Sialidase verminderte in der gleichen Aktivitäts-bezogenen Konzentration die HL-60 Anzahl um 63,7%. Somit schien die cytosolische CHO-Sialidase aufgrund ihrer eingeschränkteren Substratspezifität eine geringe Wirkung in bezug auf die Inhibition der HL-60 Adhäsion zu besitzen als die *V. cholerae*-Sialidase. Das würde für E-Selektinliganden mit terminal α 2-6-gebundenen Sialinsäuren sprechen. Andererseits könnte das CHO-Sialidase Fusionsprotein aufgrund ihrer massenbedingten (69 kDa) Größe sterisch eher an der Hydrolyse von potentiellen Ligandenstrukturen von Gangliosiden gehindert worden sein als die 10-20 kDa schwere *V. cholerae* Sialidase.

Anhand dieser Ergebnisse wurde die Notwendigkeit sialylierter Strukturen auf den HL-60 Zellen für eine E-Selektin-Wechselwirkung deutlich.

Hingegen hatte die PNGase F-Inkubation im Rahmen der Standardabweichungen keine Auswirkung auf die HL-60-Adhäsion, selbst bei Einsatz der höchsten Konzentration. Unter Annahme einer geringeren Umsatzrate der zellmetabolischen Proteinreglykosylierung im Vergleich zu der Umsatzrate der Deglykosylierung durch die Glykosidase, würden infolgedessen N-glykosylierte Proteine als Liganden des murinen E-Selektins ausscheiden.

Bekräftigt wurde diese Hypothese durch die maximal 41,2%ige Reduktion der Anzahl adhärirter HL-60 Zellen nach Endoglykoceramidasebehandlung. Damit erreichte dieses Enzym in einem vierfach längeren Zeitraum nahezu die gleiche Effektivität der E-Selektin-Ligandeneliminierung wie die Sialidase aus *V. cholerae*. Unter Berücksichtigung der aus den massenspektrometrischen Untersuchungen erhaltenen Daten (siehe Tabelle 3.3) sind die Sialinsäuren terminal gebunden und damit Enzymen sterisch besser zugänglich als die Kohlenhydratkernstrukturen. Dies würde die größere Effektivität der Sialidase gegenüber der Endoglykoceramidase erklären. Die Wechselwirkung zwischen E-Selektin und HL-60 Gangliosiden war als Ursache für mindestens 41% der adhärirten HL-60 Zellen verantwortlich.

Der gleiche Test wurde mit HUVEC-Layern durchgeführt, die zuvor für vier Stunden mit 50 ng/mL IL-1 β induziert wurden (siehe Abbildung 3.44). In diesem Fall führte bereits eine Aktivität von 12,5 mU/mL der CHO-Sialidase zu einer 52,5%igen Reduktion der gebundenen Anzahl HL-60 Zellen. Die maximale Inhibition betrug 66,8% bei 100 mU/mL

Enzymaktivität. Im Vergleich dazu wurde durch die *V. cholerae* Sialidaseinkubation bei maximaler Konzentration 73,7% der HL-60 Zellen an einer Adhäsion gehindert. Die Aktivität der CHO-Sialidase hatte in dem human/human-Testsystem (HL-60/HUVEC) also einen größeren Effekt als in dem human/murinen System (HL-60/CHO-E). Insgesamt wurde während der Enzymbehandlung ab einer Aktivität von etwa 25 mU/mL nahezu keine weitere Reduktion der adhärirten HL-60 erkennbar, da auch eine Vervierfachung der *V. cholerae*-Sialidasekonzentration nur eine um 5% größere Inhibition ergab. Da die HL-60 Zellen in diesem und in dem Parallelansatz auf CHO-E Zellen (vgl. Abbildung 3.43) gleich inkubiert wurden, kann die unterschiedliche Anzahl adhärirter HL-60 Zellen nur durch Unterschiede der Rezeptoren auf den Layern begründet sein. Da die Dichte der E-Selektin-Moleküle auf HUVEC-Layern geringer ist als die auf den konstitutiv E-Selektin-exprimierenden CHO-E Zellen, könnten E-Selektin-unabhängige Rezeptoren für den gebundenen Restanteil der HL-60 Zellen verantwortlich sein. Möglicherweise adhärirten die verbleibenden 26,3% der HL-60 Zellen, abzüglich des sedimentierten Anteils, aufgrund von Integrin/Adhäsion-Wechselwirkungen, oder die verbleibenden Sialinsäuren waren den Enzymen nicht zugänglich.

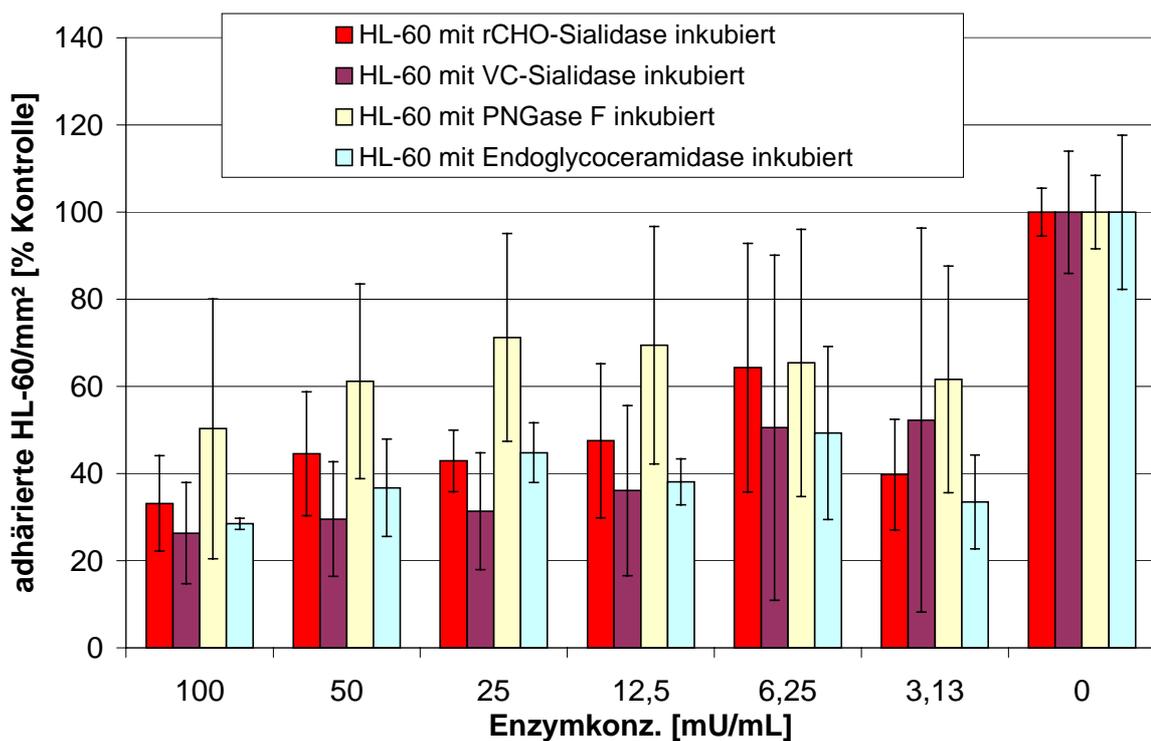


Abbildung 3.44 Adhärirte HL-60 Zellen auf HUVEC-Layern nach sechsständiger Inkubation der HL-60 Zellen mit Endoglycoceramidase bzw. 1,5ständiger Inkubation mit rCHO-Sialidase, *Vibrio cholerae* Sialidase oder PNGase F.

Beachtenswerterweise hatte eine *V. cholerae*-Sialidase-Enzymaktivität von 12,5 mU/mL in diesem Testsystem den in etwa gleichen inhibitorischen Effekt auf die Zelladhäsion wie im human/murinen System eine Aktivität von 100 mU/mL. Es war somit für die gleiche Wir-

kung eine achtfach niedrigere Enzymkonzentration notwendig. Dies könnte bedeuten, daß das humane E-Selektin eine geringere Liganden-Toleranz in bezug auf die Sialylierung hatte als das murine Pendant. Obwohl die Bindungskapazität der HUVEC, wie zuvor beschrieben, mindestens um den Faktor vier niedriger als die der CHO-E Zellen war (vgl. Abbildung 3.38 und Abbildung 3.39), sollten bei Reduzierung der Konzentration an sialylierten Liganden auf den HL-60 Zellen trotzdem in etwa gleiche Enzymkonzentrationen notwendig sein, um den gleichen Inhibitions-Effekt zu erzielen, da letztendlich die Anzahl der Sialinsäuren den begrenzenden Faktor darstellt.

Das Ergebnis der PNGase F-Anwendung auf die HL-60 Adhäsion legte eine weitere Möglichkeit offen. Durch Inkubation mit einer Aktivität von 100 mU/mL wurde eine Reduktion an adhärennten HL-60 Zellen von 49,7% erreicht. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß es in dem human/human-System eine weitere Erkennungswechselwirkung gibt, die auf N-gebundenen Kohlenhydraten beruht. Möglicherweise besitzt dieses Protein auch sialylierte Strukturen, die hochspezifisch an humanes E-Selektin binden und für die CHO-Sialidase zugänglich sind. L-Selektin ist sialyliert und kann eine Wechselwirkung mit E-Selektin eingehen (Kishimoto *et al.*, 1991; Picker *et al.*, 1991; Lawrence *et al.*, 1994). Die Existenz dieser Wechselwirkung wurde bereits in Affinitätsexperimenten bestätigt (Jones *et al.*, 1997). Jedoch ist diese Interaktion unabhängig von N-gebundenen Kohlenhydraten (Zöllner *et al.*, 1997). Daher wird der gemessene 49,7%ige Anteil der Zell-Zell-Adhäsion im human/humanen System durch andere Proteine verursacht, die N-glykosyliert sind. In Frage dafür kommen zwei Mucine, das humane ESL-1, dessen murines Pendant etwa 150 kDa schwer ist, und ein 250 kDa schweres Protein, das auf humanen Neutrophilen gefunden wurde (Zöllner *et al.*, 1997). Das humane ESL-1 ist allerdings nur in sehr geringer Konzentration auf humanen Neutrophilen nachweisbar, so daß das zweitgenannte Protein eher für die Wechselwirkung mit E-Selektin verantwortlich sein dürfte.

Neben dieser Wechselwirkung wird der überwiegende Anteil der Zell-Zell-Adhäsion offenbar durch die Interaktion von E-Selektin mit Gangliosiden verursacht. Die sechsstündige Inkubation der HL60-Zellen mit der Endoglykoceramidase mit einer Aktivität von 100 mU/mL reduzierte die Anzahl der auf den HUVEC-Layern adhärennten HL-60 Zellen um 71,5%. Bereits eine Konzentration von 6,25 mU/mL reichte für eine Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion von 50,7%.

3.6.4 Maskierung der Leukocytinganglioside

Neben dem enzymatischen Abbau potentieller Liganden wurden Studien zur quantitativen Adhäsionsreduktion nach deren Maskierung durchgeführt. Dazu wurden das sulfatierte Glykosaminoglykan Heparin sowie ein Hydroxyethylstärke-Isolat (HES) aus Weizenkeimen verwendet. Heparin bindet an P-Selektin, wogegen das HES eine unbekannte Spezifität für Antigene auf HL-60 Zellen besitzt. Nach Durchführung des statischen Adhäsionsassays mit Konzentrationen von 0-5 mg/mL zeigte sich keine E-Selektin-Affinität zu den sulfatierten Strukturen des Heparins (siehe Abbildung 3.45). Allerdings wurden durch

das HES Antigene auf der Plasmamembranoberfläche der HL-60 Zellen maskiert, wodurch eine 72%ige Reduktion der gebundenen HL-60 Zellen auf 1376 (sd 173) HL-60 Zellen/mm² erreicht wurde. Die Maskierung der Oberflächenantigene hatte damit im human/murinen System einen um 9% höheren Effekt als die 1,5stündige Desialylierung durch die *V. cholerae* Sialidase bei Einsatz von 100 mU/mL.

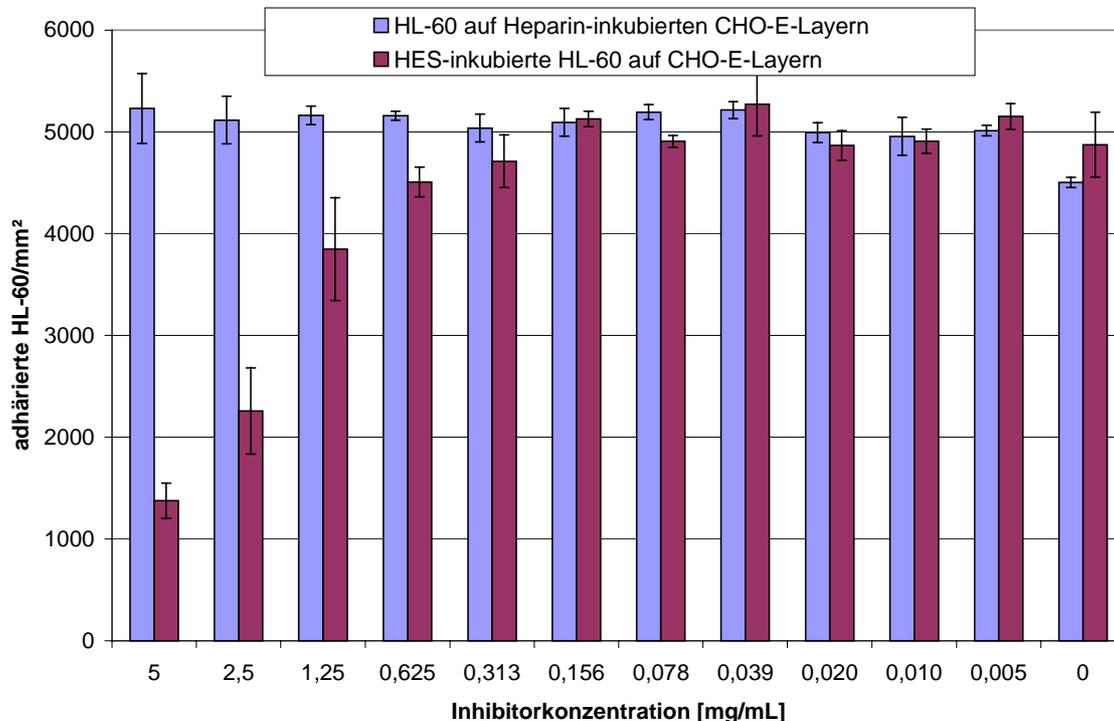


Abbildung 3.45: Adhärenz von HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach Inkubation mit Heparin bzw. Hydroxyethylstärke aus Weizenkeimen.

Eine detailliertere Untersuchung wurde durch die Anwendung des monoklonalen Antikörpers CSLEX ermöglicht, der spezifisch das sLe^x-Epitop erkennt. Nach der Inkubation der HL-60 Zellen mit einer Antikörperkonzentration von 500 µg/mL ergab sich eine Inhibition der Adhäsion auf CHO-E Zellen von 50,4% (siehe Abbildung 3.46). Damit wurde eine um 21,6% geringere Inhibition als bei Anwendung der 10fachen Konzentration an Hydroxyethylstärke erzielt. Der IgM-Kontrollantikörper bewirkte dagegen mit Anwendung der höchsten Konzentration von 500 µg/mL lediglich eine Reduktion der adhärenz von 5,0%.

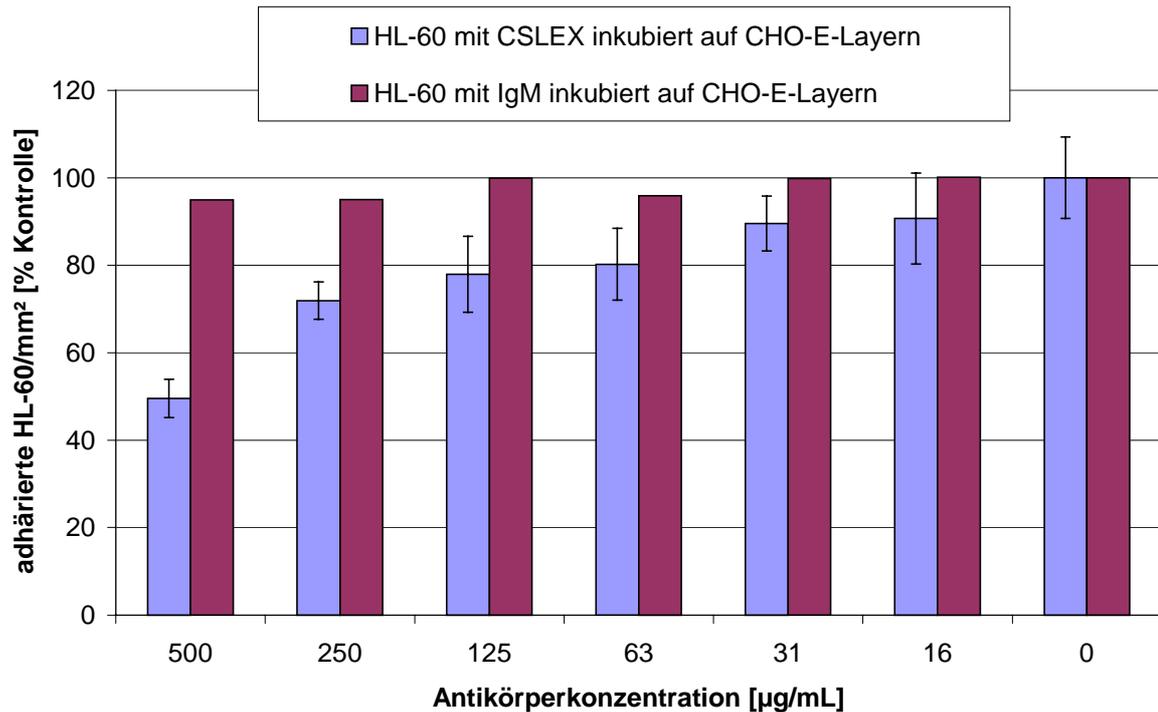


Abbildung 3.46: Adhärierte HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach 1stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit CSLEX-Antikörpern bzw. IgM-Antikörpern.

Im human/human System ergab der gleiche Test unter Anwendung des CSLEX-Antikörpers in dem Konzentrationsbereich von 0-500 µg/mL eine maximale Inhibition von 54,6% (siehe Abbildung 3.47). Nach Abzug einer sedimentierten Anzahl von 106 (sd 30) Zellen/mm² (vgl. Abbildung 3.39) errechnet sich daraus ein Wert von 60,4%. Allerdings schien die E-Selektin-Expression der HUVEC in diesem Fall nach der vierstündigen Induktion mit 50 ng/mL IL-1β geringer gewesen zu sein als in den Experimenten zuvor, da lediglich 1111 (sd 187) HL-60 Zellen/mm² im nicht-inhibierten Ansatz auf den Endothelzellen adhärten. Bereits eine CSLEX-Konzentration von 3,9 µg/mL reichte für eine apparente 42,1%ige Inhibition der HL-60 Adhäsion aus. Eine 128fache Steigerung der Konzentration bedingte eine um 12,5% gesteigerte Adhäsionsinhibition.

Wie bereits anhand der enzymatischen Desialylierungs-Experimente festgestellt, zeichnete sich auch in diesem Experiment eine Sättigungsgrenze der maximal durch Maskierung von sLe^x-Strukturen möglichen Adhäsionsinhibition ab. Etwa 40% der HL-60 Zellen adhärten demnach nicht durch sLe^x-vermittelte Strukturen, es sei denn, einige dieser Liganden konnten aufgrund sterischer Behinderung nicht von dem IgM maskiert werden. Dies würde bedeuten, daß das E-Selektin sterisch weniger behindert worden ist als die IgM-Antikörper. Andererseits zeigten Bindungsexperimente mit dem sLe^x-defizienten Subzellklon HL-60var ein im Vergleich zur sLe^x-positiven HL-60 Zelllinie etwa 60%iges Adhäsionspotential zu E-Selektin-transfizierten CHO Zellen (Wagers *et al.*, 1998). Diese Zellen besitzen quantitativ etwa 25% der VIM2-Antigene und etwa 450% Le^x-Antigene im Vergleich zum etablierten HL-60 Klon. Allerdings ist ihr Adhäsionsvermögen Sialinsäure-

abhängig. Deshalb können die Le^x -Antigene nicht für die Affinität zu E-Selektin verantwortlich sein. Auch die potentielle VIM2-Wechselwirkung mit E-Selektin reicht allein nicht für einen Effekt dieser Größenordnung aus, da in dem Experiment mit VIM2-Epitop-exprimierenden K-562 Zellen lediglich 16,7% im statischen Adhäsionsassay auf den CHO-E Zellen verblieben.

Demzufolge müssen auf der HL-60-Zellmembranoberfläche sLe^x -differente sialylierte Liganden des E-Selektins exponiert sein, die eine Adhäsion vermitteln, und/oder der Restanteil der adhären HL-60 Zellen auf dem HUVEC-Layer wurde durch Interaktionen von Integrinen mit Adhäsinen verursacht.

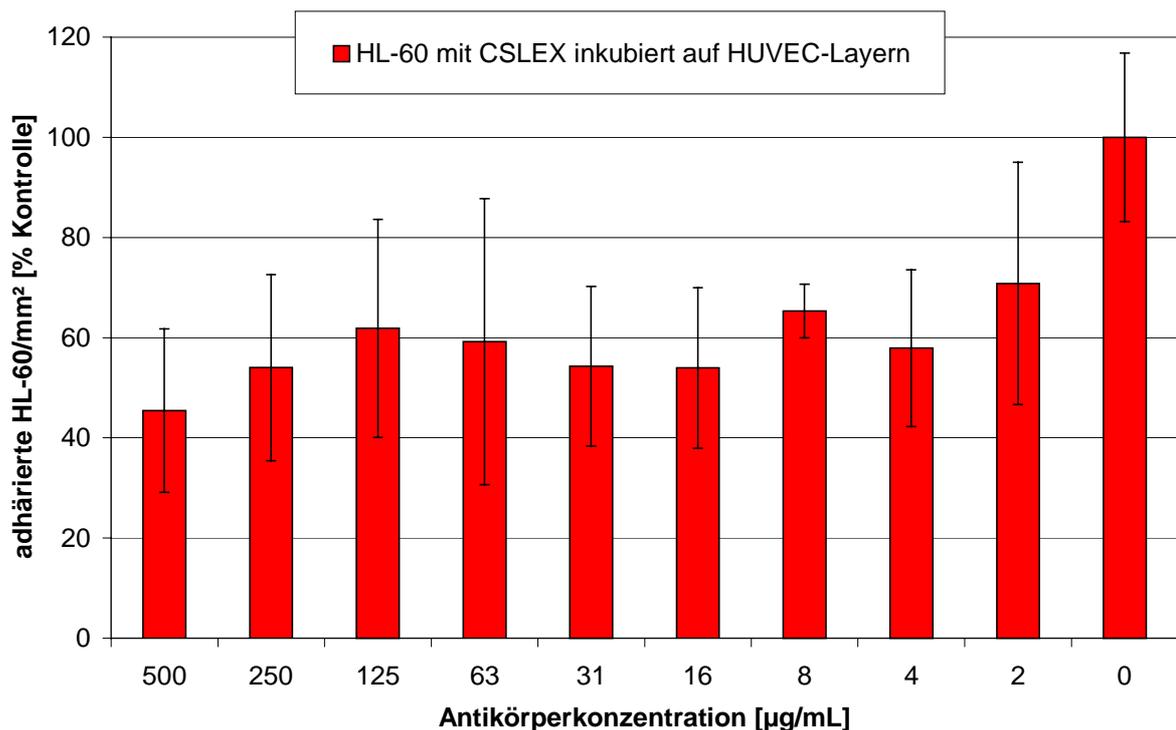


Abbildung 3.47: Adhärenz von HL-60 Zellen auf IL-1 β -induzierten HUVEC-Layern nach 1-stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit CSLEX-Antikörpern.

Die Maskierung potentieller E-Selektin-Liganden der HL-60 Zellen wurde ebenfalls mit dem E-Selektin-IgG-Protein durchgeführt. Da die HL-60 Zellen Rezeptoren für humanes IgG besitzen (Brackman *et al.*, 1995) und das E-Selektin-IgG ein Fusionsprotein mit zwei humanen Domänen der konstanten schweren Kette des Immunglobulins G₁ ist, wird dieses bei der Inkubation so an die HL-60 Zellen gebunden, daß die E-Selektin-IgG-Anteile topologisch nach außen zeigen. Dadurch kam es zu einer Agglutination von HL-60 Zellen untereinander, die jeweils über den F_c-Rezeptor mit dem IgG-Anteil und mit dem E-Selektin an den sialylierten Liganden verbunden waren. Durch diese Agglutination waren HL-60 sLe^x -Antigene den CHO-E Zellen nicht mehr zugänglich. Daher war es notwendig,

einen Vergleich zwischen der Adhäsionsfähigkeit von IgG-Rezeptor-abgesättigten und nicht –abgesättigten HL-60 Zellen durchzuführen.

Nach 1stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit dem E-Selektin-IgG Protein in einer Konzentration von 71,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde eine maximale Adhäsionsinhibition von 78,3% ermittelt (siehe Abbildung 3.48). Im Vergleich dazu wurde durch vorherige 1stündige Inkubation der HL-60 Zellen mit aus humanem Plasma isolierten Immunglobulinen des G-Typs und anschließende 1stündige Inkubation mit E-Selektin-IgG eine maximale Inhibition von 84,3% erreicht. Dabei trat keine Agglutination der HL-60 Zellen auf. Damit wirkte sich der durch die Vernetzung bedingte Entzug der den CHO-E Zellen dargebotenen HL-60 sLe^x-Antigene für die Zell-Zell-Adhäsion nicht negativ aus. Die 1stündige Kontrollinkubation der HL-60 nur mit humanem IgG bewirkte keine Abnahme der adhärenierten Anzahl an HL-60 Zellen.

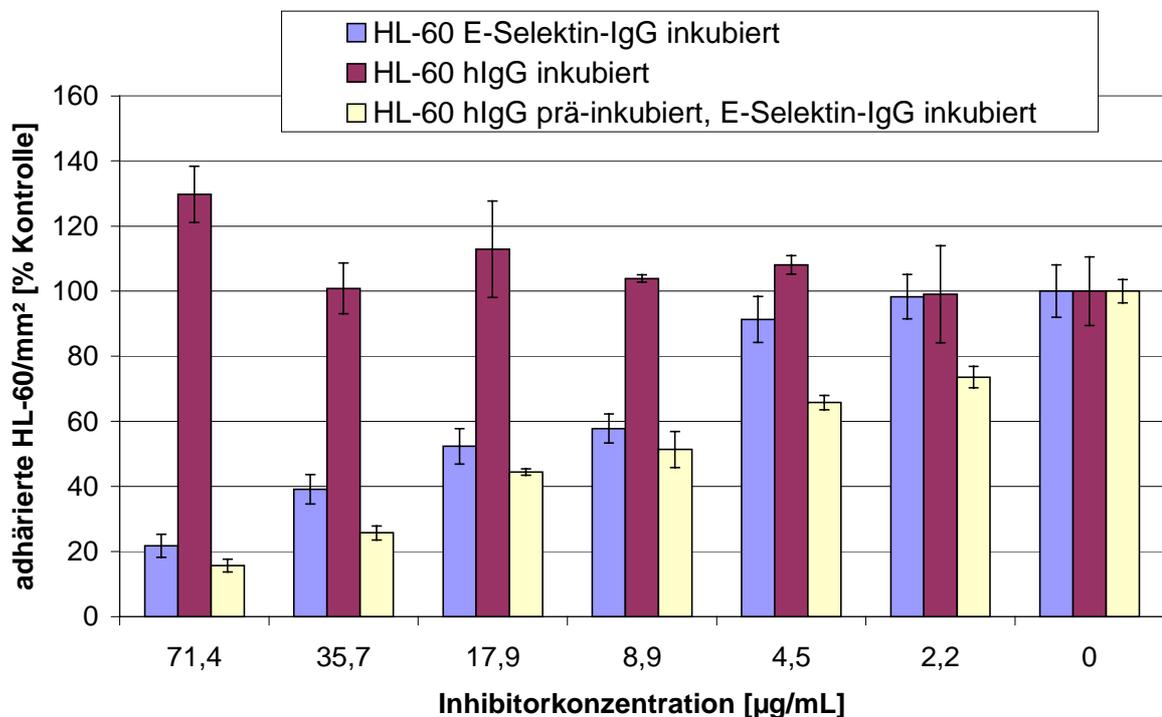


Abbildung 3.48: Adhärenzierte HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach 1stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit E-Selektin-Ig-Proteinen oder humanem IgG, bzw. 1stündige prä-Inkubation der HL-60 Zellen mit humanem IgG mit anschließender 1stündiger Inkubation mit E-Selektin-IgG-Proteinen.

Bezogen auf die Molekulargewichte von 950 kDa des CSLEX-Antikörpers und 180 kDa des E-Selektin-IgG-Proteins errechnen sich Werte von 0,53 μM bzw. 0,40 μM für die jeweils höchsten angewendeten Konzentrationen im human/murinen System. Wird die Effizienz der Adhäsionsinhibition des E-Selektin-IgG-Proteins mit der des CSLEX-Antikörpers verglichen, so war die erstgenannte mit einem Wert von 78,3% gegenüber der letzteren von 50,4% um 27,9% höher, obwohl die molare Konzentration des CSLEX-Antikörpers um 24% höher war. Dies würde für eine mögliche sLe^x-unabhängige Bindung

des murinen E-Selektins bezogen auf diesen abweichenden Anteil sprechen. Dafür könnten Strukturen, die bei E-Selektin-IgG-Overlays, aber nicht bei CSLEX-Overlays (siehe Abbildung 3.23, Bandenregion 6) eine Bindung aufwiesen, verantwortlich sein. Insgesamt könnte die E-Selektin-Bindung aber auch durch zusätzliche, an der inneren Sequenz der Neutralzuckerketten befindliche Strukturen wie z.B. Fucosen stabilisiert werden, die außerhalb des CSLEX-Epitopes gebunden sind und somit nicht von diesem erkannt werden (vgl. Abbildung 3.23, Bandenregion 12 und Abbildung 3.24, 2c). Dafür spricht auch die in den Overlays stets stärkere Affinität des E-Selektin-IgGs zu den CSLEX-bindenden Gangliosidstrukturen. Frühere Untersuchungen von HL-60 Gangliosiden belegten die E-Selektin-Bindungsaktivität von sLe^x- und VIM2-Epitopen sowie Hybridstrukturen aus diesen, die als Myelogykane bezeichnet wurden (Stroud *et al.*, 1995, 1996 a, 1996 b). Für genauere Aussagen über die Ursache der gemessenen Differenz von 27,9% könnten detaillierte Untersuchungen z.B. anhand von Oberflächenplasmon-Resonanz-Bindungsstudien mit isolierten Einzelstrukturen hilfreich sein. Auch Overlay-Assays mit isolierten Einzelstrukturen der für diese Studien verwendeten Gangliosidfraktionen aus humanen Granulozyten könnten Informationen über die präferentiellen Liganden des murinen E-Selektins liefern. Diese Bindungsstruktur-analytische Charakterisierung wird zur Zeit in Parallelstudien durchgeführt (Lümen, 2001).

Das Potential des E-Selektin-IgG-Proteins zur Inhibition der Zell-Zell-Adhäsion zwischen HL-60 und CHO-E Zellen wurde besonders deutlich, als die Humananteile des E-Selektin-IgGs mit F(ab')₂-Proteinen maskiert wurden (siehe Abbildung 3.49). Auch in diesem Fall wurde die Agglutination der HL-60 Zellen verhindert. Aber es reichte bereits eine E-Selektin-IgG Konzentration von 1,5 µg/mL bzw. 8 nM aus, um eine 74,3%ige Inhibition der Adhäsion zu verursachen. Damit wurde die Inhibitionseffizienz um das 48fache im Vergleich zum nicht-maskierten E-Selektin-IgG-Protein gesteigert. Die maximal erreichte Inhibition der HL-60-Zelladhäsion betrug 96,8%. Obwohl die F(ab')₂-Proteine selbst im Rahmen der Standardabweichungen keinen negativen Einfluß auf die Inhibition hatten, konnte die Anzahl der F(ab')₂-Fragmente, die an den IgG-Anteil des E-Selektin-IgG-Proteins gebunden haben und somit einen Verstärkungseffekt der Inhibition durch sterische Behinderung auslösten, nicht bestimmt werden. Vergleichende Experimente wurden deshalb nur noch mit alleinigem Einsatz des E-Selektin-IgG-Proteins durchgeführt, um den genannten Unwägbarkeitsfaktor auszuschließen.

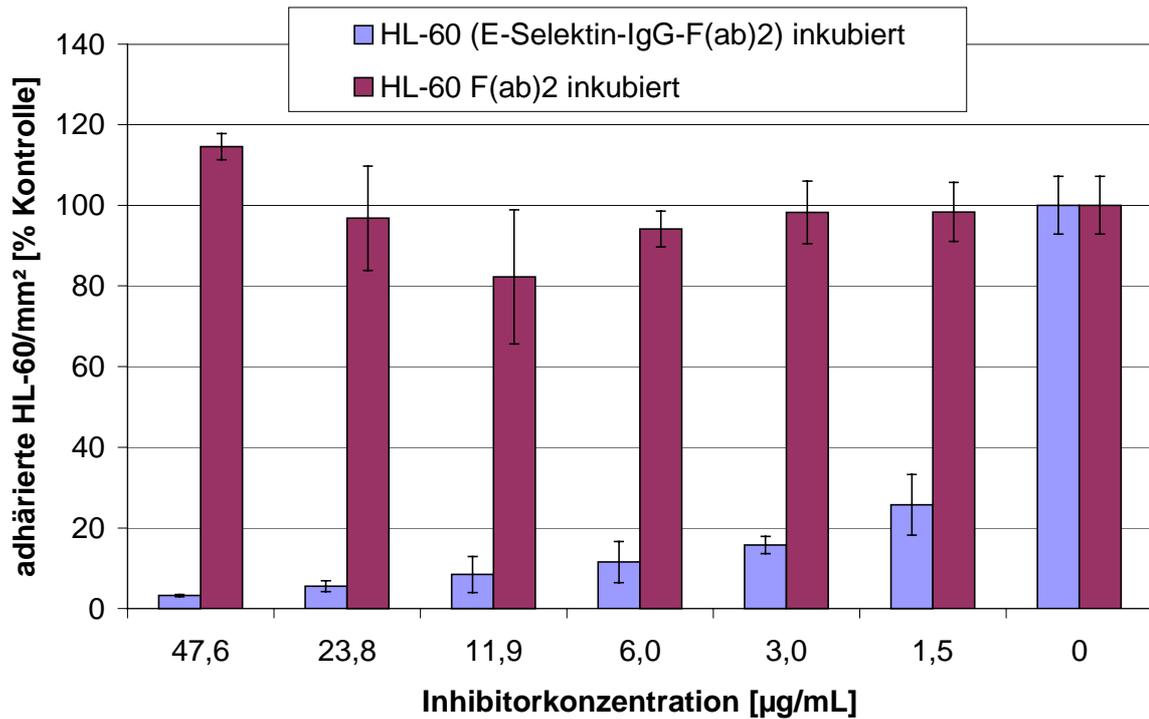


Abbildung 3.49: Adhärierte HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach 1stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit E-Selektin-IgG-F(ab)₂-Proteinen bzw. F(ab)₂-Proteinen.

Das Potential des murinen E-Selektin-IgG-Proteins zur Inhibition der Adhäsion von HL-60 Zellen auf dem HUVEC-Layer sollte zeigen, inwieweit die Liganden des murinen und des humanen E-Selektins übereinstimmen. Dazu wurden HL-60 Zellen für eine Stunde mit E-Selektin-IgG inkubiert und anschließend der statische Adhäsionstest durchgeführt. Die maximal erreichte Inhibition betrug 64,7% bei einer E-Selektin-IgG Konzentration von 71,4 µg/mL (siehe Abbildung 3.50) und war damit um 13,6% geringer als in dem Parallelexperiment mit CHO-E Zellen, bei dem ein Wert von 78,3% ermittelt wurde (vgl. Abbildung 3.48).

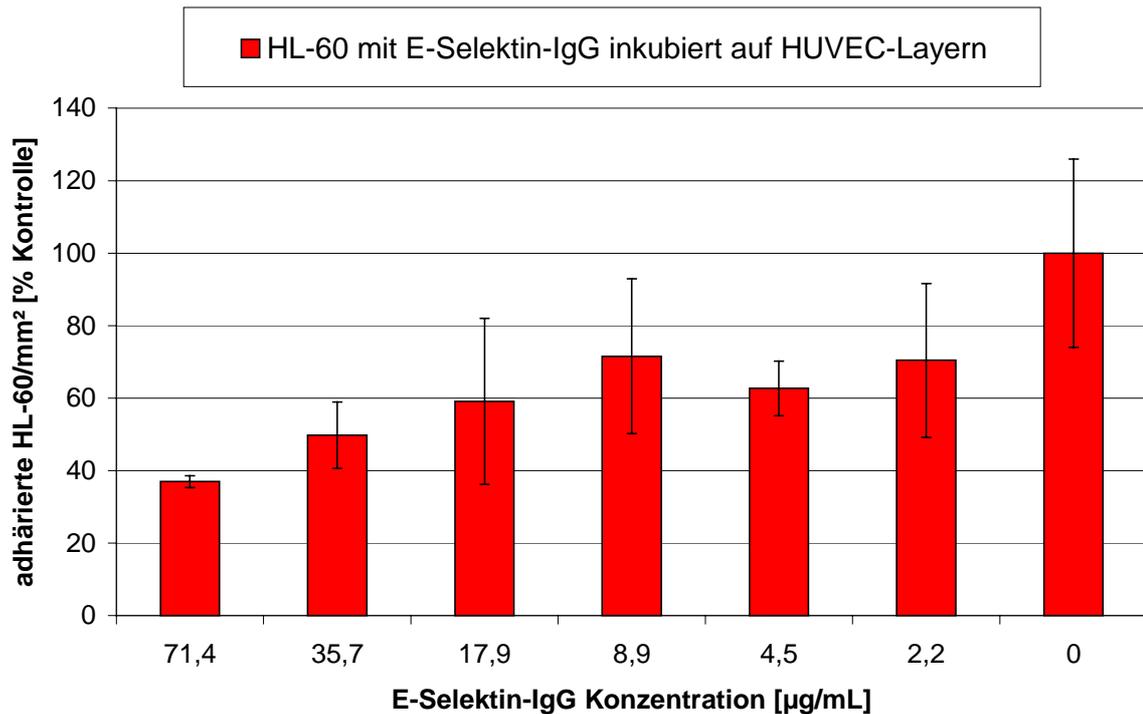


Abbildung 3.50: HL-60 Zelladhäsion auf HUVEC nach 1stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit E-Selektin-IgG-Proteinen.

Daraus ließen sich keine direkten Schlüsse auf das Vorhandensein Spezies-spezifischer E-Selektin-Liganden ziehen. Zudem konnte in dem eingesetzten Konzentrationsbereich keine Sättigung der Inhibition erzielt werden, was für zusätzliche E-Selektin-unabhängige Bindungsmechanismen sprechen würde. Ausgeschlossen werden können diese Wechselwirkungen hingegen ebensowenig, da bei der höchsten E-Selektin-IgG-Konzentration nicht die Inhibitionseffizienz erreicht wurde, bei der die durch Desialylierung anhand der *V. cholerae*-Sialidaseinkubation erlangte Inhibition der Zell-Zell-Adhäsion einen Grenzbe- reich erkennbar werden ließ (vgl. Abbildung 3.44).

3.6.5 Inhibition der leukocytären E-Selektin-Ligandenbiosynthese

Der Eingriff in den HL-60-Zellmetabolismus sollte, zusätzlich zu den mit enzymatischen Methoden erhaltenen Ergebnissen, weitere Erkenntnisse über die E-Selektin-Ligandenklassifizierung ergeben. Dazu wurden vier verschiedene Glykosylierungs-Inhibitoren benutzt, die an unterschiedlichen Stellen in den Gangliosid- bzw. Glykoprotein-Anabolismus eingreifen.

D-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP) ist ein kationisches Lipid, das als Inhibitor der Glucosylceramid-Synthase wirkt (Abe *et al.*, 1991; Li and Ladisch, 1997). Dadurch wird der Transfer der UDP-Glucose auf das Ceramid gehemmt,

was letztendlich zu einer Syntheseblockade der Ganglio-, Globo-, Lacto- und Neolacto-Glykosphingolipide führt.

Fumonisin B₁ ist ein Mycotoxin aus *Fusarium moniliforme*, das den Transfer von Galactose an Sphingolipide sowie die N-Acetyltransferase inhibiert und damit die *de novo* Sphingolipidsynthese blockiert (Merril *et al.*, 1993).

Brefeldin A inhibiert die *de novo* Synthese von Globo- und Neolacto-Glykosphingolipiden, hat aber keinen Effekt auf β 1-3-N-Acetylglucosaminyl-, die β 1-4-Galactosyl- oder die α 1-3-Fucosyltransferaseaktivität (Sherwood and Holmes, 1992).

Als viertes Agens zur Glykosylierungsinhibition wurde Tunicamycin aus *Streptomyces lysosuperificus* verwendet, das spezifisch die N-Glykosylierung von Proteinen durch Blockade der Übertragung von GlcNAc auf Dolicholphosphat hemmt (Paul *et al.*, 1992). Dieses Lipid ist eine für die N-Glykosylierung von Proteinen notwendige Vorstufe, da es als Trägermolekül fungiert, von dem der Kohlenhydratanteil letztendlich übertragen wird.

Die HL-60 Zellen wurden mit den Glykosylierungsinhibitoren in einem Konzentrationsbereich von 0-30 μ M für sechs Stunden inkubiert. Lediglich Tunicamycin konnte nur mit einer Maximalkonzentration von 5 μ M eingesetzt werden, da sonst die HL-60 Zellen abstarben. Nach Applikation der so inhibierten HL-60 Zellen zu dem CHO-E-Zellayer wurde die Zell-Zell-Adhäsion quantifiziert (siehe Abbildung 3.51).

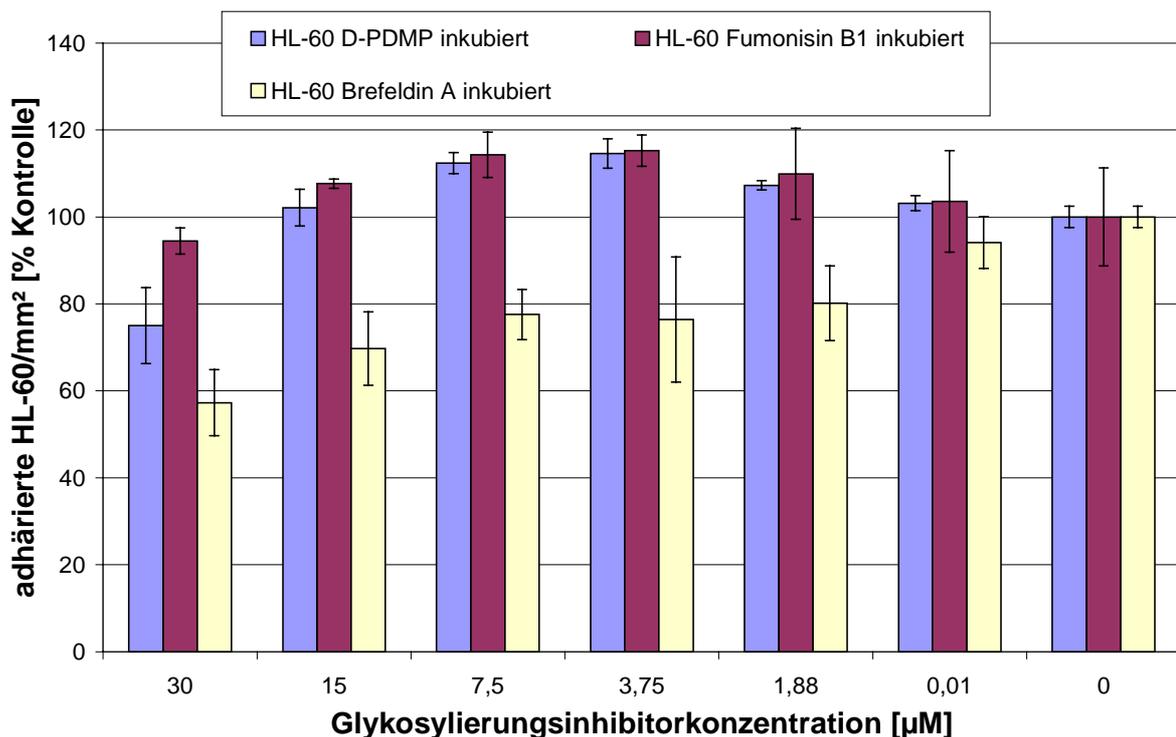


Abbildung 3.51: Adhärerte HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach 6stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der Glykosylierungsinhibitoren D-PDMP, Fumonisin B₁ bzw. Brefeldin A.

Bis zu einer Konzentration von 7,5 μ M der Glykosylierungsinhibitoren D-PDMP und Fumonisin B₁ wurde eine bis zu 15%ige Steigerung der adhärerten HL-60 Zellzahl ermittelt.

Während D-PDMP bei der höchsten Konzentration von 30 μM eine Adhäsions-Inhibition von 25,0% hervorrief, konnte für Fumonisin B₁ bei gleicher Konzentration nur ein Wert von 5,5% gemessen werden, der im Rahmen der Abweichungen der Kontroll-Inhibition ohne Wirkstoff lag. Durch Anwendung von Tunicamycin im Konzentrationsbereich von 0-5 μM konnte ebenfalls keine signifikante Inhibition festgestellt werden (siehe Abbildung 3.52). Die stärkste Inhibition trat unter Einwirkung von Brefeldin A auf. Bereits bei einer Konzentration von 1,88 μM wurde eine Reduktion der adhärenierten HL-60 Zellzahl von 19,8% festgestellt. Bei einer Konzentration von 30 μM konnte diese Reduktion auf 42,7% gesteigert werden.

Die gesteigerte Anzahl der bei niedrigen D-PDMP-Konzentrationen adhärenierten HL-60 Zellen kann durch eine kurzfristige Steigerung der Glukosyltransferase-Aktivität erklärt werden (Abe *et al.*, 1996). Höhere Konzentrationen werden dagegen nicht kompensiert. Eine ähnliche kurzfristige Steigerung der Enzymaktivität könnte für den gleichen Effekt bei Fumonisin B₁ verantwortlich sein.

N-glykosylierte membranständige Proteine der HL-60 Zellen scheinen nicht an der Wechselwirkung mit murinem E-Selektin beteiligt zu sein, es sei denn, ihre Internalisierungsrate liegt deutlich über einem Zeitraum von sechs Stunden. Dann hätte die Blockade der *de novo* Synthese keinen Effekt auf die Zell-Zell-Adhäsion, da noch genug membranständige Liganden eine E-Selektin-Wechselwirkung eingehen könnten. Das gleiche gilt auch für die Glykosphingolipide. Hier konnte mit Einsatz von Brefeldin A die deutlichste Inhibition der HL-60 Adhäsion erzielt werden. Dieses Agens inhibiert nicht nur die Synthese von Globo- und Neolacto Glykosphingolipiden sondern auch den Vesikeltransport im Golgi-Apparat (Misumi *et al.*, 1986; Fujiwara *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1992). Dadurch würden auch Membranproteine nicht mehr an die Oberfläche transportiert. Da aber Tunicamycin keinen signifikanten Effekt auf die Zell-Zell-Adhäsion hatte, ist die Wirkung des Brefeldin A auf die Blockierung der Glykosphingolipidsynthese zurückzuführen. Diese Schlußfolgerung wird dadurch bekräftigt, daß bei gleichzeitiger sechsstündiger Inkubation von D-PDMD in einer Konzentration von 30 μM und der Endoglykoceramidase (vgl. Abbildung 3.43) mit einer Aktivität von 100 mU/mL eine 77,7%ige Adhäsionsinhibition erzielt wurde. Dementsprechend sind Glykosphingolipide als Liganden des murinen E-Selektins für diese Anzahl an HL-60-Adhäsion verantwortlich. Mit den Erkenntnissen aus den Maskierungsexperimenten und den enzymatischen Verdauexperimenten lassen sich diese auf Ganglioside eingrenzen. N-glykosylierte Proteine scheiden als Liganden des murinen E-Selektins dagegen offensichtlich aus.

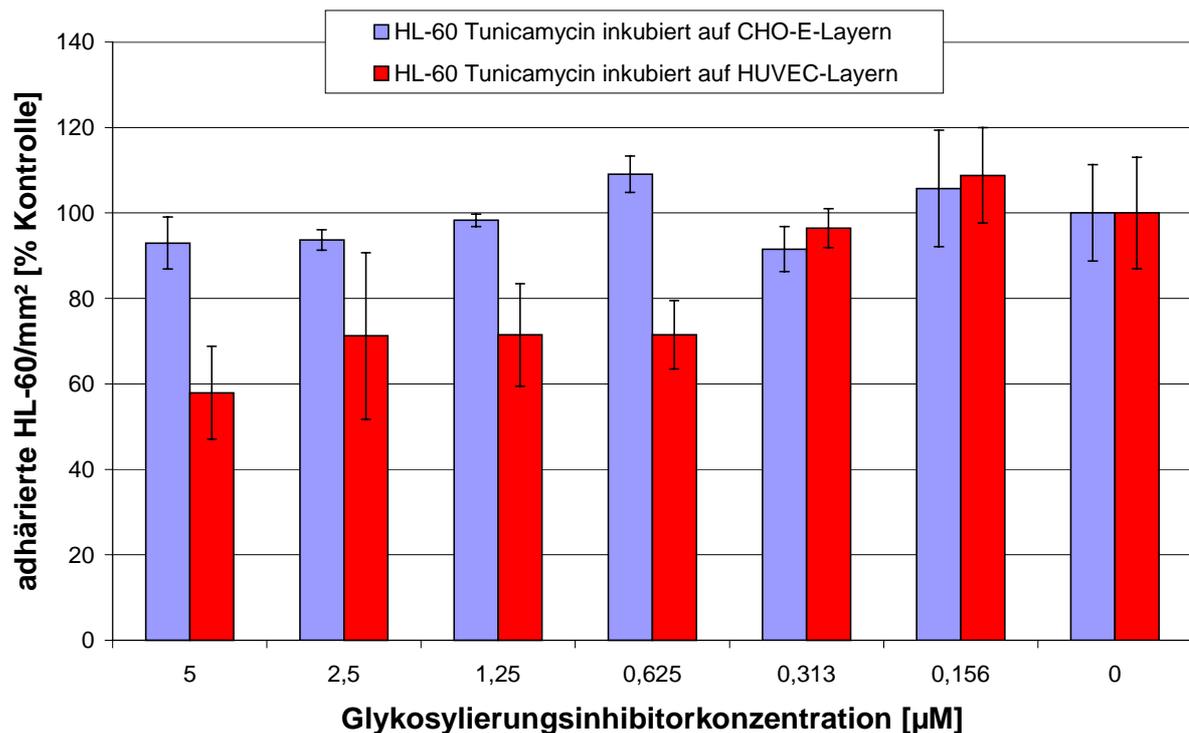


Abbildung 3.52: Adhärierte HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern bzw. auf HUVEC-Layern nach 6stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit den angegebenen Konzentrationen des Glykosylierungsinhibitors Tunicamycin.

Im Gegensatz dazu zeigte die Inkubation der HL-60 Zellen mit einer Konzentration von 5 µM Tunicamycin bezüglich ihrer Adhäsion zu HUVEC, die zuvor mit 50 ng/mL IL-1β für vier Stunden zur E-Selektin-Expression induziert wurden, einen Inhibitionseffekt von 42,1% (siehe Abbildung 3.52). Unter D-PDMP Einwirkung adhärten bei niedriger Konzentration von 0,01 µM 35,6% mehr HL-60 Zellen als ohne D-PDMP (siehe Abbildung 3.53). Der tendenziell gleiche Effekt wurde bereits im human/murinen System beobachtet. Die Maximalkonzentration von 30 µM ergab eine Adhäsions-Inhibition von 25,2% und damit ebenfalls fast exakt den gleichen Wert wie im murinen System. Die Auswirkung von Fumonisin B₁ war jedoch deutlich ausgeprägter. In diesem Fall konnte eine HL-60 Adhäsions-Inhibition von 44,1% erreicht werden. Das entspricht dem 8fachen Wert, der zuvor mit den CHO-E Zellen erhalten wurde. Der bei diesem Versuch additive Effekt aus Glykosphingolipid-Biosyntheseblockade und Vesikeltransporthemmung konnte aus den Ergebnissen der Brefeldin A-Inkubation ersehen werden. Mit der Höchstkonzentration von 30 µM Brefeldin A wurde eine Adhäsions-Inhibition von 70,7% erzielt.

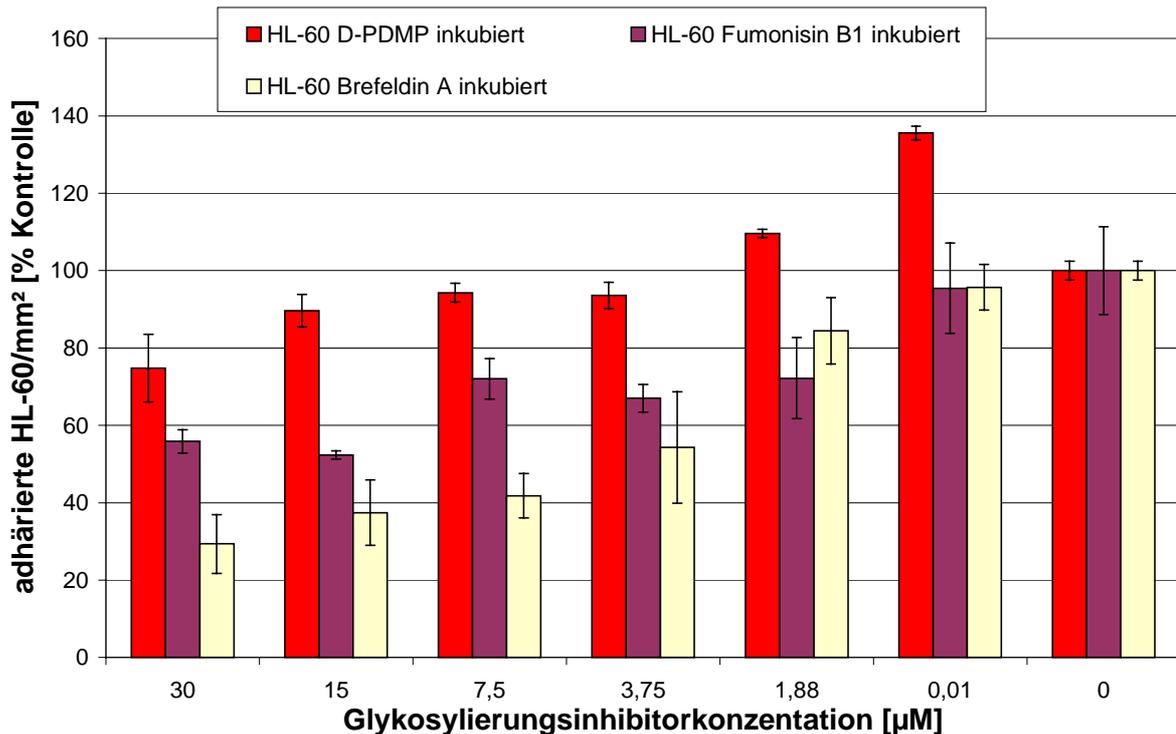


Abbildung 3.53: Adhärierte HL-60 Zellen auf HUVEC-Layern nach 6stündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der Glykosylierungsinhibitoren D-PDMP, Fumonisin B₁ bzw. Brefeldin A).

Diese Ergebnisse sprechen für eine Kombination mehrerer Liganden bei dem human/human System. N-glykosylierte Proteine können demnach einen Anteil von 42% der HL-60/HUVEC-Bindung ausmachen. Dies wurde auch bereits durch die PNGase F-Inkubation deutlich, durch die die HL-60-Zelladhäsion um 49,7% reduziert wurde (vgl. Abbildung 3.44). PSGL-1 kommt als E-Selektin Ligand auf der Oberfläche der verwendeten HL-60 nicht in Frage, da dieses Molekül nicht exprimiert wird. Glykosylierte Proteine wie der potentielle humane 250 kDa-E-Selektin-Ligand könnten für die genannte Wirkung verantwortlich sein. Dagegen würde sprechen, daß diese hochspezifisch nur an humanes, aber nicht an murines E-Selektin binden müssten.

Der Umsatz von Gangliosiden durch Internalisierung aus der Plasmamembran und Synthese scheint in geringerem Umfang oder mit niedrigerer Geschwindigkeit abzulaufen als bei Membranproteinen. Während die Reduktion der aufgrund von Interaktionen glykosylierter Proteine mit E-Selektin bedingten Zell-Zell-Adhäsion bei PNGase F- und Tunicamycin-Inkubation nahezu identisch war, konnte mit Fumonisin B₁ nur eine Inhibition der Zell-Zell-Adhäsion von 44,1% im Vergleich zu einer 71,5%igen Reduktion durch die Endoglykoceramidase-Inkubation erreicht werden. Bei Inkubation mit D-PDMP wurde lediglich ein Wert von 25,2% gemessen. Daß Ganglioside den Hauptanteil der Liganden bei der E-Selektin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion ausmachen müssen, zeigte sich besonders bei gleichzeitiger sechsstündiger Inkubation der HL-60 Zellen mit D-PDMP in einer Konzentration von 30 µM und Endoglykoceramidase mit einer Aktivität von 100 mU/mL. In diesem Experiment wurde die Anzahl der auf den HUVEC adhären HL-60 Zellen um

88,5% reduziert. Der 11,5%ige Restanteil von 186 (sd 24) Zellen setzte sich zusammen aus 6,6% sedimentierten Zellen und 4,9% Gangliosid-unabhängig adhären HL-60 Zellen in dem human/human System. Rechnerisch ergibt sich somit eine Inhibitionseffizienz von 93,4%. Die angewendete Kombination aus enzymatischer Hydrolyse und Blockade des Gangliosid-Anabolismus führte dementsprechend zu einer fast vollständigen Inhibition der HL-60 Zelladhäsion auf den HUVEC-Layern.

3.6.6 Maskierung des E-Selektins

Parallel zu den Maskierungs-Experimenten der HL-60-Ganglioside wurden die E-Selektin-Moleküle der CHO-E Zellen und der HUVEC mit Anti-E-Selektin-Antikörpern und humanen Gangliosidfraktionen blockiert. Dazu wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der nach Immunisierung einer Ziege mit humanem E-Selektin dessen antigene Determinante erkennt, aber auch mit murinem E-Selektin kreuzreagiert.

Innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 0-200 $\mu\text{g/mL}$ anti-E-Selektin-Antikörper konnte nach Inkubation der CHO-E Zellen und Durchführung des statischen Adhäsionsassays lediglich eine maximale Inhibition der HL-60-Adhäsion von 4,4% unter Einsatz der höchsten Konzentration erreicht werden (siehe Abbildung 3.54).

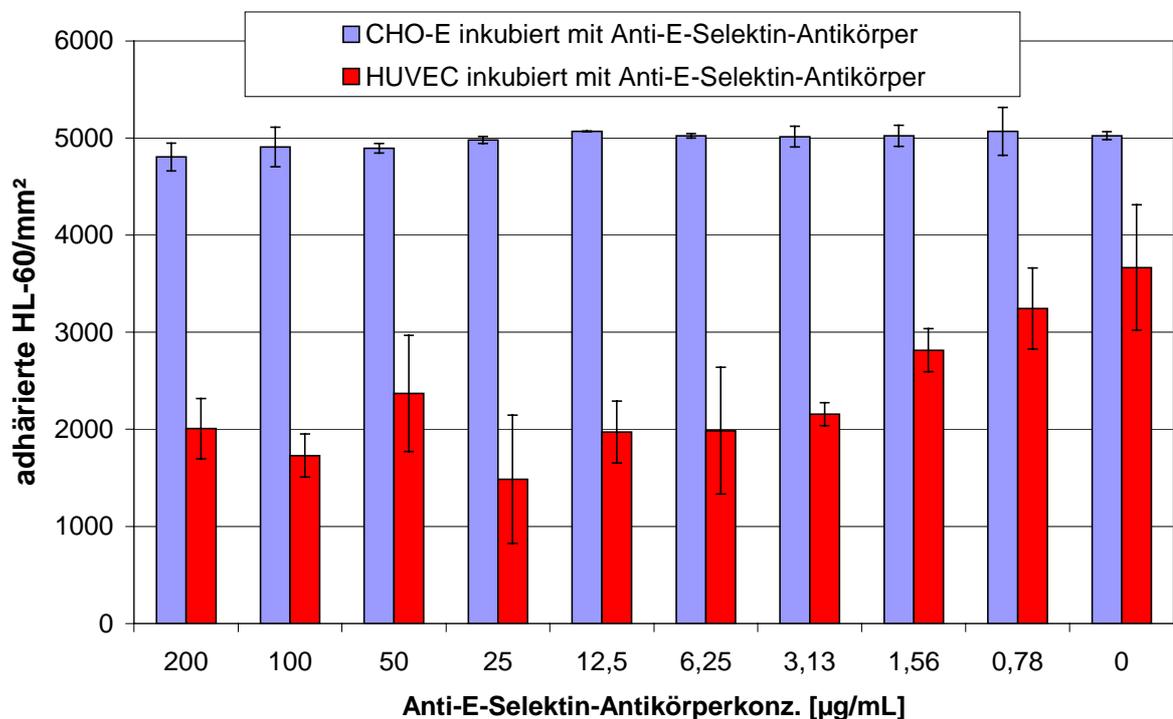


Abbildung 3.54: Adhärenz von HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern bzw. HUVEC-Layern nach der 1stündigen Inkubation der Layer mit anti-human-E-Selektin-Antikörpern zur Maskierung des E-Selektins.

Dies kann zwei Ursachen haben. Zum einen ist möglicherweise die Kreuzreaktivität zu gering, wodurch das murine E-Selektin nicht ausreichend maskiert wurde. Zum anderen könnte die membranständige E-Selektin-Konzentration höher als die zugegebene Antikörperkonzentration gewesen sein, wodurch nur ein relativ geringer Anteil an E-Selektin-Molekülen maskiert wurde. Der Beweis für die E-Selektin-vermittelte Adhäsion zwischen den HL-60 Zellen und den CHO-E Zellen wurde aber bereits durch die Kontrollexperimente mit den CHO-K1 Zellen erbracht.

Aussagekräftiger sind dagegen die Ergebnisse des Adhäsionstestes der HL-60 Zellen mit HUVEC-Layern nach der Antikörper-Maskierung des humanen E-Selektins. Mit einer Antikörperkonzentration von 6,25 µg/mL wurde bereits ein Sättigungsbereich erreicht, bei dem die HL-60 Zelladhäsion um 47,2% vermindert wurde. Auch die weitere Konzentrationserhöhung um das 2-32fache ergab im Mittel nur noch eine geringfügige Steigerung dieses Wertes um 2%.

Im statischen Adhäsionssystem wurde dementsprechend die Bindung der HL-60 Zellen auf dem HUVEC-Layer zu 49,2% durch E-Selektin-vermittelte Affinität hervorgerufen. L-Selektin kann mit dem maskierten E-Selektin ebensowenig eine Bindung eingehen wie seine restlichen Liganden. Endothelzellganglioside von induzierten Endothelzellen könnten als mögliche Bindungspartner des L-Selektins in Frage kommen, bisher sind aber lediglich Untersuchungen von Gangliosiden unstimulierter Endothelzellen durchgeführt wurden bei denen als Hauptbestandteil G_{M3} gefunden wurde (Müthing *et al.*, 1999). Der restliche Anteil der HL-60-Zelladhäsion wurde also durch E- und L-Selektin-unabhängige Bindungsmechanismen wie z.B. Integrin/Adhäsion- bzw. Calcium-unabhängige Wechselwirkungen verursacht. Eine weitere Möglichkeit ist eine Mitwirkung eines N-glykosylierten HL-60 Proteins, das an von E-Selektin unterscheidbare Strukturen binden muß.

Als weitere Strategie wurden native Liganden des E-Selektins zur Maskierung des murinen und des humanen E-Selektins eingesetzt. Das Inhibitionspotential der Gangliosidfraktionen aus humanen Granulocyten in bezug auf die HL-60-Zelladhäsion wurde zunächst im human/murinen System getestet. Dazu wurden humane Gangliosidfraktionen für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einem Konzentrationsbereich von 0-200 µg/mL auf den CHO-E-Layern gegeben. Höhere Gangliosidkonzentrationen führten zu einer Lyse der Zellen. Die Auswertung der statischen Adhäsionsassays ergab für die Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 im Rahmen der Standardabweichungen keine inhibitorische Wirkung der HL-60 Zelladhäsion (siehe Abbildung 3.55). Auch die humanen Granulocytenfraktionen, die alle E-Selektin-bindende Strukturen aufwiesen (vgl. Abbildung 3.23), hatten - mit Ausnahme der Fraktion JM07/7-3 - keine signifikante negative Auswirkung auf die Anzahl adhärerter Zellzahlen. Während bei Einsatz der Fraktion JM07/7-4S die Anzahl adhärerter HL-60 Zellen ab einer Konzentration von 25 µg/mL sogar um 13,2% im Vergleich zu der Kontrolle ohne Gangliosidzugabe zunahm, wurde diese bei Anwendung der Fraktion JM07/7-3 mit einer Konzentration von 200 µg/mL um 18,9% reduziert. Da nicht bekannt war, wie sich die ca. 26 strukturell und anteilig verschiedenen Gangliosidmolekülanteile in jeder der einzelnen Fraktionen aufgrund ihres amphipathischen Charakters im wässrigen Milieu organisierten (Micellen, Vesikel), konnten aus diesem Experiment keine Rückschlüsse auf

ihre Funktion als potentielle Liganden des E-Selektins gezogen werden. Es ist bekannt, daß Ganglioside erst oberhalb einer kritischen Konzentration Micellen bilden (Kanfer and Spielvogel, 1973). Die Anordnung der Ganglioside der Fraktion JM07/7-3 bewirkte die größte Adhäsionsinhibition. Dieses Ergebnis läßt aber keine Aussage über die E-Selektin-Bindungsrelevanz einzelner Ganglioside zu.

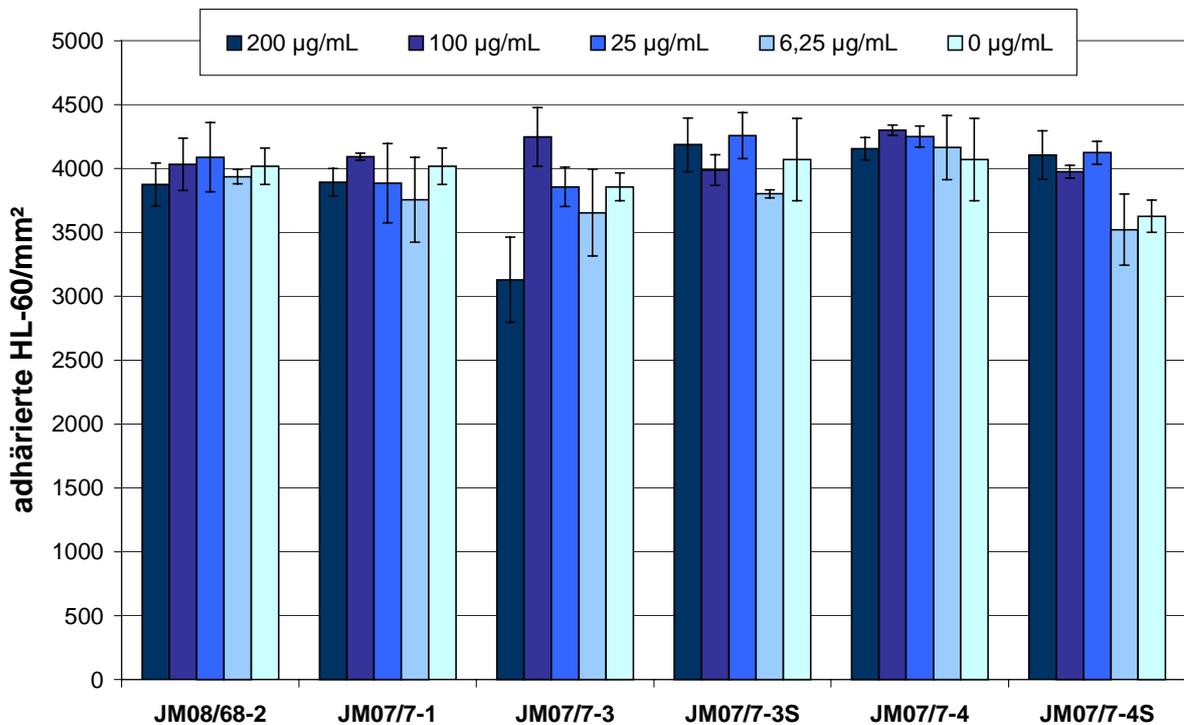


Abbildung 3.55: Adhärenz von HL-60 Zellen auf CHO-E-Layer nach 20minütiger Inkubation der Layer mit den angegebenen Konzentrationen der humanen Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 bzw. der Gangliosidfraktionen aus humanen Granulocyten JM07/7-1, JM07/7-3, JM07/7-3S, JM07/7-4 und JM07/7-4S zur Maskierung des E-Selektins.

HUVEC-Layer wurden ebenfalls für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit den für die Experimente mit den CHO-E Zellen eingesetzten Gangliosidfraktionen inkubiert, jedoch nur bis zu einer Konzentration von 100 µg/mL. Es zeigte sich ebenfalls keine Auswirkung der humanen Hirnganglioside sowie der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-1 auf die HL-60-HUVEC-Zelladhäsion (siehe Abbildung 3.56). Die Fraktion JM07/7-3S bewirkte in einer Konzentration von 25 µg/mL eine Zunahme der adhärenz von HL-60-Zellen um 18,0%, hatte innerhalb des restlichen Konzentrationsbereiches aber keinen Effekt. Die Fraktion JM07/7-4 wies tendenziell mit zunehmender Konzentration ebenfalls eine eher Adhäsionsfördernde Wirkung mit einem Spitzenwert von 60,0% auf. Allerdings waren die Standardabweichungen des Kontrollansatzes in diesem Experiment mit einem Wert von $\pm 41,0\%$ sehr hoch. Einzig mit der Fraktion JM07/7-3 konnte ab einer Konzentration von 25 µg/mL eine maximale Adhäsionsinhibition von 72,5% erreicht werden.

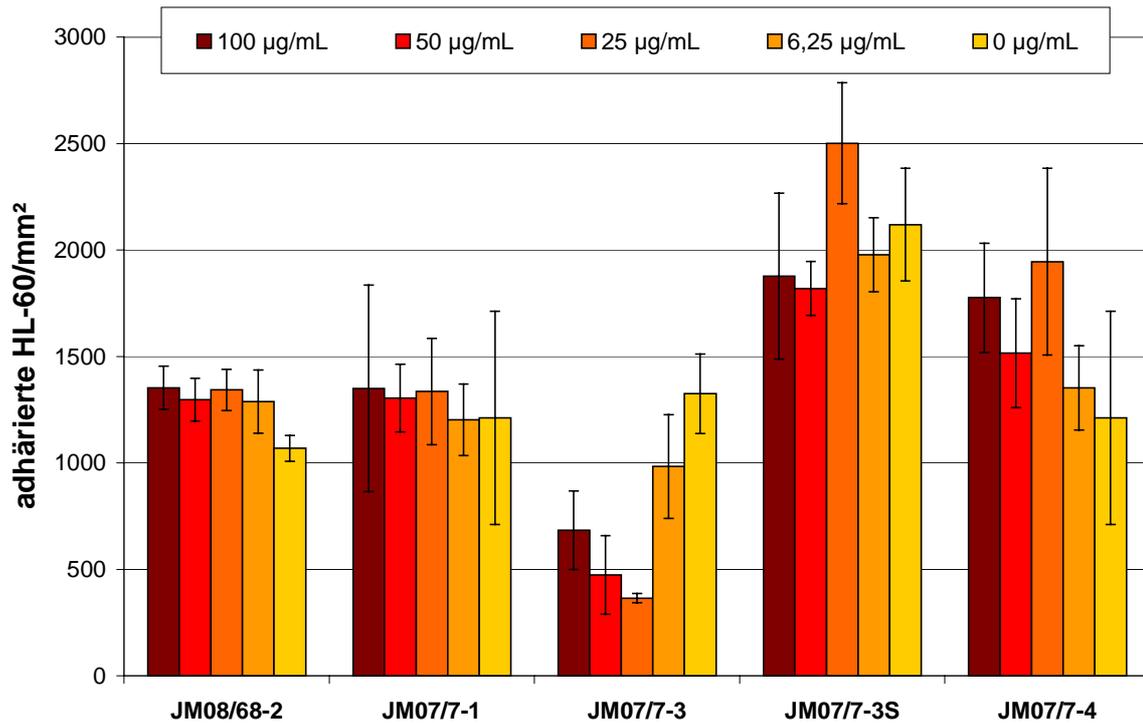


Abbildung 3.56: Adhärierte HL-60 Zellen auf HUVEC-Layer nach 20minütiger Inkubation der Layer mit den angegebenen Konzentrationen der humanen Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 bzw. der Gangliosidfraktionen aushumanen Granulocyten JM07/7-1, JM07/7-3, JM07/7-3S und JM07/7-4 zur Maskierung des E-Selektins.

Aus den erhaltenen Ergebnissen konnte geschlossen werden, daß nur die Komponenten aus der humanen Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-3 fähig waren, im wässrigen Milieu eine Anordnung zu bilden, die sowohl an murines als auch an humanes E-Selektin bindet und somit die HL-60-Adhäsion quantitativ reduziert.

Daher wurde im folgenden versucht, die Komponenten der Gangliosidfraktionen dem murinen E-Selektin sterisch so zugänglich zu machen, daß diese binden können. Zunächst wurden die Ganglioside in Liposomen inseriert, wobei mittels Extrusion durch zwei Polycarbonatmembranen mit Porendurchmessern von 100 nm Liposomen entstanden, in die die Ganglioside inserierten. Da allerdings nicht bekannt war, welcher prozentuale Anteil der Ganglioside mit ihrem Kohlenhydratanteil topologisch nach außen zeigte, sind die zugehörigen Konzentrationsangaben auf die jeweils eingesetzte Gangliosidkonzentration bezogen, die aber nicht der tatsächlich dem E-Selektin zugänglichen entsprechen muß.

Die Ergebnisse des statischen Adhäsionsassays mit CHO-E Zellen, die für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit den Gangliosid-haltigen Liposomen in einem Konzentrationsbereich von 0-200 µg/mL inkubiert wurden, sind in Abbildung 3.57 dargestellt. Mit sämtlichen Fraktionen konnten in dem Konzentrationsbereich von 0-100 µg/mL keine Inhibitionen der HL-60-Adhäsion erreicht werden, die außerhalb der Standardabweichungen der Kontrolle lagen. Bei Einsatz der höchsten Konzentration von 200 µg/mL trat eine Inhibition der HL-60-Zelladhäsion bei der Fraktion JM07/7-1 von 23,3% auf. Die Fraktion JM07/7-3 zeigte eine inhibitorische Wirkung von 8,7% und damit einen um 10,2% schwächeren Effekt als

die nicht in Liposomen inserierte Fraktion. Auch die Fraktion JM07/7-3S bewirkte eine Reduktion der Anzahl adhärenz HL-60-Zellen um 8,1%. Die stärkste Inhibition wurde nach Inkubation mit der JM07/7-4 Fraktion festgestellt. Sie inhibierte die E-Selektin-vermittelte Adhäsion um 32,9%. Bei Anwendung der Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 wurde keine Inhibition der HL-60-Zelladhäsion festgestellt.

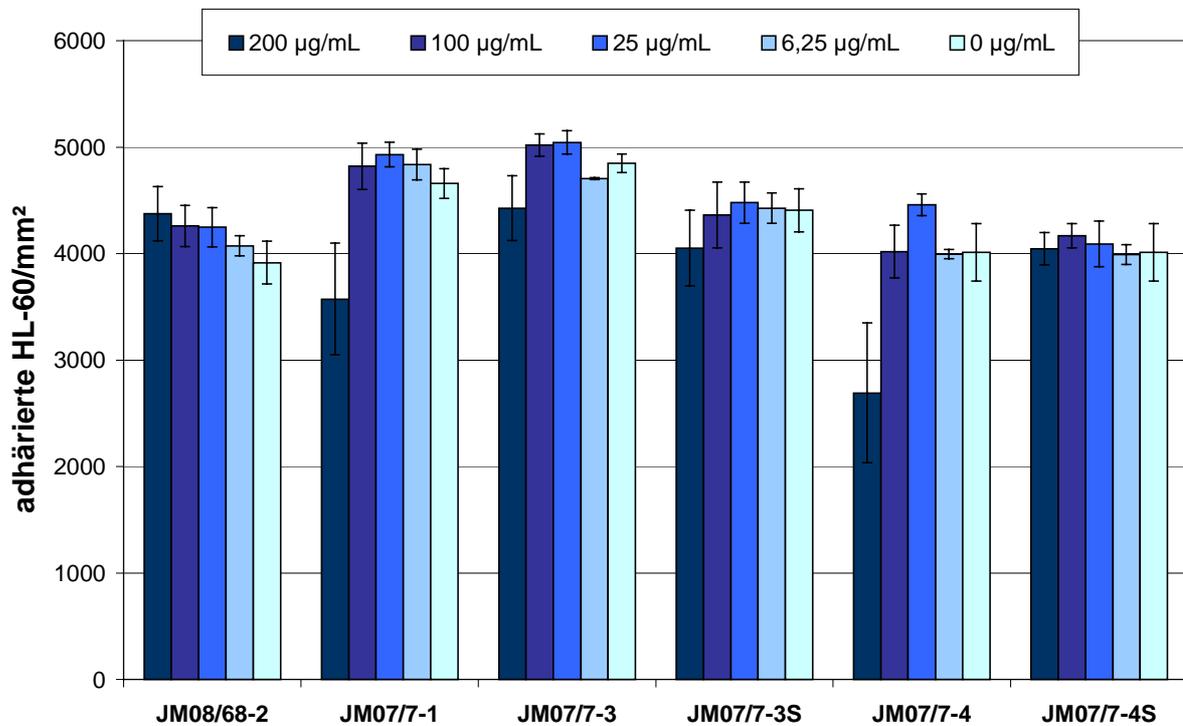


Abbildung 3.57: Anzahl adhärenzter HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach 20minütiger Inkubation der Layer mit den angegebenen Konzentrationen der in Liposomen inserierten humanen Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 bzw. der humanen Granulocytengangliosidfraktionen JM07/7-1, JM07/7-3, JM07/7-3S, JM07/7-4 und JM07/7-4S zur Maskierung des E-Selektins.

Durch Insertion der Ganglioside in Liposomen konnten die bindenden sialylierten Epitope dem murinen E-Selektin zugänglich gemacht werden. Eine Konzentration von 200 µg/mL der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-4 hatte einen 7,5mal höheren inhibitorischen Effekt als der in derselben Konzentration zugefügte anti-E-Selektin-Antikörper. Legt man ein Molekulargewicht des anti-E-Selektin-IgGs von etwa 150 kDa und das mittlere Molekulargewicht der Granulocytenganglioside von etwa 2 kDa zugrunde, so ergeben sich molare Konzentrationen von 1,33 µM bzw. 100 µM. Die Ganglioside wurden also in 75facher Konzentration im Vergleich zu der des Antikörpers verwendet. Geht man von einer statistischen Verteilung der amphipathischen Moleküle in den Liposomen bezüglich ihrer Ausrichtung nach innen bzw. außen von 1:1 aus, war die Konzentration im Vergleich zu den Antikörpern noch immer 37,5fach höher. Allerdings haben die Liposomen eine kugelförmige Gestalt mit einer Oberfläche ($4\pi r^2$, $r=50$ nm) von ca. $0,03 \mu\text{m}^2$, auf der sich die dargebotenen potentiellen Liganden verteilen. Dadurch sind sicherlich nicht alle potentiellen

Liganden in den Liposomen dem E-Selektin gleichzeitig zugänglich. Aus den inhibitorischen Effekten läßt sich berechnen, daß in etwa eine 5fach höhere molare Konzentration der dargebotenen Granulocytenganglioside der Fraktion JM07/7-4 im Vergleich zu dem anti-E-Selektin-Antikörper notwendig ist, um eine qualitativ gleiche Maskierung der murinen E-Selektin-Moleküle zu erreichen. Da aber weder der Anteil der Liposomenkugeloberfläche bekannt ist, mit dem E-Selektin interagiert, noch Aussagen über die Membranfluidität dieser Vesikel und die damit dem E-Selektin tatsächlich zugänglichen Gangliosidstrukturen gemacht werden können, ist die Berechnung der relativen Bindungsaffinität nicht präzise durchführbar.

Zusätzlich zu den Experimenten mit Liposomen wurde die Eignung von Albumin als Trägerprotein zur Präsentation von Granulocytengangliosiden untersucht. Dazu wurden jeweils 1 mg humane Ganglioside der Fraktionen JM07/7-1, JM07/7-3S bzw. JM07/7-4 an 1 mg fettfreies Albumin adsorbiert. Ganglioside wurden von dem mit Gangliosiden beladenen Albumin mittels RP18-Kieselgelchromatographie unter Verwendung eines Methanol/Wasser-Elutionsstufengradienten getrennt. Die erste Fraktion enthielt dabei das beladene Albumin. Sie wurde jeweils im statischen Adhäsionsassay zur Maskierung des murinen E-Selektins der CHO-E Zellen verwendet, wobei parallel eine Bestimmung des adsorbierten Gangliosidanteils erfolgte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.58 dargestellt. Da die jeweiligen Gangliosidfraktionen in den Einzelexperimenten in unterschiedlichem Maße an das Albumin adsorbierten, ergaben sich jeweils verschiedene Ausgangskonzentrationen.

Aus den Zellzählungen wird deutlich, daß Albumin die Gangliosidmoleküle zwar binden kann, diese aber für eine Wechselwirkung mit den E-Selektin-Molekülen nur in bedingtem Maße präsentiert. So waren bei den Fraktionen JM07/7-1 und JM07/7-4 Gangliosidkonzentrationen von mehr als 500 µg/mL notwendig, um eine 8,2%ige bzw. 32,1%ige Inhibition der HL-60-Adhäsion an CHO-E Zellen zu erreichen. Die Hauptkomponenten der Fraktion JM07/7-1 - die Ganglioside mit nLc₄Cer- und nLc₆Cer-Grundstruktur der Bandenregion 7 (vgl. Abbildung 3.23) - wurden durch das Albumin möglicherweise an der Wechselwirkung mit dem murinen E-Selektin sterisch gehindert, da bei der Liposomenpräsentierten Inkubation mit einer etwa 0,3fachen Konzentration eine 2,8fach stärkere Inhibition der HL-60-Adhäsion auftrat. Die Hauptkomponenten mit längerem Kohlenhydratanteil der Fraktion JM07/7-4 – Ganglioside mit nLc₈Cer-, nLc₁₀Cer- und nLc₁₂Cer-Grundstruktur der Bandenregion 9-14 (vgl. Abbildung 3.23) erzielten dagegen mit einer etwa 0,3fachen Konzentration eine fast identische Inhibition der HL-60-Adhäsion. Allerdings wurde mit Applikation der Fraktion JM07/7-3S die Strukturen der Bandenregionen 7-15 enthielt lediglich eine Reduktion der adhärenierten HL-60 Zellzahl von 2,7% erreicht. Die Kohlenhydratlänge der Ganglioside ist also allein kein Maß für die Inhibitionseffizienz. Im Unterschied zu den Fraktionen JM07/7-1 und JM07/7-4 besaß die Fraktion JM07/7-3S in der Bandenregion 10 kaum E-Selektin-bindende Strukturen. Dafür waren aber die Strukturen in den Bandenregionen 14 und 15 zahlreicher vorhanden. Entweder sind also die Ganglioside der Bandenregion 10 bevorzugte Liganden des E-Selektins, oder

die Strukturen der Bandenregionen 14 und 15 überlagerten die für eine E-Selektin-Wechselwirkung maßgeblichen Bindungsantigene.

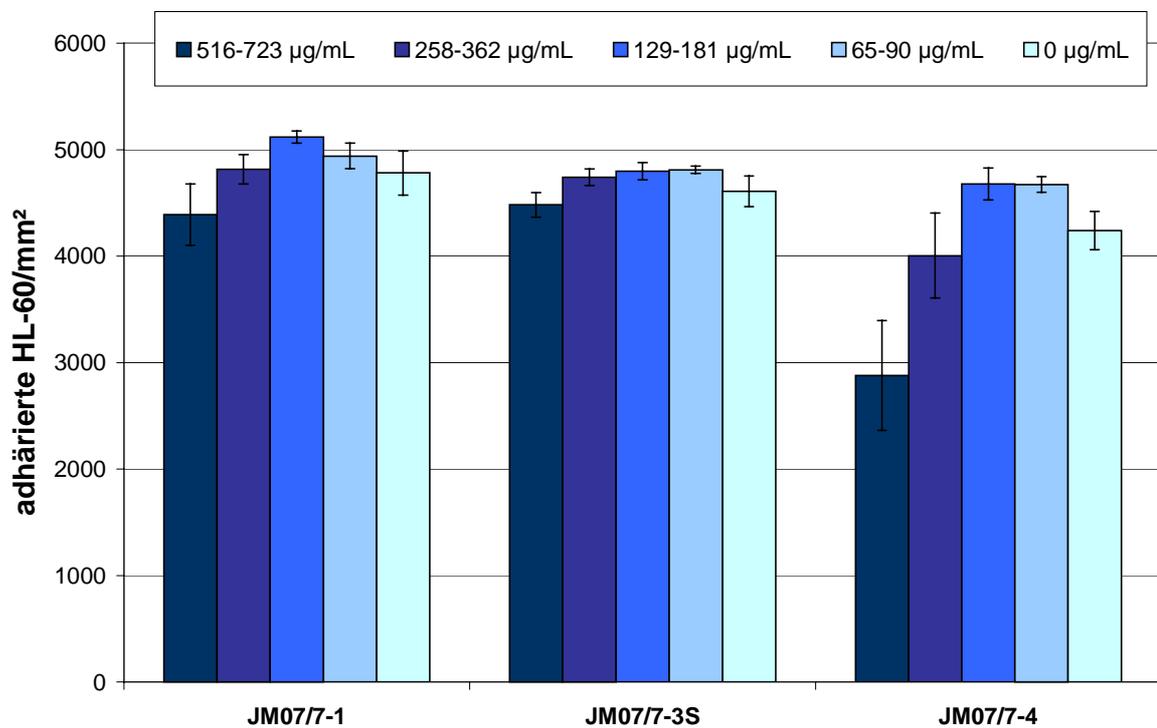


Abbildung 3.58: Anzahl adhärterter HL-60 Zellen auf CHO-E-Layer nach 20minütiger Inkubation der Layer mit den angegebenen Konzentrationen der an Albumin adsorbierten humanen Granulocytenfraktionen JM07/7-1, JM07/7-3S und JM07/7-4 zur Maskierung des E-Selektins.

An Albumin adsorbierte Granulocytenganglioside sind ab einer Konzentration von 500 µg/mL in der Lage, eine Adhäsionsinhibition von HL-60 Zellen an murines E-Selektin zu verursachen. Die hier mindestens 3fach höhere Effektivität der Applikation von Liposomen-inserierten Gangliosiden (siehe Abbildung 3.57) im Vergleich zu den auf Albumin adsorbierten Gangliosiden ist möglicherweise auf die Beweglichkeit von Gangliosiden im fluiden Lipidlayer der Liposomen zurückzuführen, durch die mehr Liganden in eine Wechselwirkung mit dem murinen E-Selektin treten können. Das Albuminmolekül scheint dagegen nicht flexibel genug zu sein um eine äquivalente Präsentation der Liganden zu bewirken.

Ein weiteres Protein, das als Trägermolekül eingesetzt wurde war HDL. Nach Inkubation von 1 mg des Lipoproteins mit 1 mg Granulocytengangliosiden und anschließender Trennung der nicht adsorbierten Ganglioside von dem beladenen HDL mittels Affinitätschromatographie in der RP18-Kieselgel-Säule wurde das Gangliosid-tragende HDL im statischen Adhäsionsassay zur Ermittlung des Inhibitions potentials der HL-60 Zelladhäsion zu CHO-E Zellen eingesetzt. Wie schon bei den Untersuchungen mit Albumin beobachtet, wurden in den Einzelerperimenten unterschiedliche Gangliosidmengen an das HDL ge-

bunden. Die angewendeten Konzentrationsbereiche der Fraktionen JM07/7-3S und JM07/7-4 sind in Abbildung 3.59 angegeben. Eine Inhibition der Zelladhäsion trat erst bei Gangliosidkonzentrationen von mehr als 745 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf. Die Fraktion JM07/7-3S verursachte eine 21,9%ige und die Fraktion JM07/7-4 eine 17,8%ige Reduktion der gebundenen Anzahl an HL-60 Zellen auf dem CHO-E-Zellayer. Im Vergleich zum Ansatz mit an Albumin adsorbierten Gangliosiden der Fraktion JM07/7-3S wurde bei Anwendung der 1,35fachen Konzentration eine 8fach größere Wirkung erzielt, wogegen die Fraktion JM07/7-4 nur etwa halb so effizient war.

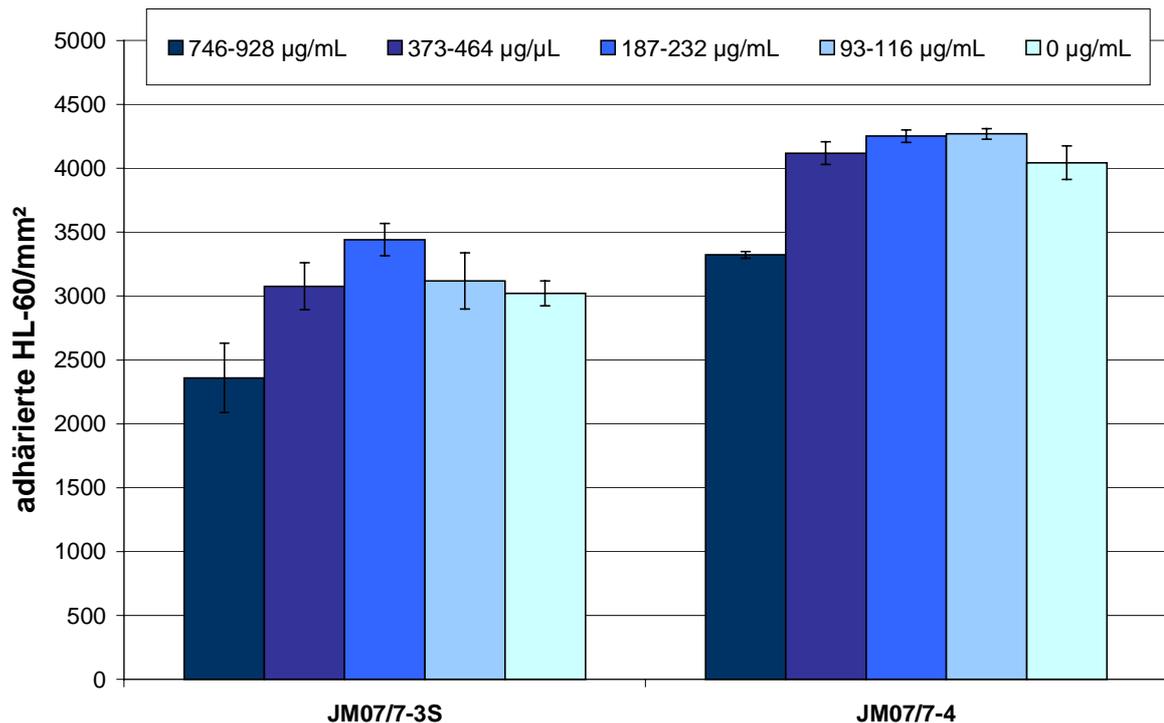


Abbildung 3.59: Anzahl adhärierter HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern nach 20minütiger Inkubation der Layer mit den angegebenen Konzentrationen der an HDL adsorbierten humanen Granulocytenfraktionen JM07/7-3S und JM07/7-4 zur Maskierung des E-Selektins.

Da HDL humane Granulocytganglioside bindet, eignet es sich zur Exposition dieser Moleküle für eine Wechselwirkung mit murinem E-Selektin. Allerdings präsentiert das HDL die adsorbierten Granulocytganglioside in anderer Weise als das Albumin, so daß entweder qualitativ unterschiedliche Ganglioside an das E-Selektin binden oder quantitativ dem E-Selektin aus sterischen Gründen weniger Ganglioside angeboten werden. Eine Inhibition der HL-60 Adhäsion auf CHO-E Zellen tritt erst ab einer Gangliosidkonzentration von 746 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf.

3.7 Das dynamische Adhäsionssystem

Das statische Adhäsionssystem stellt eine starke Simplifizierung der inflammatorisch auftretenden Zell-Zell-Wechselwirkungen dar und kann das *in vivo*-auftretende Rolling der Granulocyten auf den Endothelzellen nicht wiedergeben. Die jeweilige Kontaktzeit eines interagierenden Plasmamembranausschnittes der Granulocyten von 1/10 des Zellumfanges mit den Endothelzellen beträgt *in vivo* bei Rollgeschwindigkeiten von 800 $\mu\text{m/s}$ und Granulocytendurchmessern von 15 μm etwa 12 ms pro Umdrehung. Bei einer Rollstrecke von 1 mm und einer Umdrehungsfrequenz von 8,5 /s ergibt dies eine absolute Kontaktzeit von 100 ms des betreffenden Plasmamembranausschnittes. Diese Kontaktzeit ist mindestens 1200mal kürzer als die im statischen System wenigstens für zwei Minuten auftretende Interaktion. Für die Durchführung von Experimenten zur Nachbildung der dynamischen *in vivo*-Verhältnisse mußte demnach eine den Venolen nachempfundene Fließkammer entwickelt werden.

3.7.1 Etablierung des Systems

Im Gegensatz zu dem rhythmischen diskontinuierlichen Blutfluß im Menschen sollte der HL-60-Zellsuspensionsfluß in der Fließkammer kontinuierlich ohne Pulsation verlaufen um die visuelle Betrachtung zu erleichtern und die Rollgeschwindigkeiten bestimmen zu können. Außerdem ist bei konstanter Fließgeschwindigkeit die Wandschubspannung ebenfalls konstant, so daß eine Darstellung der Funktion der adhärenen Zellen bzw. der Rollgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Wandschubspannung möglich ist.

Zunächst wurde die zellschädigende Wirkung von sechs Pumpen bei zweistündiger Anwendung mit einer Flußrate (Volumenstrom) von 5 mL/min bei 37°C ermittelt. Zu diesem Zweck wurden jeweils 100 mL HL-60 Suspension mit einer Konzentration von $1,8 \cdot 10^6$ Zellen/min in Kreisläufen gepumpt und die LDH-Aktivitätsfreisetzung gemessen. Drei der sechs Pumpen förderten bauartbedingt pulsationsfrei. Dazu gehörte die Hubzapfenpumpe P50 (PHARMACIA) und die beiden Peristaltikpumpen Perimax 16 (SPETEC) und WM 503 (WATSON MARLOW; mit „L-Pumpkopf“). Bei den beiden letztgenannten Pumpen war der Schlauch über zwei Y-Verbinder in zwei Schläuche aufgeteilt. Durch versetzte Andruckpunkte wurden in den Schläuchen Druckmaximum und Druckminimum jeweils entgegengesetzt erzeugt, so daß sich bei Zusammenführung der beiden Schläuche ein konstanter Druck und damit ein pulsfreier Fluß einstellte. Zum Vergleich wurden drei Peristaltikpumpen mit konventionellen Pumpköpfen angewendet die nur einen durchführenden Schlauch besaßen und somit pulsweise förderten. Zwei dieser Pumpen, die P1 (PHARMACIA) und die WM101 (WATSON MARLOW), sind für kleine Förderleistungen ausgelegt und fördern bei Verwendung von Silikonschläuchen mit 2 mm Innendurchmesser bis zu 5,5 mL/min bzw. 13,8 mL/min. Die dritte Pumpe WM505 (WATSON MARLOW) mit dem Pumpkopf BA8 kann dagegen bei Verwendung des gleichen Schlauchtyps bis zu 39 mL/min fördern.

Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 3.60 dargestellt. Innerhalb von 120 Minuten nahm die LDH-Aktivität im Kontroll-Ansatz um 48 U/L (sd 18 U/L) zu. Die LDH-Endaktivitäten der Zellsuspensionen, die mit Peristaltikpumpen gefördert wurden, waren alle im Bereich der Standardabweichung der Kontroll suspension. In den Ansätzen mit den Pumpen P1 und WM101 wurden mit einer ausgelösten LDH-Aktivitätsfreisetzung von 31 bzw. 36 U/L die geringsten zellschädigenden Einflüsse gemessen. Mit Anwendung der dritten pulsweise fördernden Pumpe WM505 resultierte eine LDH-Endaktivität von 57 U/L.

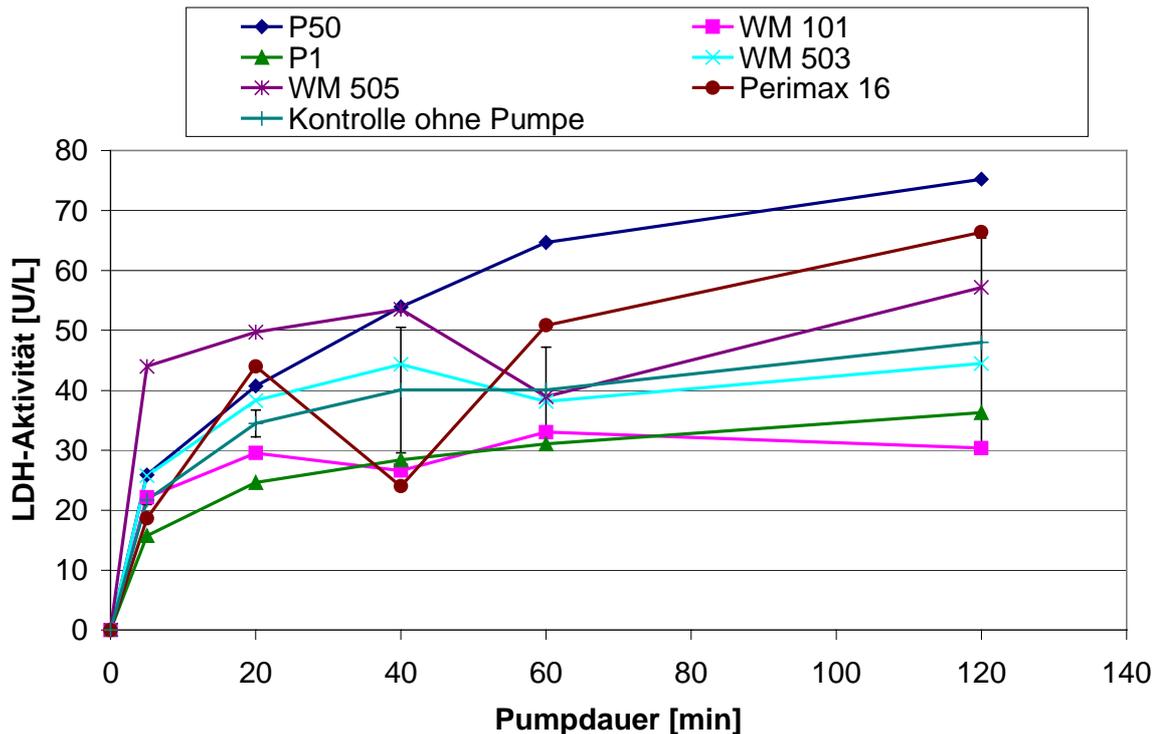


Abbildung 3.60: LDH-Aktivitätsfreisetzung von 100 mL HL-60 Zellsuspensionen in einer Konzentration von $1,8 \cdot 10^6$ Zellen/min die mit einer Flußrate von 5 mL/min in Kreisläufen gepumpt werden. Der Einfluß von drei pulsationsfrei fördernden Pumpen (P50, Perimax 16 und WM503) und drei pulsweise fördernden Pumpen (P1, WM101 und WM505) wurde mit der nicht-geförderten Kontroll-Zellsuspension verglichen.

In den Ansätzen mit den pulsfrei fördernden Peristaltikpumpen WM503 und Perimax 16 wurden LDH-Endaktivitäten von 44 U/L bzw. 66 U/L ermittelt. Lediglich die Zellsuspension die von der Hubzapfenpumpe P50 gepumpt wurde zeigte eine im Vergleich zum Bereich der Kontrollansätze erhöhte LDH-Aktivitätsfreisetzung. In diesem Ansatz wurde eine LDH-Endaktivität von 75 U/L detektiert.

Peristaltikpumpen sind demnach besser für eine Zell-schonende Förderung geeignet als Hubzapfenpumpen. Da die drei pulsweise fördernden Peristaltikpumpen P1, WM101 und WM505 aber prinzipiell für die Verwendung im Fließkammersystem nicht in Frage kamen, schränkte sich die Auswahl auf die zwei verbleibenden pulsfrei fördernden Peristaltikpumpen WM503 und Perimax 16 ein. Obwohl die indirekte Ermittlung der Zellschädigung im Testansatz mit der WM503 Pumpe die geringeren Werte ergab, wurde auf die Verwendung

dieser Pumpe verzichtet, da der Pumpkopf lediglich Förderleistungen von 1-138 mL/min zuließ. Damit wären Messungen im hypo-physiologischen Bereich nicht möglich gewesen. Die Pumpe Perimax 16 konnte dagegen mit Schläuchen von 0,25 mm bzw. 1 mm Innendurchmesser einen Förderleistungs-Bereich von 0,030 mL/min bis 7,7 mL/min abdecken. Dadurch waren Messungen sowohl im hypo-physiologischen als auch im physiologischen Wandschubspannungsbereich möglich. Die Wahl der zu verwendenden Pumpe fiel also auf die Perimax 16.

Die Experimente in der Fließkammer wurden bei zwei unterschiedlichen Wandschubspannungen, einer hypo-physiologischen von $0,15 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ und einer physiologischen von $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$, durchgeführt. Unter Annahme einer kinematischen Viskosität von $0,77 \cdot 10^6 \text{ m}^2/\text{s}$ des DMEM/F12 Mediums mit 5% FCS-Anteil bei einer Temperatur von 37°C ergeben sich mit einer Fließkammerhöhe von $900 \mu\text{m}$ diese Wandschubspannungen bei Flußraten von 0,132 bzw. 0,900 mL/min. Die sich daraus ergebenden Fließgeschwindigkeitshalbprofile wurden theoretisch berechnet und sind in Abbildung 3.61 dargestellt.

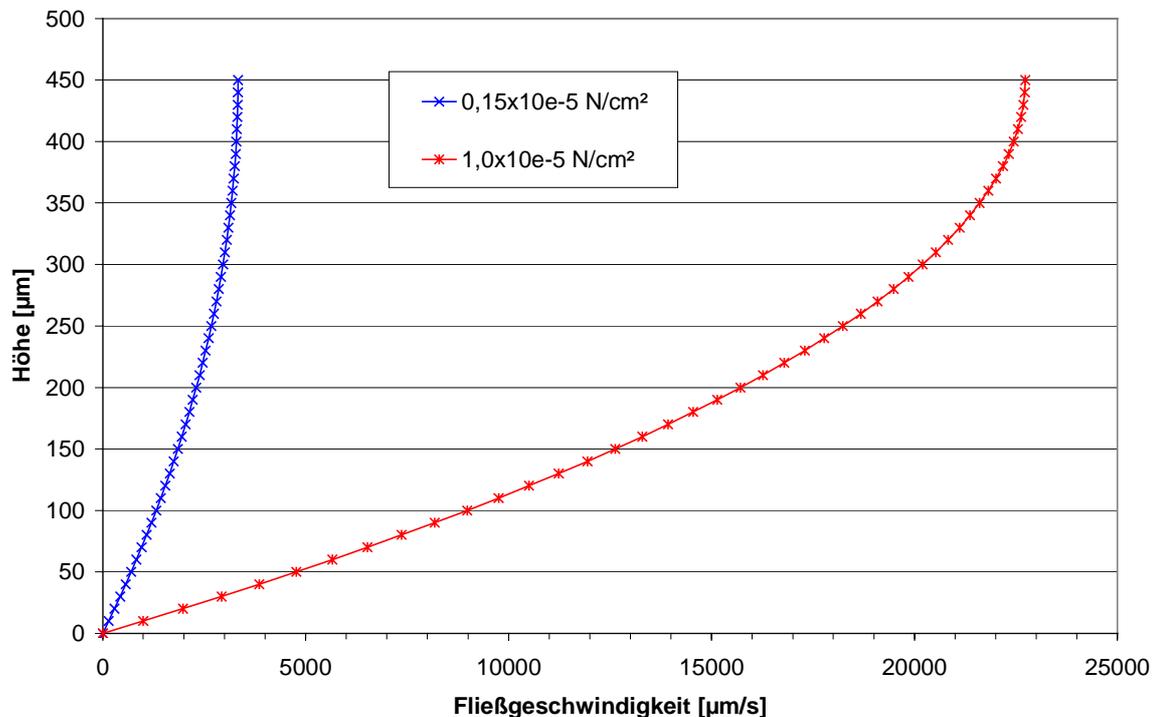


Abbildung 3.61: Theoretische Halbprofile der Fließgeschwindigkeiten bei $900 \mu\text{m}$ Fließkammerhöhe und Wandschubspannungen von $0,15 \cdot 10^{-5}$ bzw. $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$.

Zur Ermittlung der theoretischen Rollgeschwindigkeiten der HL-60 Zellen in der Fließkammer muß der Zelldurchmesser bekannt sein, da die Geschwindigkeit der die Zellen umströmenden Fluidelemente von der Höhe abhängt. Der mittlere HL-60-Zelldurchmesser wurde mit dem Partikelmeßgerät CASY (SCHÄRF) bestimmt (siehe Abbildung 3.62). Er betrug $12,2 \mu\text{m}$. Wird dieser Wert als Höhe im theoretisch berechneten Geschwindigkeitsprofil der Fließkammer einer Fluidelementengeschwindigkeit zugeordnet, so ergeben

sich bei Wandschubspannungen von $0,15 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ bzw. $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ Rollgeschwindigkeiten von $178 \mu\text{m/s}$ bzw. $1216 \mu\text{m/s}$.

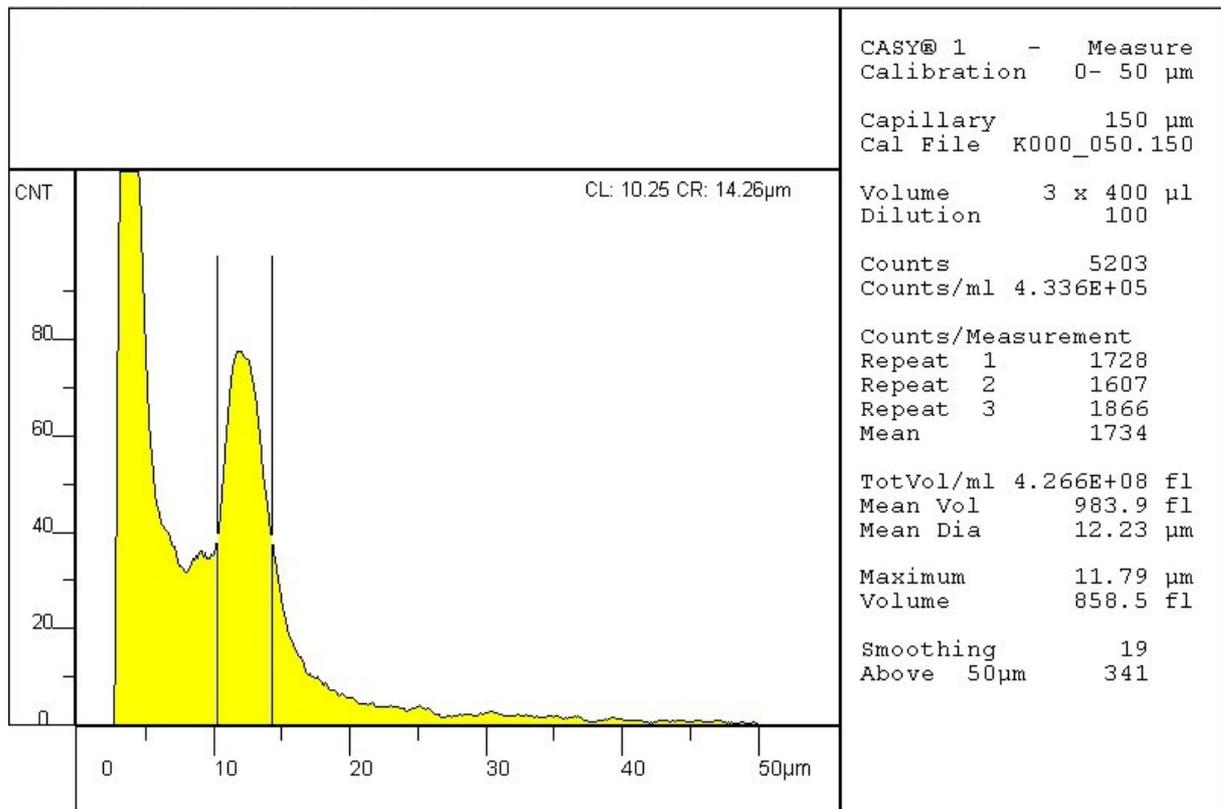


Abbildung 3.62: Durchmesserprofil einer HL-60 Kultur aus einem Spinner. Die Grenzen wurden auf halb-maximale Profilhöhe eingestellt. Daraus ergibt sich ein mittlerer HL-60-Zelldurchmesser von $12,2 \mu\text{m}$.

Die tatsächlich experimentell ermittelten Rollgeschwindigkeiten von HL-60 Zellen über Polystyrol in Abhängigkeit von der Wandschubspannung sind in Abbildung 3.63 dargestellt. Aus den Experimenten ergab sich eine lineare Abhängigkeit der Rollgeschwindigkeit von der Wandschubspannung. Die gemessenen bzw. interpolierten Rollgeschwindigkeiten bei Wandschubspannungen von $0,15 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ bzw. $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ sind mit $124 \mu\text{m/s}$ bzw. $825 \mu\text{m/s}$ um 30% bzw. 32% niedriger als die theoretisch errechneten. Verantwortlich dafür ist möglicherweise eine Affinität der HL-60 Plasmamembranen für das Polystyrol.

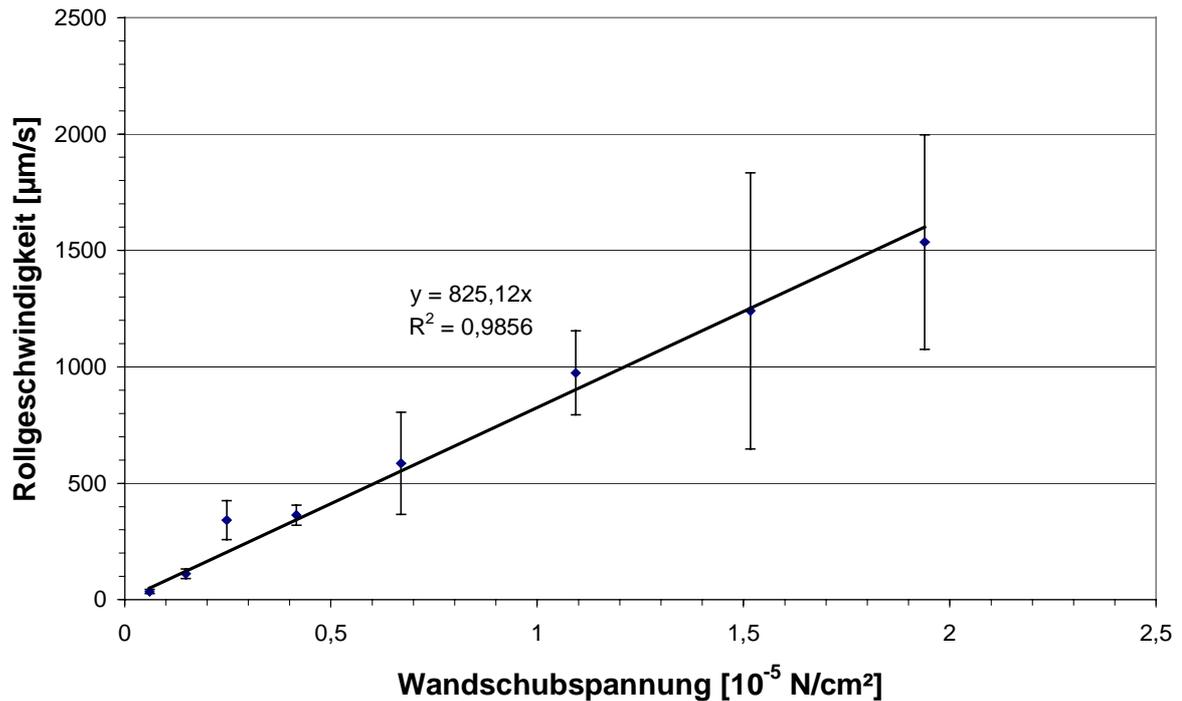


Abbildung 3.63: Tatsächliche experimentell ermittelte Rollgeschwindigkeiten von HL-60 Zellen auf Polystyrol in Abhängigkeit von der Wandschubspannung.

3.7.2 Zell-Zell-Adhäsion

Die Wechselwirkung der HL-60 Zellen mit CHO-K1 Zellen, CHO-E Zellen bzw. HUVEC wurde im dynamischen System zunächst bei hypo-physiologischer Wandschubspannung von $0,15 \cdot 10^{-5}$ N/cm 2 untersucht. Dabei wurde der Einfluß von humanen Granulocytengangliosiden auf die Rollgeschwindigkeit und die Anzahl der adhärierenden HL-60 Zellen ermittelt.

3.7.3 HL-60 Rolling bei hypo-physiologischer Wandschubspannung von $0,15 \cdot 10^{-5}$ N/cm 2

Die Rollgeschwindigkeit der HL-60 Zellen auf CHO-K1-Zellayern betrug 113 (sd 13) μ m/s und war damit um 9% geringer als auf Polystyrol (siehe Abbildung 3.64). Die unebene Oberfläche des Zellayers mit dem daraus resultierenden erhöhten Rollwiderstand ist für diese geringfügig niedrigere Geschwindigkeit verantwortlich. Im Vergleich dazu betrug die Rollgeschwindigkeit auf dem CHO-E-Layer 93 (sd 21) μ m/s und war somit um 25% geringer als auf Polystyrol. Die Wechselwirkung von murinem E-Selektin mit HL-60 Oberflächenantigenen bedingte also lediglich eine geringe mittlere Geschwindigkeitsänderung.

Allerdings wurde bei den letztendlich adhärierenden Zellen eine rapide Reduktion von der mittleren Geschwindigkeit bis auf Null innerhalb von weniger als zwei Sekunden festgestellt.

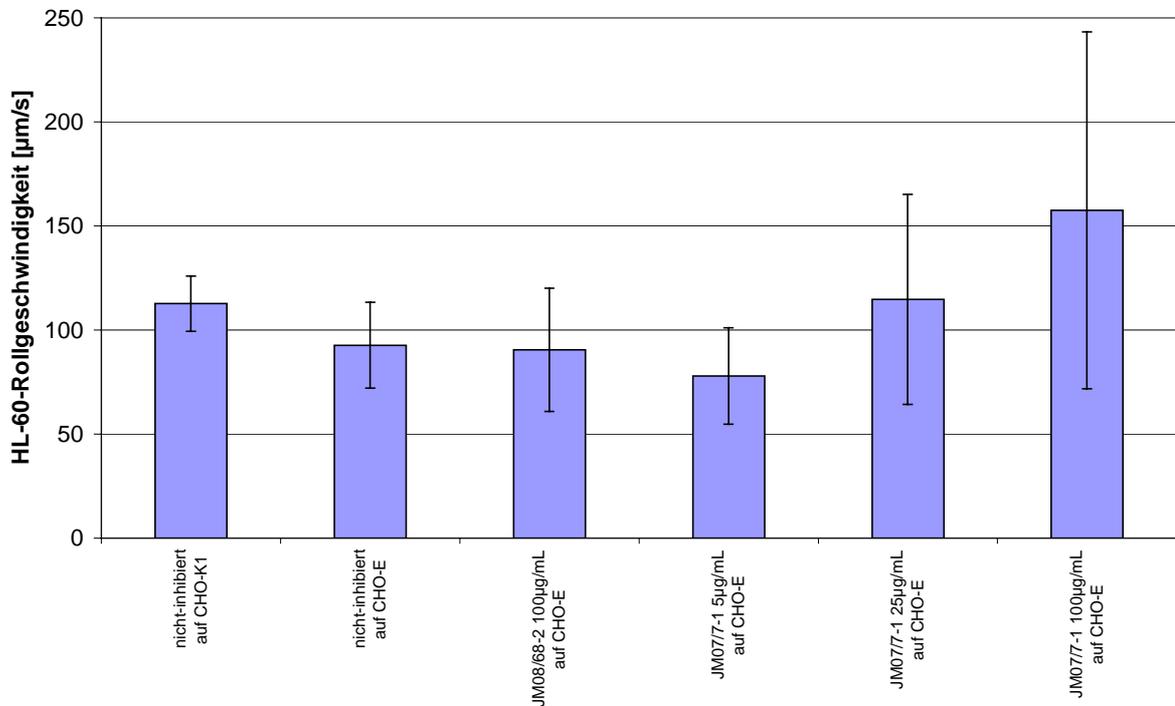


Abbildung 3.64: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf CHO-K1- und CHO-E-Zellayern. Die CHO-E-Zellayern wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Nach fünf minütiger Inkubation des CHO-E-Layers mit 100 $\mu\text{g/mL}$ der Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 betrug die mittlere Rollgeschwindigkeit 90 (sd 30) $\mu\text{m/s}$ und war im Vergleich zum nicht-Gangliosid-inkubierten Ansatz im Rahmen der Standardabweichung unverändert. Auch eine Inkubation mit 5 $\mu\text{g/mL}$ der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-1 ergab eine Rollgeschwindigkeit innerhalb dieser Standardabweichung. Sie betrug 78 (sd 23) $\mu\text{m/s}$. Erst eine Konzentration von 25 $\mu\text{g/mL}$ der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-1 führte zu einer Erhöhung der mittleren Rollgeschwindigkeit auf 115 (sd 50) $\mu\text{m/s}$. Dieser Wert entspricht etwa dem im nicht-E-Selektin-vermittelten Ansatz mit den CHO-K1-Layern erhaltenen und würde demnach bereits für die vollständige Maskierung der E-Selektin-Moleküle sprechen. Eine weitere Erhöhung der Gangliosidkonzentration auf 100 $\mu\text{g/mL}$ erbrachte eine mittlere Rollgeschwindigkeit von 157 (sd 86) $\mu\text{m/s}$. Diese Geschwindigkeit war höher als im Ansatz mit Polystyrol (124 $\mu\text{m/s}$), aber immer noch niedriger als die theoretisch errechnete von 178 $\mu\text{m/s}$. Mit zunehmender Granulocytengangliosidkonzentration wurden demnach auch die adhäsiven Wechselwirkungen zwischen dem murinen E-Selektin und den HL-60 Oberflächenantigenen schwächer, woraus die höheren Rollgeschwindigkeiten resultierten. Nach Inkubation der CHO-E-Layer mit den Granulocytengangliosidfraktionen JM07/7-3 bzw. JM07/7-4 der Konzentrationen 5, 25 und

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konnten dagegen keine signifikanten Geschwindigkeitserhöhungen detektiert werden (siehe Abbildung 3.65).

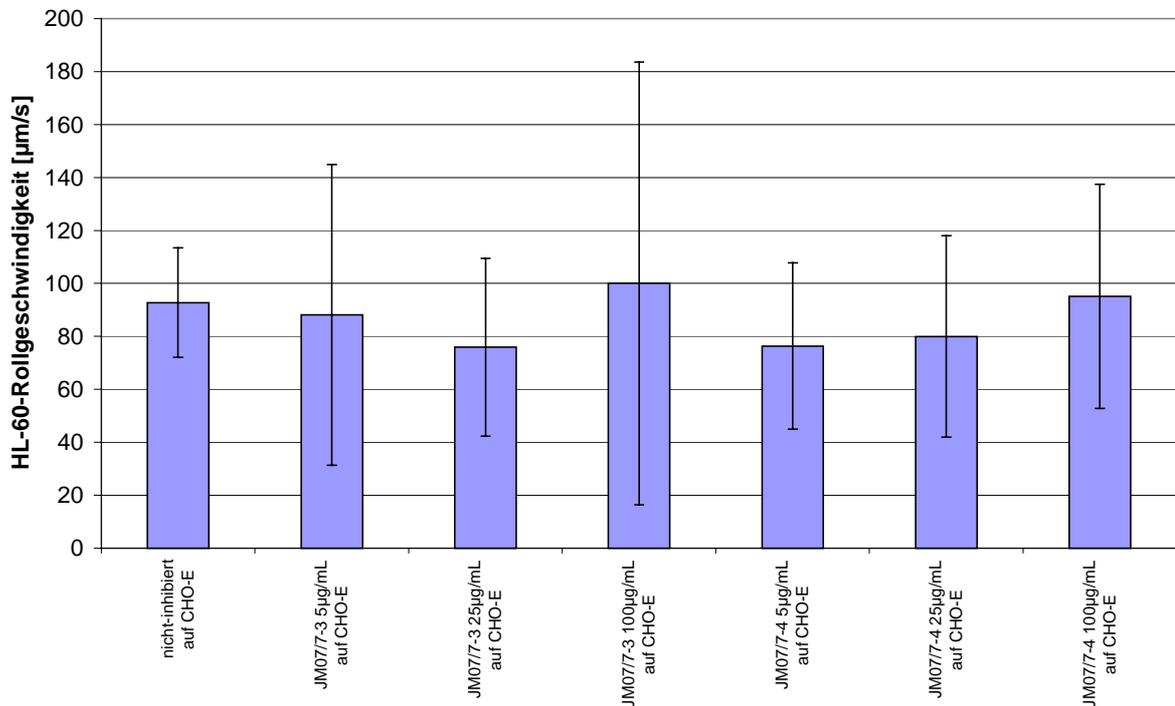


Abbildung 3.65: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf CHO-E-Zellayern. Die CHO-E-Zellayer wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Rollgeschwindigkeit der HL-60 Zellen auf IL-1 β -induzierten HUVEC war mit einem Wert von 44 (sd 10) $\mu\text{m}/\text{s}$ etwa halb so groß wie die auf CHO-E Zellen (siehe Abbildung 3.66). Das bedeutet, daß zwischen HL-60 Zellen und HUVEC im dynamischen System stärkere adhäsive Wechselwirkungen auftreten als zwischen HL-60 Zellen und CHO-E Zellen. Da in den Experimenten jeweils HL-60 Zellen aus derselben Kultur verwendet wurden kann die deutlich niedrigere Rollgeschwindigkeit nur von HUVEC-Oberflächenantigenen verursacht werden. Entweder ist die Affinität von humanem E-Selektin zu den Liganden auf der HL-60 Oberfläche stärker und/oder es treten zusätzliche Wechselwirkungen auf. Dagegen ist eine quantitative Dominanz der humanen E-Selektin-Moleküle gegenüber den murinen aus den Experimenten im statischen System auszuschließen (vgl. Abbildung 3.54).

Eine Induktion der HUVEC mit Thrombin bzw. Histamin führte zu Rollgeschwindigkeiten von 197 (sd 83) $\mu\text{m}/\text{s}$ bzw. 140 (sd 59) $\mu\text{m}/\text{s}$. Diese beiden Induktoren der P-Selektin-Expression verursachten demnach keine Geschwindigkeitsreduktion im Vergleich zu dem Ansatz auf Polystyrol. Eine P-Selektin-Expression hat also keinen Einfluß auf die mittlere Rollgeschwindigkeit der HL-60 Zellen.

Die Inkubation der IL-1 β -induzierten HUVEC mit Hirngangliosiden der Fraktion JM08/68-2 in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultierte in einer HL-60-

Rollgeschwindigkeit von 51 (sd 11) $\mu\text{m/s}$ und unterschied sich damit um 16% von dem Vergleichswert des nicht-maskierten Ansatzes. Allerdings lag dieser Wert im Bereich der Standardabweichung des Kontrollansatzes, so daß dieser Effekt nicht signifikant ist. Eine Inkubation der HUVEC-Layer mit der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-1 in Konzentrationen von 5, 25 und 100 $\mu\text{g/mL}$ führte zu Rollgeschwindigkeiten von 37 (sd 13) $\mu\text{m/s}$, 52 (sd 27) $\mu\text{m/s}$ und 96 (sd 49) $\mu\text{m/s}$. Mit Anwendung der höchsten Konzentration wurde die mittlere Rollgeschwindigkeit im Vergleich zum nicht-maskierten Ansatz mehr als verdoppelt. Jedoch konnte nicht die Rollgeschwindigkeit des Ansatzes mit Polystyrol erreicht werden, was bedeutet, daß nicht alle Wechselwirkungen zwischen HUVEC-Oberflächenantigenen und HL-60-Oberflächenantigenen blockiert wurden. Unter Annahme der vollständigen Maskierung der E-Selektin-Moleküle wie im Ansatz mit CHO-E Zellen (vgl. Abbildung 3.64) läßt dies auf eine weitere E-Selektin-unabhängige Wechselwirkung zwischen HL-60 Zellen und HUVEC schließen.

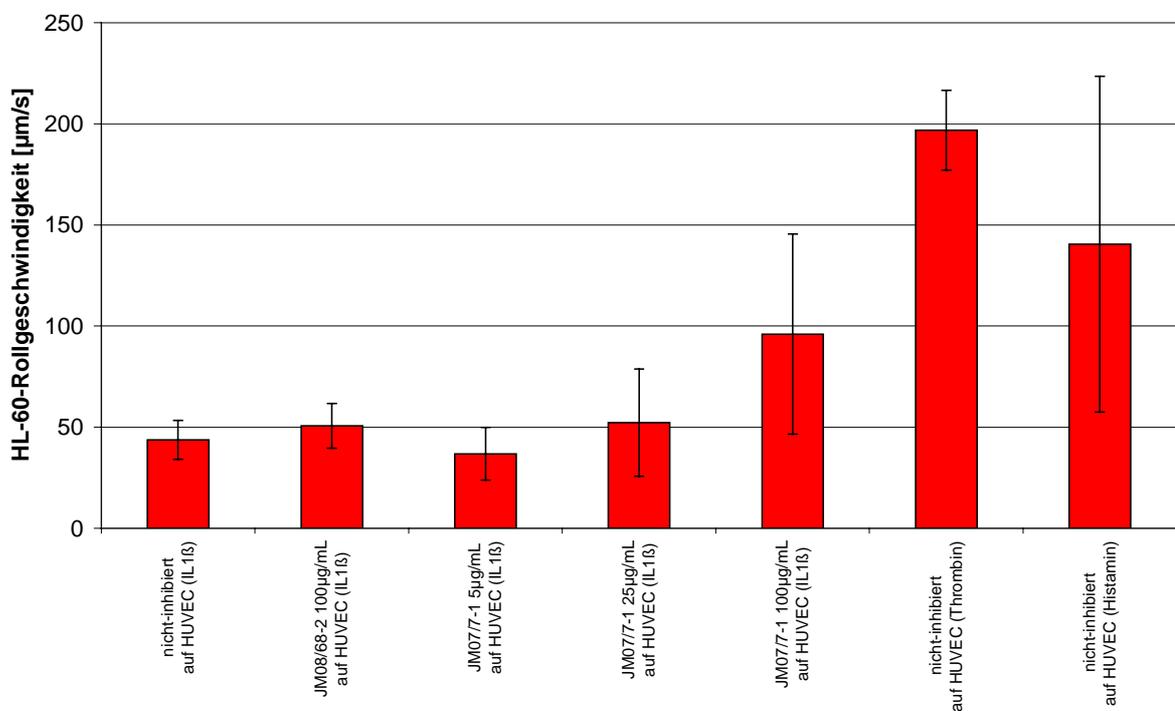


Abbildung 3.66: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf IL-1 β -, Thrombin-, und Histamin-induzierten HUVEC-Layern. Die HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Im Gegensatz zum Ansatz mit CHO-E Zellen führte eine Inkubation von HUVEC mit den Granulocytengangliosidfraktionen JM07/7-3 sowie JM07/7-4 zumindest mit Anwendung der höchsten Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ zu einer deutlichen Rollgeschwindigkeitserhöhung der HL-60 Zellen (siehe Abbildung 3.67). Dabei wurden nach Inkubation mit der Fraktion JM07/7-3 in Konzentrationen von 5, 25 und 100 $\mu\text{g/mL}$ mittlere Rollgeschwindigkeiten von 42 (sd 20) $\mu\text{m/s}$, 70 (sd 24) $\mu\text{m/s}$ und 72 (sd 23) $\mu\text{m/s}$ gemessen. Die An-

wendung der Fraktion JM07/7-4 in Konzentrationen von 5, 25 und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ führte zu Rollgeschwindigkeiten von 48 (sd 26) $\mu\text{m}/\text{s}$, 52 (sd 20) $\mu\text{m}/\text{s}$ und 83 (sd 36) $\mu\text{m}/\text{s}$.

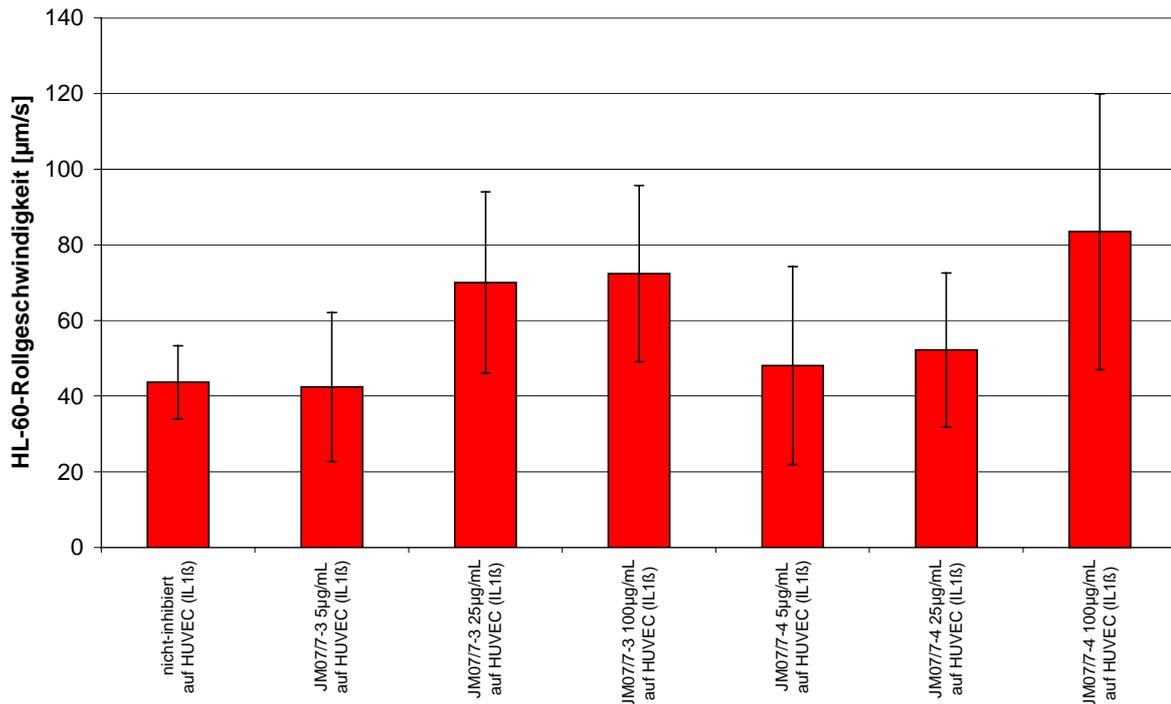


Abbildung 3.67: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf IL-1 β -induzierten HUVEC-Layern. Die HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Wie bereits im Ansatz mit der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-1 beobachtet, wurde auch mit den Fraktionen JM07/7-3 und JM07/7-4 keine vollständige Blockierung der Wechselwirkungen zwischen HL-60 Zellen und humanen Endothelzellen erreicht. Verantwortlich für die im hypo-physiologischen Wandschubbereich auftretende verbleibende Geschwindigkeitsreduktion im Vergleich zum Ansatz mit Polystyrol könnten Integrinwechselwirkungen mit Adhäsinen der Endothelzellen sein.

Die Ermittlung der Rollgeschwindigkeiten ergab im hypo-physiologischen Wandschubbereich von $0,15 \cdot 10^{-5} \text{ N}/\text{cm}^2$ erste Hinweise auf die Wechselwirkung zwischen HL-60 Zellen und E-Selektin-exprimierenden Zellen. Demnach führen Granulocytengangliosidkonzentrationen von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu meßbaren Rollgeschwindigkeitserhöhungen. Von größerer Bedeutung ist allerdings die Anzahl der statisch adhätierenden HL-60 Zellen in diesem dynamischen System. Statisch adhätierende Granulocyten wandern *in vivo* mittels Diapedese ins entzündete Gewebe ein und wirken Erregern durch Phagozytose entgegen. Der Transmigrationsprozeß bedingt zuvor eine statische Adhäsion. Das dynamische *in vitro*-Modell simuliert die *in vivo*-Strömungsverhältnisse und sollte somit über die Anzahl der statisch adhätierenden HL-60 Zellen eine transponierbare Aussage über die funktionelle Bedeutung von Granulocytengangliosiden für die Adhäsion von Granulocyten *in vivo* geben. Dazu wurden zunächst Experimente mit CHO-E-Layern durchgeführt, um zu prü-

fen, ob die alleinige Wechselwirkung von E-Selektin mit HL-60-Oberflächenliganden ausreichend für die Ausbildung von statischen Adhäsionen ist. Zur Annäherung an die *in vivo*-Verhältnisse wurden anschließend humane Endothelzelllayer verwendet und die Anzahl adhätierender HL-60 Zellen auf IL-1 β -, Thrombin- bzw. Histamin-induzierten HUVEC-Layern bestimmt.

Innerhalb der 10minütigen Experimente adhätierten auf Polystyrol 5 (sd 12) und auf CHO-K1-Zellayern 52 (sd 12) HL-60 Zellen/mm² (siehe Abbildung 3.68). Im Vergleich zu diesen E-Selektin-unspezifischen Wechselwirkungen adhätierten auf CHO-E-Layern 932 (sd 36) HL-60 Zellen/mm². Dieser Wert entspricht etwa einem Fünftel der im statischen Adhäsionssystem erhaltenen Anzahl an adhätierten HL-60 Zellen (vgl. Abbildung 3.31), so daß ca. 11% der dargebotenen Oberfläche bedeckt wurde. Die Wechselwirkung von murinem E-Selektin mit Liganden auf der HL-60 Oberfläche reicht demnach nicht nur für eine Reduktion der mittleren Rollgeschwindigkeit, sondern auch für die Ausbildung von statischen Adhäsionen aus.

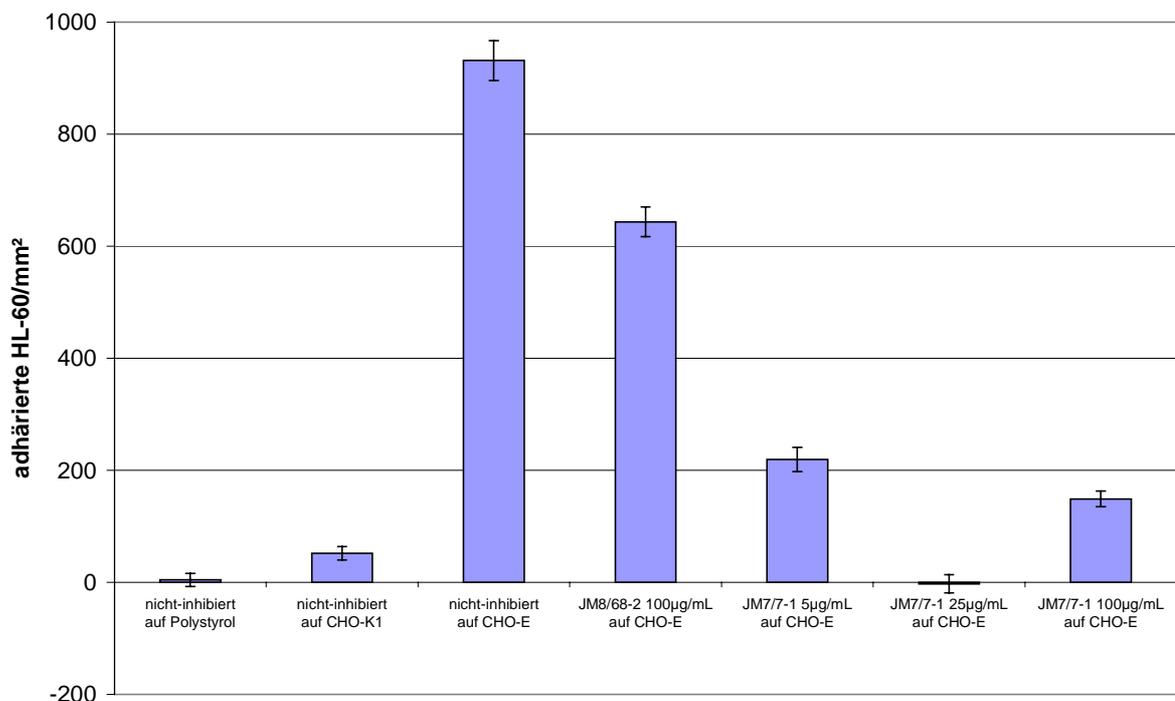


Abbildung 3.68: Differenz der Anzahl adhätierender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von Polystyrol, CHO-K1-Layern bzw. CHO-E-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die CHO-E-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 µg/mL der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Obwohl die mittlere Rollgeschwindigkeit durch Inkubation der CHO-E Zellen mit 100 µg/mL der Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 im Rahmen der Standardabweichung unverändert blieb (vgl. Abbildung 3.64), wurde die Anzahl der adhätierten HL-60 Zellen um 30,9% auf 644 (sd 26) vermindert. Im Vergleich zum statischen Adhäsionssystem (vgl. Abbildung 3.55) wurde im dynamischen System damit ein adhäsionsinhibitorischer Effekt

beobachtet. Verantwortlich dafür könnte entweder ein bereits im HPTLC-Overlay detektiertes, nicht-CSLEX-Epitop-tragendes Gangliosid sein, das eine Affinität zu E-Selektin hat (vgl. Abbildung 3.23), oder eine unspezifische Überdeckung der E-Selektin Moleküle durch Hirnganglioside, die nicht vollständig von den CHO-E Zellen abgewaschen wurden. Deutlich stärkere Adhäsions-inhibitorische Effekte wurden nach Inkubation der CHO-E Zellen mit der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-1 bereits bei 20fach niedrigerer Konzentration beobachtet. So führte eine Inkubation mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu einer Anzahl von 219 (sd 22), -3 (sd 16), bzw. 149 (sd 14) HL-60 Zellen/ mm^2 . Damit wurde bereits bei einer Gangliosidkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine 76,5%ige Reduktion der statisch adhätierenden HL-60 Zellen erzielt. Im statischen Adhäsionssystem hatte diese Fraktion ohne Zugabe von Trägermolekülen im Rahmen der Standardabweichung keinen Effekt (vgl. Abbildung 3.55). Auch die Insertion in Liposomen erbrachte erst bei Anwendung einer Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ einen inhibitorischen Effekt der Zell-Zell-Adhäsion von 23,3% (vgl. Abbildung 3.57). Die Steigerung der Gangliosidkonzentration auf 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ erzielte im dynamischen System sogar einen negativen Wert statisch adhätierender HL-60 Zellen. Dieser war bedingt durch die Differenzbildung aus den gemessenen HL-60-Anzahlen nach 10 und 0 Minuten. Da vor Beginn der Messung die Strömungsverhältnisse eingestellt werden mußten, adhätierten bereits zum Startzeitpunkt Null der Messung einige HL-60 Zellen auf dem CHO-E-Layer. Negative Werte spiegeln daher ein Abspülen von bereits vorher adhätierten Zellen wider. Bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der Fraktion JM07/7-1 wurde nicht nur die E-Selektin-Wechselwirkung mit HL-60 Oberflächenliganden inhibiert, sondern auch E-Selektin-unspezifische Wechselwirkungen, da weniger HL-60 Zellen statisch adhätierten als auf CHO-K1-Layern. Die weitere Steigerung auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ergab allerdings lediglich eine Abnahme der statisch adhätierten Zellen im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz von 84,0%. Aufgrund des amphipathischen Charakters der Ganglioside und der damit verbundenen Ausbildung von Micellen im wässrigen Milieu bedeutet eine Konzentrationssteigerung nicht eine proportionale Effizienzsteigerung der Zell-Zell-adhäsionsinhibitorischen Wirkung. Vielmehr könnte sogar durch Ausbildung von Micellen mit ihrer annähernden Kugeloberfläche den E-Selektin-Molekülen potentiell ein Teil der Liganden entzogen werden. Diese Liganden wären in Micellen gebunden deren Anzahl geringer ist als die der Einzelmoleküle, wodurch die geringere Effizienz der Bindungsinhibition erklärbar ist.

Nach Inkubation der CHO-E-Layer mit der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-3 mit Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurden im Anschluß an ein Überströmen mit HL-60 Zellen 179 (sd 13), 102 (sd 18) bzw. 81 (sd 16) statisch adhätierende HL-60 Zellen/ mm^2 gezählt (siehe Abbildung 3.69). Damit betragen die Inhibitionen der Adhäsion im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz 80,8%, 89,0% bzw. 91,3%. Im Vergleich zum statischen System bei dem maximale Inhibitionen der Zell-Zell-Adhäsion von 18,9% bei Konzentrationen von 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mit Anwendung der Fraktion JM07/7-3 auftraten (vgl. Abbildung 3.55), konnte im dynamischen System bereits bei 40fach niedrigerer Granulocytengangliosidkonzentration ein viermal stärkerer Effekt gemessen werden.

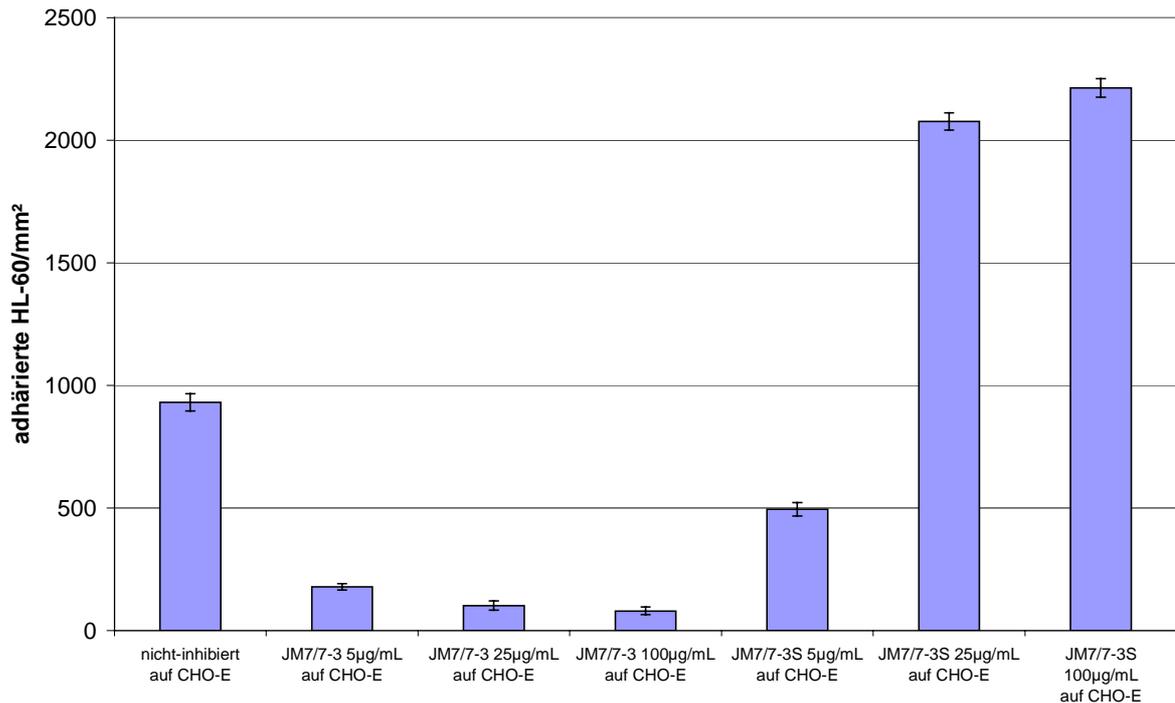


Abbildung 3.69: Differenz der Anzahl adhärerender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von CHO-E-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die CHO-E-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-3S verursachte in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ eine Reduktion der Anzahl statisch adhärerter HL-60 Zellen auf 495 (sd 27) Zellen/ mm^2 . Das entspricht einer Adhäsionsinhibition von 46,9%. Damit hatte diese Fraktion bei Inkubation mit der geringsten Konzentration nur eine etwa halb so große Effektivität wie die Fraktion JM07/7-3. Eine Steigerung der Konzentration auf 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ führte zu 2077 (sd 35) bzw. 2214 (sd 38) statisch adhärerter HL-60 Zellen/ mm^2 . Im Vergleich zur nicht-inhibierten Kontrolle bedeutet dies eine Steigerung der Anzahl um 122,9% bzw. 137,6%. Die langkettigen Kohlenhydratstrukturen der Ganglioside aus den Bandenregionen 15 und 16 (siehe Abbildung 3.23), die in der Fraktion JM07/7-3S vorhanden waren schienen ab einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/mL}$ Micellen auszubilden die eine Affinität sowohl zu E-Selektin, als auch zu Oberflächenstrukturen auf den HL-60 Zellen hatten und damit adhäsionsfördernd wirkten. Dabei könnte L-Selektin die Gangliosid-bindende Struktur auf den HL-60 Zellen sein. *In vivo* wird u.a. das Verlangsamen von Granulocyten auf bereits adhärerter Granulocyten- ein Vorgang der als „sekundäres Anbinden“ (engl.: secondary tethering) bezeichnet wird - durch L-Selektin vermittelt (Vestweber and Blanks, 1999). Die Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-4S konnte dagegen selbst bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ keine Zunahme der statisch adhärerter HL-60 Zellen im Vergleich zur nicht-inhibierten Kontrolle verursachen (siehe Abbildung 3.70). In diesem Ansatz wurden bei Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ HL-60 Zellzahlen von 613 (sd 24), 279 (sd 22) bzw. 532 (sd 23) pro mm^2 ermittelt. Dies

entspricht einer Reduktion der Anzahl statisch adhärrierter HL-60 Zellen von 34,2%, 70,1% bzw. 42,9%. Obwohl auch diese Fraktion JM07/7-3S-identische Ganglioside mit langkettigen Kohlenhydratstrukturen der Bandenregionen 15 und 16 besitzt (vgl. Abbildung 3.23) schien die Anordnung in den Micellen andersartig gewesen zu sein, so daß keine adhäsionsfördernde Wirkung eintrat.

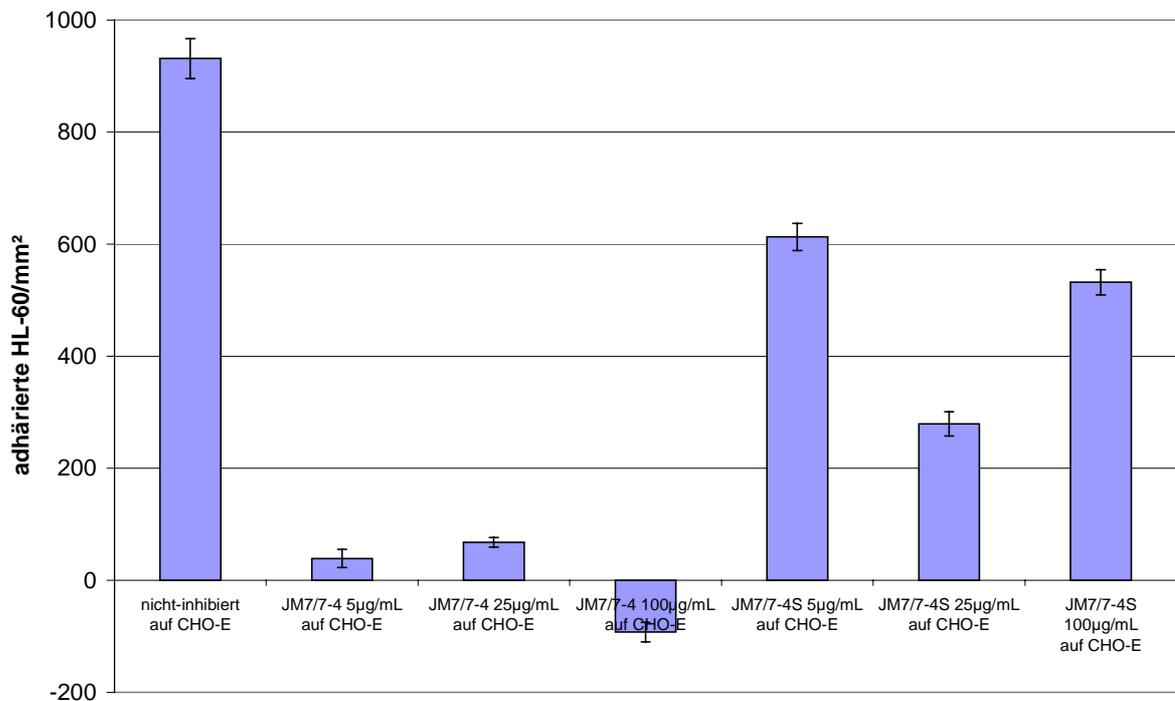


Abbildung 3.70: Differenz der Anzahl adhärrierender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von CHO-E-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die CHO-E-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Granulocytgangliosidfraktion JM07/7-4 erzielte nach Inkubation der CHO-E-Layer mit Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ eine Zell-Zell-adhäsionsinhibitorische Wirkung von 95,8%, 92,7% bzw. mehr als 100%. Dabei wurden HL-60 Zahlen statisch adhärrierender Zellen von 39 (sd 16), 68 (sd 8) bzw. -93 (sd 18) pro mm^2 ermittelt. Damit wurde mit dieser Fraktion die größte inhibitorische Wirkung der Zelladhäsion von HL-60 Zellen auf CHO-E Zellen im hypo-physiologischen Wandschubspannungsbereich erzielt.

Der Adhäsions-fördernde Effekt der Fraktion JM07/7-3S könnte auch ein E-Selektin-unabhängiger Effekt sein, falls die Ganglioside mit ihrem Ceramidanteil in die Plasmamembran der CHO-E Zellen inseriert wären und die Zellen damit den Kohlenhydratbereich der Ganglioside dem L-Selektin der HL-60 Zellen präsentiert hätten. Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden CHO-K1-Zellayer für fünf Minuten mit Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der Fraktionen JM07/7-3S bzw. JM07/7-4S inkubiert und anschlie-

hend mit HL-60 Zellen überströmt. Die Ergebnisse der HL-60 Zellzählung sind in Abbildung 3.71 dargestellt.

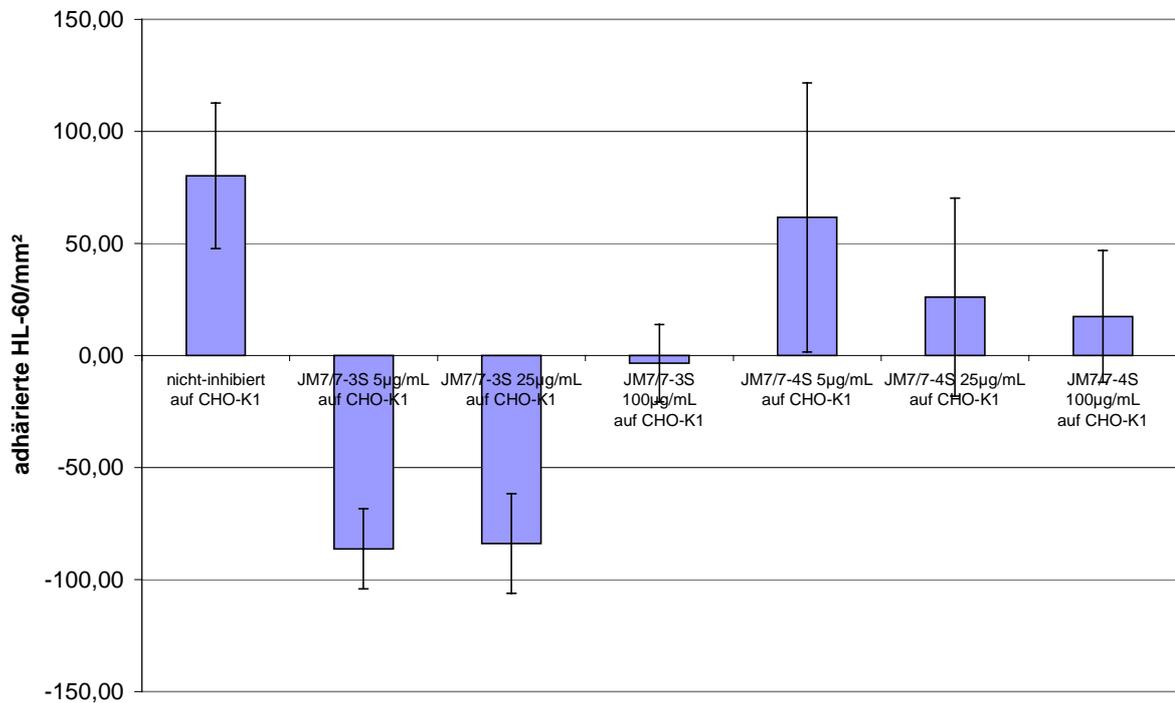


Abbildung 3.71: Differenz der Anzahl adhärerender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von CHO-K1-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die CHO-K1-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 µg/mL der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Auf dem nicht-inhibierten CHO-K1-Layer adhärten 80 (sd 33) HL-60 Zellen/mm² statisch. Die Fraktion JM07/7-3S verursachte keine adhäsionsfördernde Wirkung. Im Gegenteil, es wurden HL-60 Zahlen von -86 (sd 18), -84 (sd 22) bzw. -3 (sd 17) pro mm² nach Anwendung der Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 µg/mL ermittelt. Auch die Fraktion JM07/7-4S konnte keine begünstigende Wirkung hervorrufen. In diesem Ansatz wurden HL-60 Anzahlen von 62 (sd 60), 26 (sd 44) bzw. 17 (sd 29) pro mm² nach Inkubation mit Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 µg/mL gemessen.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Ganglioside der S-Fractionen nicht oder nur in einem unzureichenden Maße in die Plasmamembranen inserierten. Demnach muß der in Abbildung 3.69 dargestellte adhäsionsfördernde Effekt E-Selektin-vermittelt sein.

Im Folgenden wurde die Adhäsion von HL-60 Zellen auf HUVEC-Layern im dynamischen System bei hypo-physiologischer Wandschubspannung untersucht. Zur E-Selektin-Expression wurden die Endothelzellen für vier Stunden mit IL-1β induziert. Auf nicht-IL-1β-induzierten HUVEC-Layern adhärten innerhalb von zehn Minuten -19 HL-60 Zel-

len/mm² (siehe Abbildung 3.72). Ohne Induktion existierte demnach keine Affinität zwischen den HUVEC-Layern und den HL-60 Zellen. Nach erfolgter Induktion der E-Selektin-Expression adhärten innerhalb von zehn Minuten 386 (sd 14) HL-60 Zellen statisch an die Endothelzellen. Bei gleichen Versuchsbedingungen binden also 58,6% weniger HL-60 Zellen an HUVEC-Layer als an CHO-E-Layer, obwohl die mittlere Rollgeschwindigkeit auf den Endothelzell Layern weniger als die Hälfte der Vergleichsgeschwindigkeit auf CHO-E-Layern beträgt. Ein möglicher Grund könnte die quantitativ deutlich stärkere E-Selektin-Expression der CHO-E Zellen sein (vgl. Abbildung 3.54), die auch ohne Integrin/Adhäsion-Wechselwirkung zu statischen Adhäsionen führte. Dagegen scheinen bei der HL-60/HUVEC-Interaktion noch E-Selektin-differente Wechselwirkungen aufzutreten, die für die Rollgeschwindigkeitsreduktion verantwortlich sind, oder die Affinität des humanen E-Selektins zu den Liganden auf den HL-60 Zellen ist größer als die des murinen Pendants.

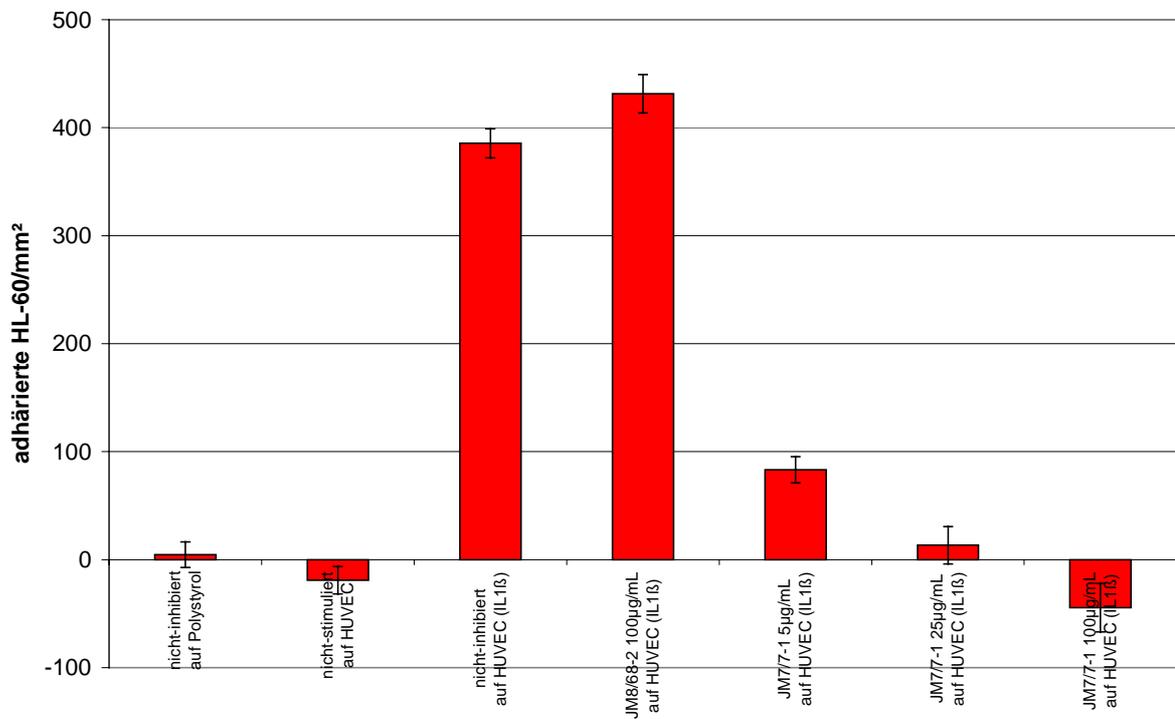


Abbildung 3.72: Differenz der Anzahl adhärerender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von Polystyrol und HUVEC-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die IL-1 β -induzierten HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 μ g/mL der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Eine Inkubation der HUVEC-Layer mit humanen Hirngangliosiden der Fraktion JM08/68-2 in einer Konzentration von 100 μ g/mL hatte im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz keinen Adhäsions-verhindernden Effekt, da innerhalb von zehn Minuten 431 (sd 18) HL-60 Zellen/mm² statisch gebunden wurden. Granulocytenganglioside der Fraktion JM07/7-1 verminderten die Anzahl der statisch adhärerenden HL-60 Zellen in einer Konzentrations-abhängigen Weise. Mit ansteigender Konzentration nahm diese

Anzahl ab. So führten Inkubationen mit Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 µg/mL zu 83 (sd 12), 14 (sd 17) bzw. -44 (sd 22) gebundenen HL-60 Zellen/mm². Im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz entspricht das Inhibitionen der Zell-Zell-Adhäsion von 78,5%, 96,4% bzw. mehr als 100%. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem statischen System bei dem mit Inkubation der Fraktion JM07/7-1 bis zu einer Konzentration von 200 µg/mL keine Inhibition der Zell-Zell-Adhäsion festgestellt wurde (vgl. Abbildung 3.56), reichte im dynamischen System bereits eine Konzentration von 5 µg/mL aus um die Adhäsionseffizienz um mehr als zwei Drittel zu verringern. Dabei war die mittlere Rollgeschwindigkeit mit einem Wert von 37 (sd 13) µm/s im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz bei dem die HL-60 Zellen eine mittlere Rollgeschwindigkeit von 44 (sd 10) aufwiesen nicht gesteigert (vgl. Abbildung 3.66). Der gleiche Effekt wurde bereits bei Verwendung von CHO-E-Layern beobachtet. Auch in jenem Fall wurde bei Inkubation mit Gangliosiden der Fraktion JM07/7-1 in einer Konzentration von 5 µg/mL die mittlere Rollgeschwindigkeit nicht gesteigert (vgl. Abbildung 3.64), aber die Anzahl statisch adhärrierender HL-60 Zellen um 76,5% reduziert. Das bedeutet, daß die mittlere Rollgeschwindigkeit kein Indikator für die Effizienz der Zell-Zell-Adhäsionsinhibition ist. Durch die Inkubation mit E-Selektin-bindenden Gangliosiden werden die E-Selektin-Moleküle maskiert. Da aber die mittlere Rollgeschwindigkeit nach Inkubation der E-Selektin-exprimierenden Layer mit Gangliosidkonzentrationen von 5 µg/mL der Fraktion JM07/7-1 nicht zunahm wird die mittlere Rollgeschwindigkeit maßgeblich nicht von der E-Selektin-Wechselwirkung mit HL-60 Liganden bestimmt. Dies wurde bereits durch die lediglich um 17,7% verminderte Rollgeschwindigkeit der HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern im Vergleich zu CHO-K1-Layern deutlich (vgl. Abbildung 3.64). Im Gegensatz dazu wird aber die Aktivierung und das rapide Verlangsamten bis zur statischen Adhäsion von E-Selektin-Interaktionen mit HL-60 Liganden verursacht, denn die Anzahl statisch adhärrierender HL-60 Zellen verminderte sich nach Inkubation der CHO-E- bzw. HUVEC-Layer um 76,5% bzw. 78,5%.

Mit den gleichen Versuchsbedingungen wurde die Wirkung der Fraktionen JM07/7-3 und JM07/7-3S untersucht. Die Ergebnisse der Experimente im dynamischen System sind in Abbildung 3.73 dargestellt. Daraus ergaben sich nach Inkubation der HUVEC-Layer mit Granulocytengangliosiden der Fraktion JM07/7-3 in Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 µg/mL 239 (sd 15), 392 (sd 16) bzw. 197 (sd 15) gebundene HL-60 Zellen pro mm². Das entspricht einer Reduktion der statisch adhärrierenden HL-60 Zellen von 38,1% bei Anwendung der geringsten Konzentration, einer Zunahme von 1,6% bei Inkubation von 25 µg/mL bzw. einer Reduktion von 49,0% bei Verwendung der höchsten Konzentration. Im statischen System wurden durch diese Fraktion mit Werten bis zu 72,5% die größten inhibitorischen Auswirkungen auf die Zell-Zell-Adhäsion gemessen (vgl. Abbildung 3.56). Im dynamischen System ist diese Wirkung relativ zu den übrigen Fraktionen geringer. Die Fraktion JM07/7-3S steigerte bei einer Konzentration von 5 µg/mL die Zell-Zell-Adhäsion, so daß 79,5% mehr HL-60 Zellen gebunden wurden als im nicht-inhibierten Kontroll-Ansatz. Diese Wirkung wurde tendenziell bereits bei CHO-E Zellen beobachtet (vgl. Abbildung 3.69). Mit einer Steigerung der Gangliosidkonzentration auf 25 µg/mL

wurde dieser Effekt allerdings im Gegensatz zum human/murinen System egalisiert und eine Steigerung der Konzentration auf 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduzierte die Anzahl adhärrierender HL-60 Zellen um 87,8%.

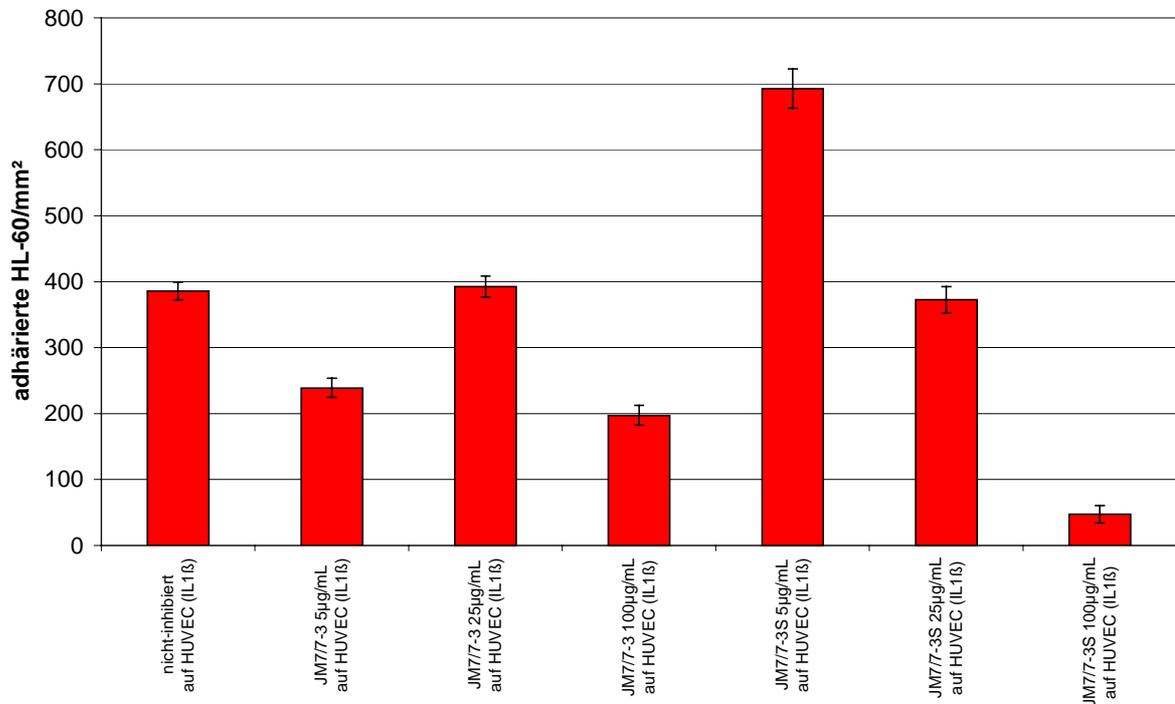


Abbildung 3.73: Differenz der Anzahl adhärrierender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von HUVEC-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ mL . Die IL-1 β -induzierten HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Granulocytganglioside der Fraktion JM07/7-4 verursachten bei Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz Reduktionen der statisch adhärrierenden HL-60 Zellen von 71,0%, 93,8% bzw. 99,5% (siehe Abbildung 3.74). Dabei wurden innerhalb von zehn Minuten 112 (sd 18), 24 (sd 6) bzw. 2 (sd 14) HL-60 Zellen/ mm^2 fest gebunden. Die Inhibitionseffizienz nahm dabei mit steigender Konzentration zu.

Nach Zugabe der Fraktion JM07/7-4S wurde auf den HUVEC-Layern keine Steigerung der Anzahl statisch adhärrierender HL-60 Zellen gemessen, obwohl sie ebenfalls die Ganglioside der Bandenregionen 15 und 16 (vgl. Abbildung 3.23) mit langkettigen Kohlenhydratstrukturen innehatte.

Die humanen Granulocytganglioside hatten unter dynamischen Bedingungen bei einer hypo-physiologischer Wandschubspannung von $0,15 \cdot 10^{-5}$ N/cm^2 sowohl im human/murinen als auch im human/humanen System einen Zell-Zell-Adhäsionsvermindernden Effekt. Die Ganglioside inhibierten die E-Selektin-Wechselwirkung mit HL-60-Liganden kompetitiv. Dabei war die Effizienz der Inhibition aufgrund des amphi-

pathischen Charakters der Ganglioside und der damit verbundenen Eigenschaft im wässrigen Milieu ab einer kritischen Konzentration Micellen auszubilden, nicht zwingend proportional zur eingesetzten Konzentration der Ganglioside. Die Fraktionen JM07/7-3S und JM07/7-4S wiesen bezüglich der Zell-Zell-Adhäsions-inhibitorischen Wirkung Besonderheiten auf. Die Fraktion JM07/7-4S hatte bei jeweils gleicher Konzentration im Vergleich zur Fraktion JM07/7-4 nur etwa die Hälfte der Wirkung. Die Fraktion JM07/7-3S förderte sogar die Adhäsion der HL-60 Zellen auf E-Selektin-exprimierenden Zellen.

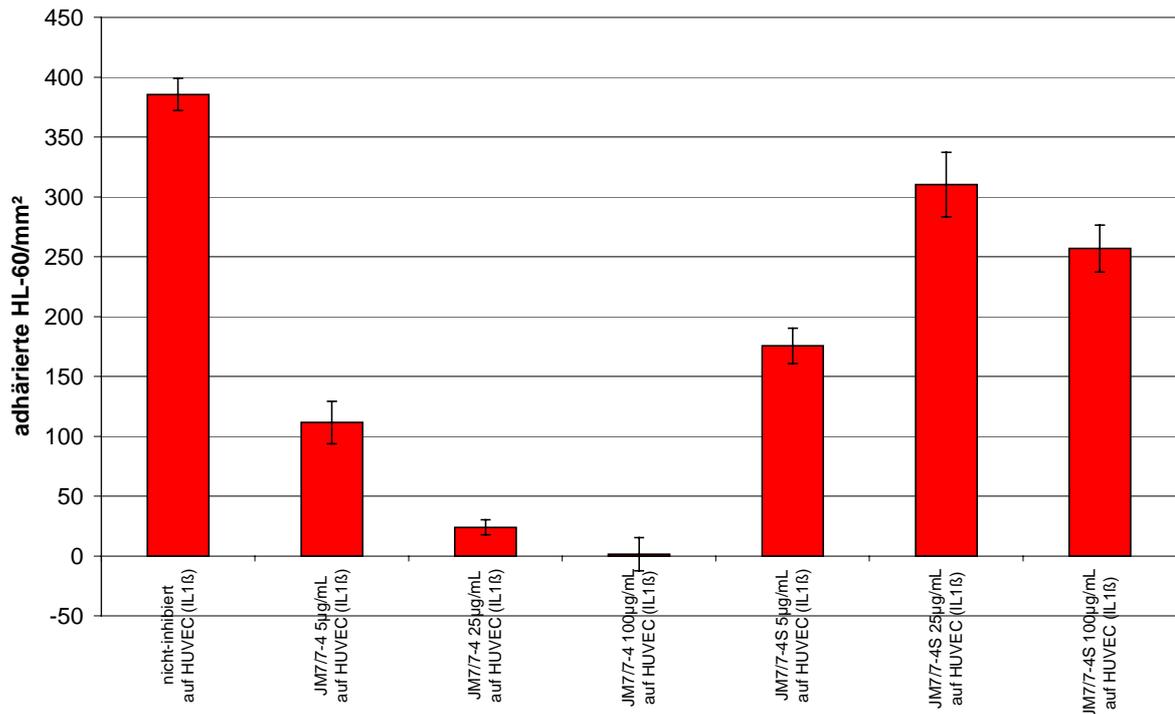


Abbildung 3.74: Differenz der Anzahl adhärerender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von HUVEC-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die IL-1 β -induzierten HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Der Einfluß einer P-Selektin-Expression auf die Adhäsion von HL-60 Zellen im dynamischen System wurde durch Induktion der HUVEC mit Thrombin bzw. Histamin und anschließendem Überströmen der Layer mit HL-60 Zellen ermittelt (siehe Abbildung 3.75). Auf nicht-induzierten HUVEC wurden 19 (sd 12) HL-60 innerhalb von zehn Minuten abgespült. Die HL-60 Adhäsion auf HUVEC bedurfte also der Mitwirkung von Selektinen. Nach Induktion der E-Selektin-Expression durch vierstündige Inkubation mit IL-1 β adhärten 386 (sd 14) HL-60 Zellen pro mm^2 statisch auf dem Layer. Im Vergleich dazu hatte die P-Selektin-Expression keinen Einfluß auf die Zell-Zell-Adhäsion da nach jeweils zehnminütiger Induktion der HUVEC mit Thrombin bzw. Histamin 38 (sd 13) bzw. 37 (sd 14) HL-60/ mm^2 abgespült wurden. Damit wurde das bereits im statischen System nachgewiesene Unvermögen des verwendeten HL-60 Klon an murines P-Selektin zu binden (vgl. Abbildung 3.33) auch im dynamischen System mit humanem P-Selektin gezeigt.

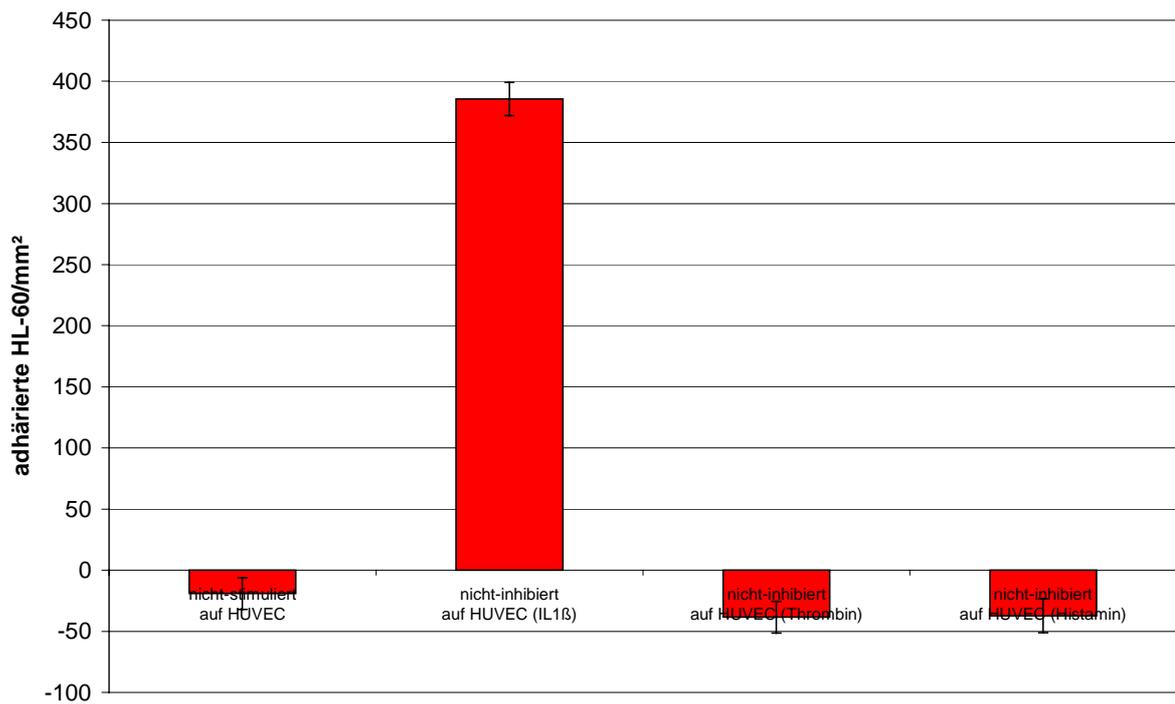


Abbildung 3.75: Differenz der Anzahl adhärerender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von HUVEC-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen entweder nicht induziert (Kontrollansatz), für vier Stunden mit IL-1 β zur E-Selektin-Expression induziert oder für zehn Minuten mit Thrombin bzw. Histamin zur P-Selektin-Expression induziert.

3.7.4 HL-60 Rolling bei physiologischer Wandschubspannung von $1,0 \cdot 10^{-5}$ N/cm²

Die im folgenden dargestellten Experimente sollten klären, ob humane Granulocytenganglioside auch bei der physiologischen Wandschubspannung von $1,0 \cdot 10^{-5}$ N/cm² die statische Adhäsion von HL-60 Zellen an E-Selektin-exprimierende Zellen beeinflussen können. Es wurden dafür CHO-E- sowie HUVEC-Layer mit den gleichen humanen Hirn- und Granulocytengangliosidfraktionen und -konzentrationen inkubiert - ebenso wie in den in Kapitel 3.7.3 gezeigten Ansätzen die einer hypo-physiologischen Wandschubspannung ausgesetzt wurden. Zunächst wurden die HL-60-Rollgeschwindigkeiten auf den Layern ermittelt und danach die innerhalb von zehn Minuten statisch adhärerenden HL-60 Zellen pro mm² Layeroberfläche bestimmt.

Die mittlere HL-60-Rollgeschwindigkeit auf CHO-K1-Layern betrug 530 (sd 80) μ m/s (siehe Abbildung 3.76). Im Vergleich zur theoretisch berechneten Geschwindigkeit von 1216 μ m entspricht das einer Reduzierung um 56,4% (vgl. Abbildung 3.61) und im Ver-

gleich zur Rollgeschwindigkeit auf Polystyrol einer Reduzierung um 35,8% (vgl. Abbildung 3.63). Auf CHO-E-Layern betrug sie 559 (sd 118) $\mu\text{m/s}$ und war um 5,5% größer als die Geschwindigkeit auf CHO-K1-Layern. Demnach war die mittlere Rollgeschwindigkeit bei der Wandschubspannung von $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ nicht von der E-Selektin-Expression abhängig. Auch die Inkubation der CHO-E-Layer mit Hirn- oder Granulocytengangliosiden konnte keine signifikanten Rollgeschwindigkeitssteigerungen herbeiführen (siehe Abbildung 3.76, Abbildung 3.77 und Abbildung 3.78).

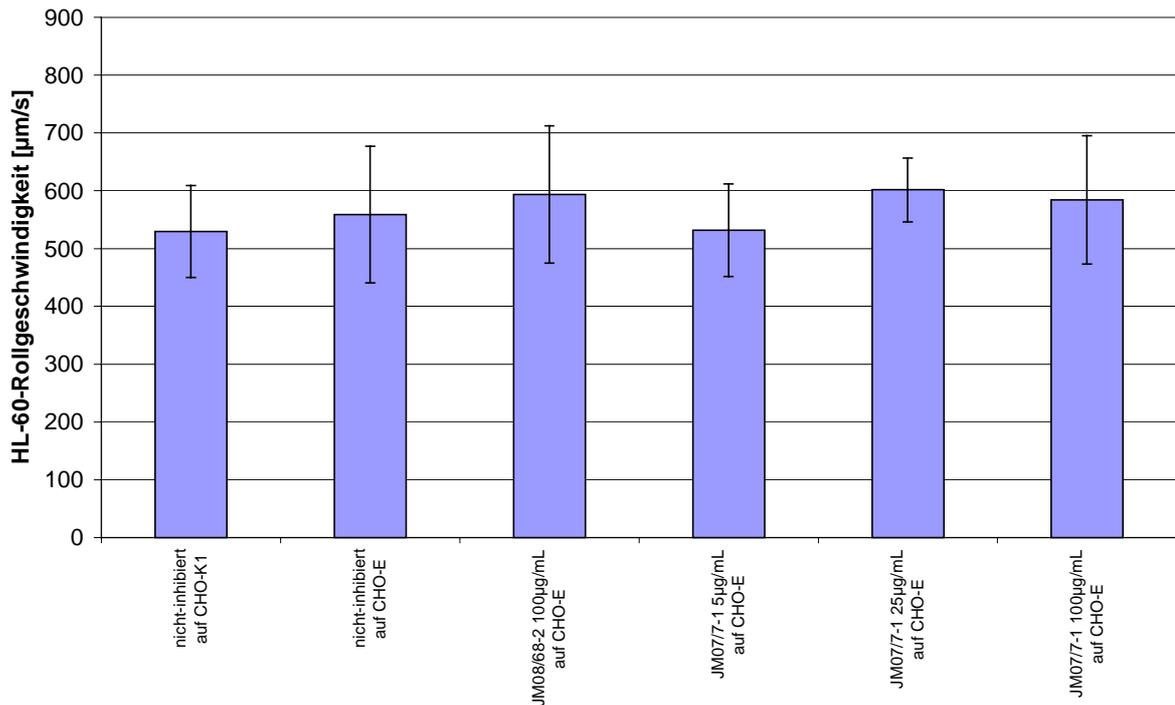


Abbildung 3.76: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf CHO-K1- und CHO-E-Zellayern. Die CHO-E-Zellayern wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Einzig die Fraktion JM07/7-4S reduzierte bei Inkubation mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ möglicherweise durch L-Selektin-Wechselwirkungen mit an E-Selektin-gebundene Micellen die mittlere Rollgeschwindigkeit um 42,9% auf 319 (sd 156) $\mu\text{m/s}$ (siehe Abbildung 3.78).

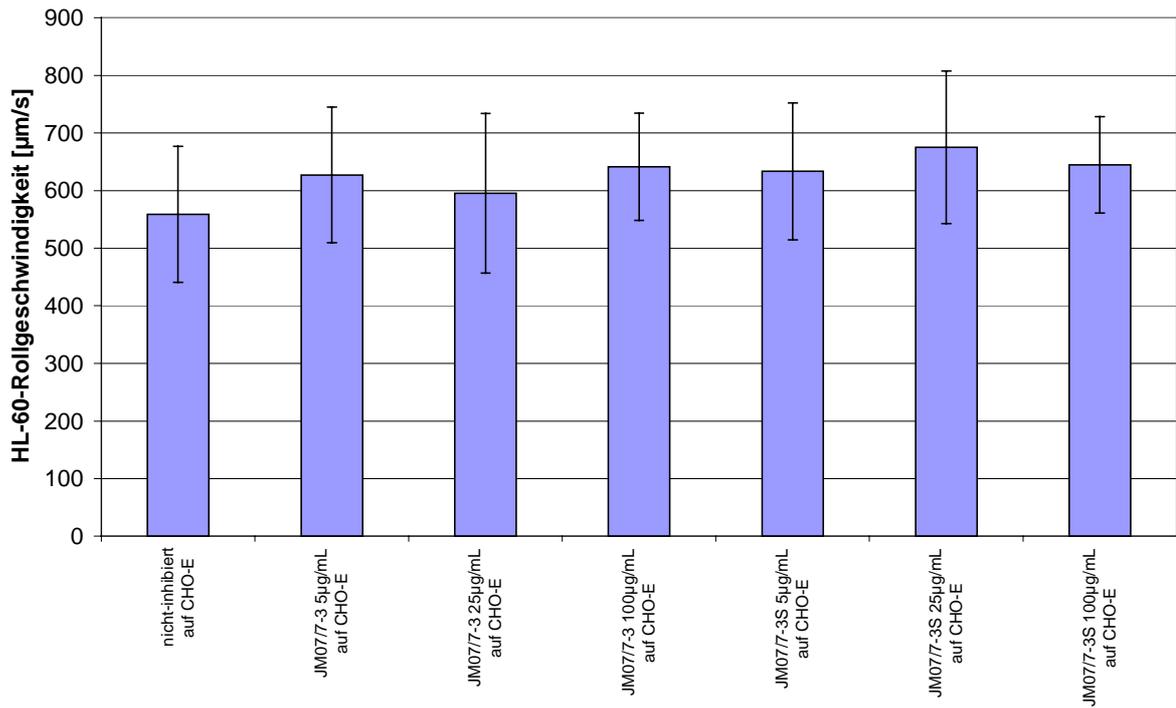


Abbildung 3.77: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf CHO-E-Zellayern. Die CHO-E-Zellayern wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

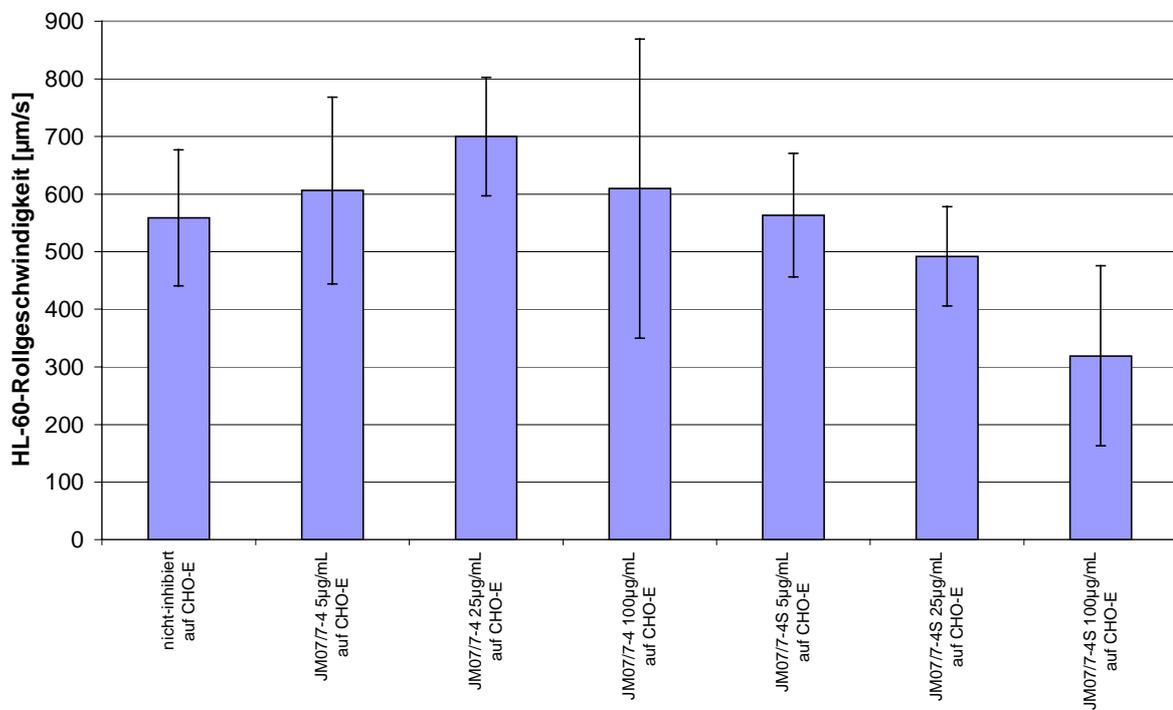


Abbildung 3.78: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf CHO-E-Zellayern. Die CHO-E-Zellayern wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die mittlere Rollgeschwindigkeit der HL-60 Zellen auf IL-1 β -induzierten HUVEC-Layern betrug 440 (sd 193) $\mu\text{m/s}$ und war damit zehnfach höher als bei einer Wandschubspannung von $0,15 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ (siehe Abbildung 3.79, vgl. Abbildung 3.66). Relativ zu der mittleren Rollgeschwindigkeit von HL-60 Zellen auf CHO-E-Layern war diese bei physiologischer Wandschubspannung um 21,3% geringer als auf CHO-E-Layern. Bei hypophysilogischer Wandschubspannung betrug der Unterschied 52,7%. Daher nehmen mit steigender Scherkraft die Stärke und/oder die Anzahl der E-Selektin-unabhängigen Wechselwirkungen die für die mittlere Rollgeschwindigkeit verantwortlich sind ab.

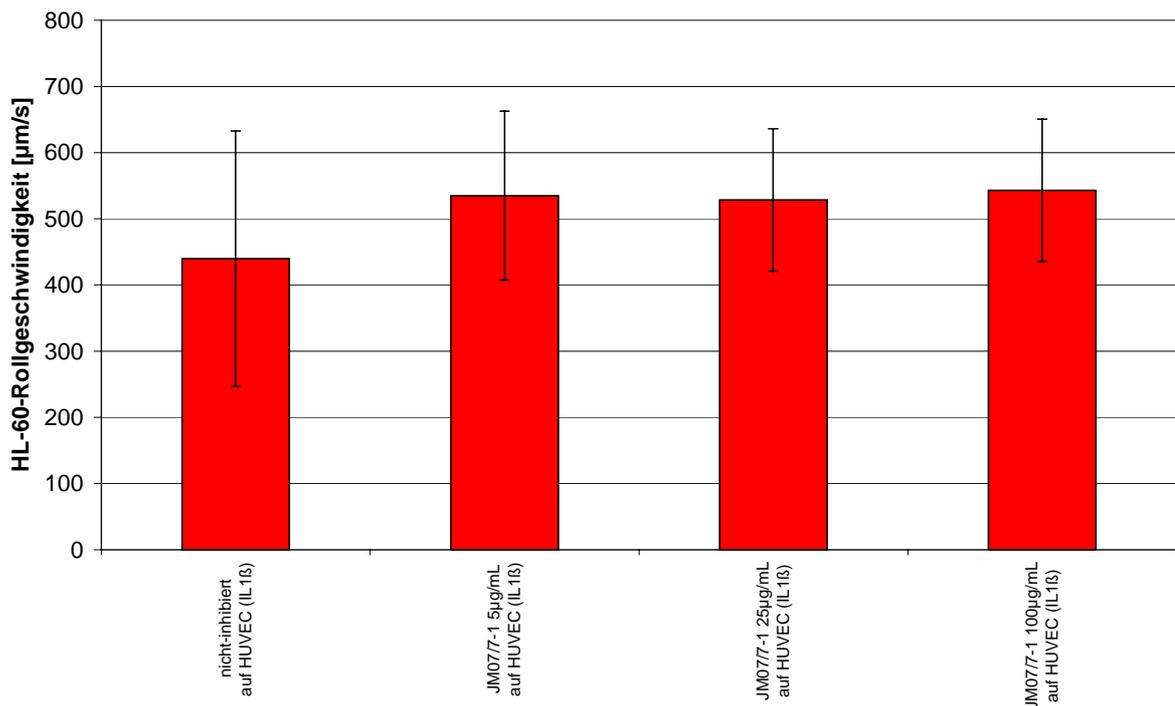


Abbildung 3.79: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf IL-1 β -induzierten HUVEC-Layern. Die HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Inkubationen mit humanen Granulocytgangliosiden der Fraktionen JM07/7-1, JM07/7-3, JM07/7-3S, JM07/7-4 bzw. JM07/7-4S in Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ führten zu Steigerungen der mittleren Rollgeschwindigkeit auf bis zu 584 $\mu\text{m/s}$ (siehe Abbildung 3.79, Abbildung 3.80 und Abbildung 3.81). Die gemessenen Werte variierten allerdings sämtlich im Standardabweichungsbereich des nicht-inhibierten Kontrollansatzes. Daher konnte durch die Einwirkung von Granulocytgangliosiden kein eindeutiger Effekt bezüglich der mittleren Rollgeschwindigkeit der HL-60 Zellen auf HUVEC-Layern ermittelt werden.

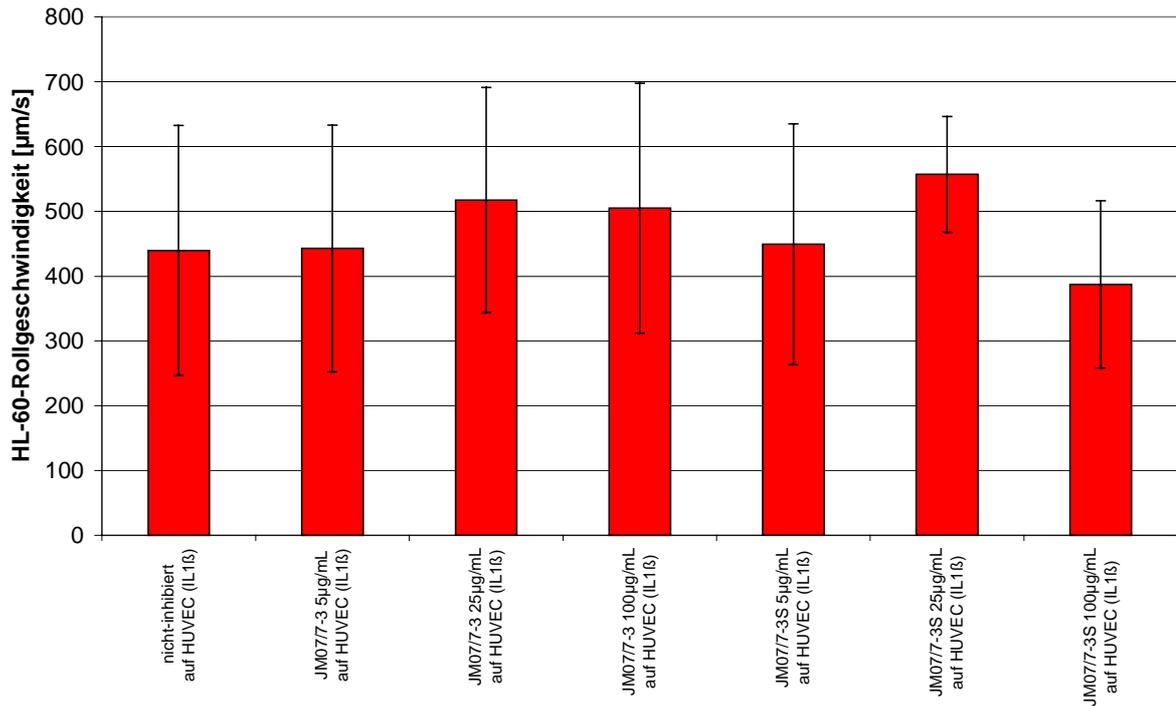


Abbildung 3.80: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf IL-1 β -induzierten HUVEC-Layern. Die HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

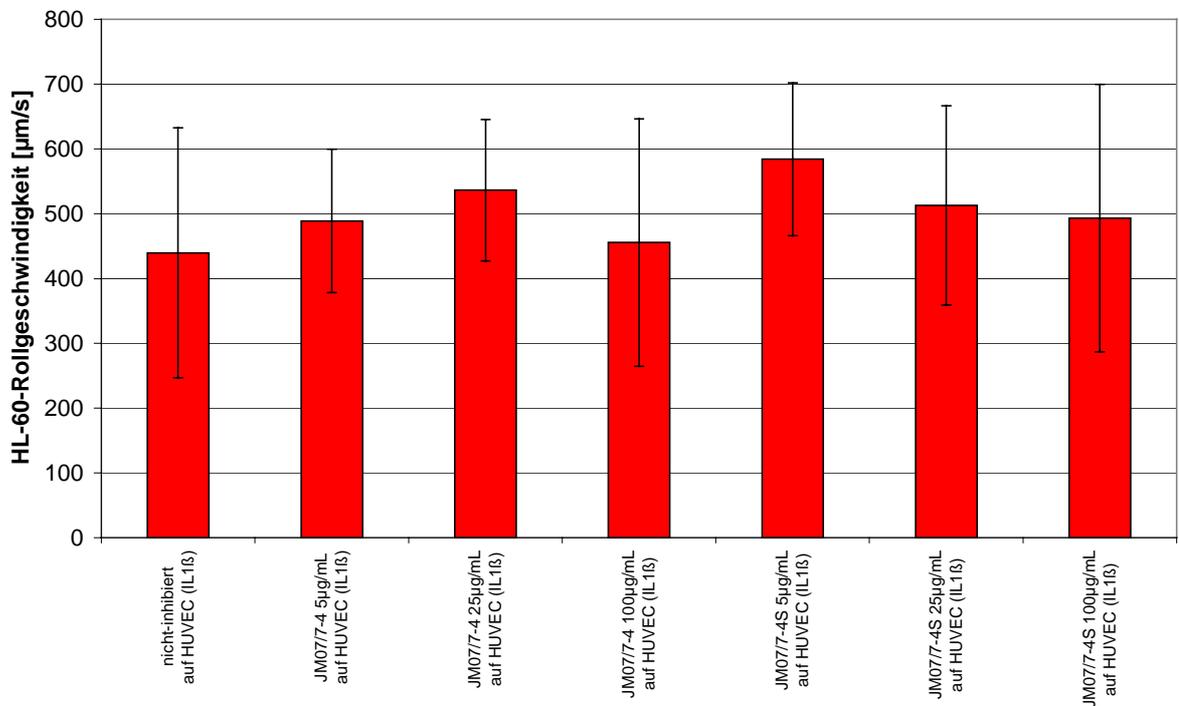


Abbildung 3.81: Mittlere ($n=15$) HL-60-Rollgeschwindigkeit auf IL-1 β -induzierten HUVEC-Layern. Die HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen mit HL-60 Zellen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Anzahl der bei einer Wandschubspannung von $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ innerhalb von zehn Minuten statisch adhätierenden HL-60 Zellen pro mm^2 wurde zunächst mit nicht-inhibierten CHO-E-Zellayern untersucht. Dabei adhätierten 754 (sd 19) HL-60 Zellen/ mm^2 statisch an die CHO-E Zellen. Im Vergleich zum nicht-inhibierten Ansatz bei einer Wandschubspannung von $0,15 \cdot 10^{-5} \text{ N/cm}^2$ wurden trotz 6,7facher Kraftereinwirkung pro Flächeneinheit nur 19,1% weniger HL-60 Zellen fest gebunden. Demnach verhindert die höhere Scherkraft die Zell-Zell-Adhäsion auf den CHO-E Zellen nur unwesentlich, da in diesem Modell mit den E-Selektin-hoch-exprimierenden Zellen trotz sechsfacher Rollgeschwindigkeit noch immer annähernd gleich viele HL-60 Zellen bis zum Stillstand gebracht wurden. Die Geschwindigkeit ist im gleichförmig beschleunigten System proportional zur wirkenden Kraft. Daher sollte bei 6,7facher Kraft auch die Rollgeschwindigkeit um diesen Faktor erhöht werden. Die tatsächlich gemessene niedrigere Geschwindigkeit könnte aus einem kurzfristigen Gleiten der HL-60 Zellen auf dem unebenen Zellayer jeweils zwischen zwei benachbarten CHO-E Zellen mit anschließender kurzzeitiger statischer Adhäsion beim Auftreffen auf die dahinterliegende CHO-E Zelle verursacht werden. Dabei würde das Ausbilden von statischen Adhäsionen begünstigt weil HL-60 Liganden eines definierten Teilstückes der Plasmamembranoberfläche über mehrere E-Selektin-Moleküle scheren könnte.

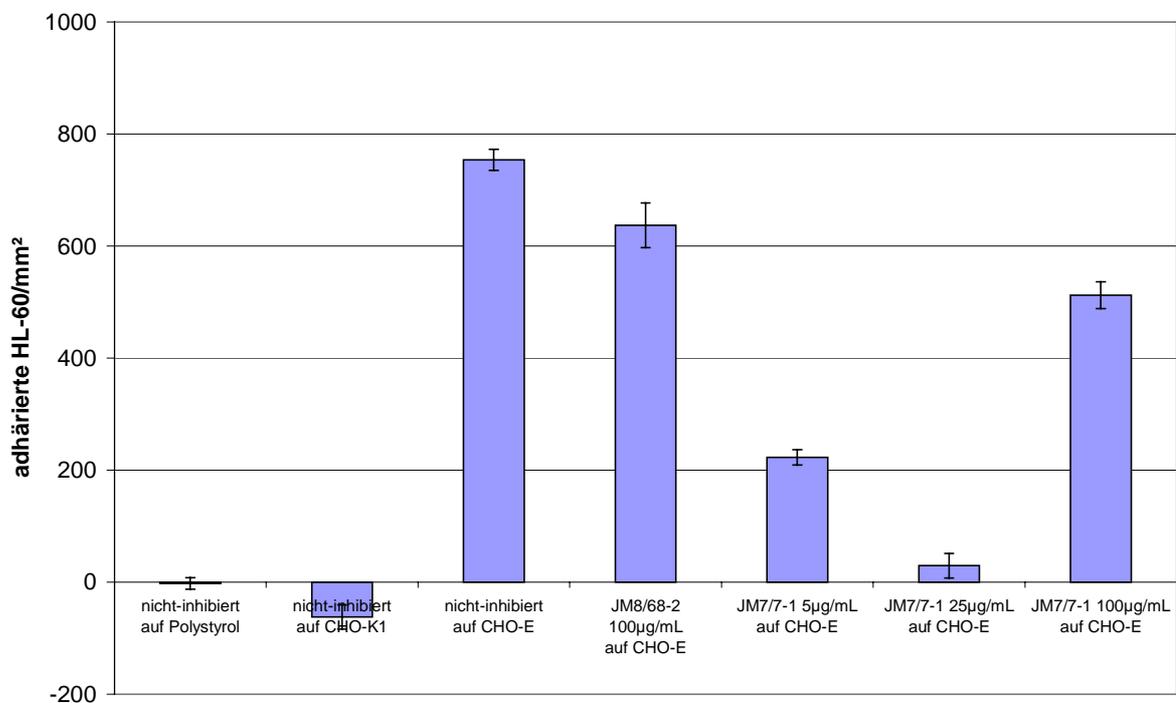


Abbildung 3.82: Differenz der Anzahl adhätierender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von Polystyrol, CHO-K1-Layern bzw. CHO-E-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von

$1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die CHO-E-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Wechselwirkung von E-Selektin mit HL-60 Liganden ist verantwortlich für die Ausbildung von statischen Adhäsionen, da auf der Polystyroloberfläche 2 (sd 10) und auf CHO-K1-Layern 62 (sd 22) HL-60 Zellen/ mm^2 innerhalb von zehn Minuten abgespült wurden. Die Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 verminderte die Anzahl der statisch adhärenen HL-60 Zellen im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz um 15,5% auf 637 (sd 40) pro mm^2 und hatte eine geringere Auswirkung als bei hypo-physiologischer Wandschubspannung (30,9%).

Die Granulocytganglioside der Fraktion JM07/7-1 hatten bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/mL}$ die größte Wirkung. Sie reduzierten die Anzahl statisch adhärenen HL-60 Zellen um 96,2%. Dieser Effekt wurde bereits bei niedrigerer Wandschubspannung beobachtet (vgl. Abbildung 3.68). Die Steigerung der Gangliosidkonzentration auf 100 $\mu\text{g/mL}$ ergab eine geringere Inhibitionseffizienz der Zell-Zell-Adhäsion von 32,1%. Dieser Effekt wurde ebenfalls bereits erfaßt und wurde vermutlich durch der Ausbildung von Micellen verursacht. Nach einer Inkubation der CHO-E Zellen mit 5 $\mu\text{g/mL}$ der Fraktion JM07/7-1 wurden 70,4% weniger HL-60 Zellen fest gebunden als im nicht-inhibierten Kontrollansatz. Bei physiologischer Wandschubspannung reicht diese Konzentration also ebenfalls wie bei hypo-physiologischer Wandschubspannung aus um mehr als $2/3$ der sonst adhärenen HL-60 Zellen an einer statischen Bindung zu hindern.

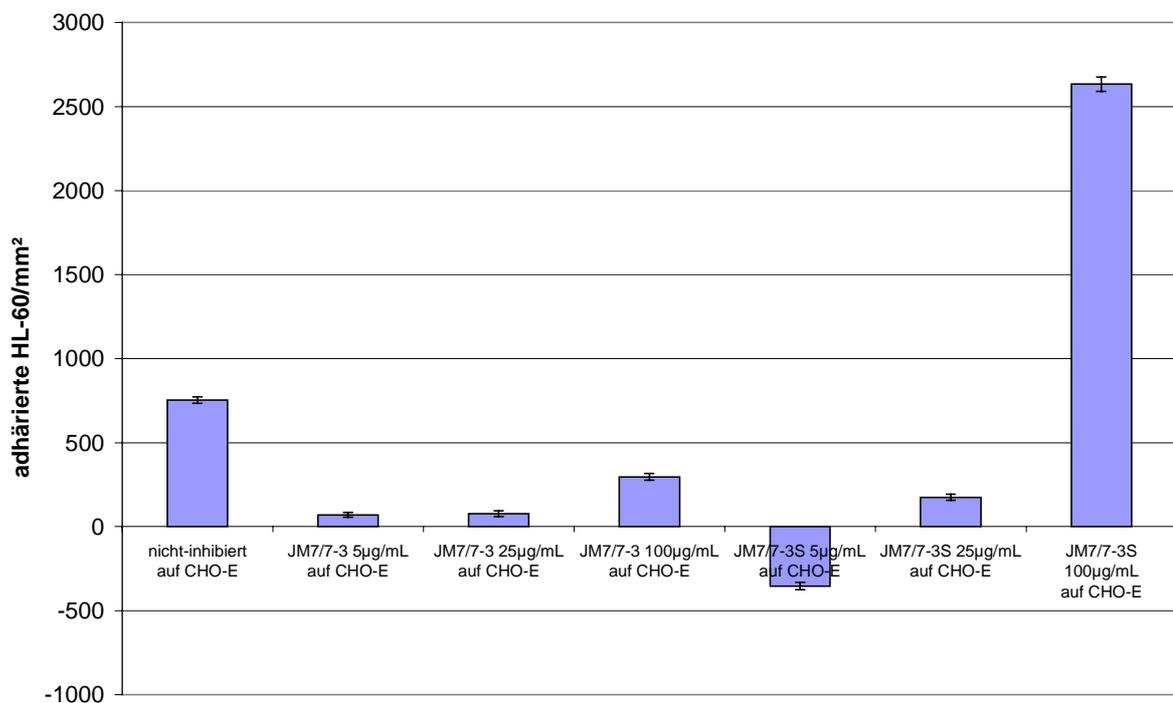


Abbildung 3.83: Differenz der Anzahl adhärenen HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von CHO-E-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die CHO-E-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Fraktion JM07/7-3 verminderte die Anzahl der statisch adhärenenden HL-60 Zellen bereits in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ um 90,7% auf 70 (sd 14) Zellen/ mm^2 (siehe Abbildung 3.83). Mit Steigerung der Konzentration auf 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ wurden 77 (sd 17) bzw. 296 (sd 19) HL-60 Zellen/ mm^2 statisch gebunden. Das entspricht Inhibitionseffizienzen von 89,8% bzw. 60,7%. In geringer Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 25 $\mu\text{g/mL}$ wirkte auch die Fraktion JM07/7-3S inhibitorisch bezüglich der Zell-Zell-Adhäsion. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ allerdings wurde wie bei hypo-physiologischer Wand Schubspannung eine Adhäsions-vermittelnde Wirkung festgestellt, so daß mit einer Anzahl von 2633 (sd 42) pro mm^2 249,2% mehr HL-60 Zellen statisch adhärten als im nicht-inhibierten Kontroll-Ansatz.

Nach der Inkubation der CHO-E-Layer mit der Granulocytengangliosidfraktion JM07/7-4 in Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ verminderte die Anzahl der statisch adhärenenden HL-60 Zellen auf 116 (sd 17), 24 (sd 10) bzw. -150 (sd 16) pro mm^2 (siehe Abbildung 3.84). Im Vergleich zum Kontrollansatz entspricht das einer Reduktion der fest gebundenen Zellen von 84,6%, 96,8% bzw. mehr als 100%. Auch die Fraktion JM07/7-4S verursachte nach Inkubation mit Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ eine Reduktion von 64,5%, 72,1% bzw. 71,5%. Beide Fraktionen führten zu Reduktionen der Adhäsionseffizienz auf CHO-E Zellen wie bereits bei hypo-physiologischer Wand Schubspannung beobachtet (vgl. Abbildung 3.70).

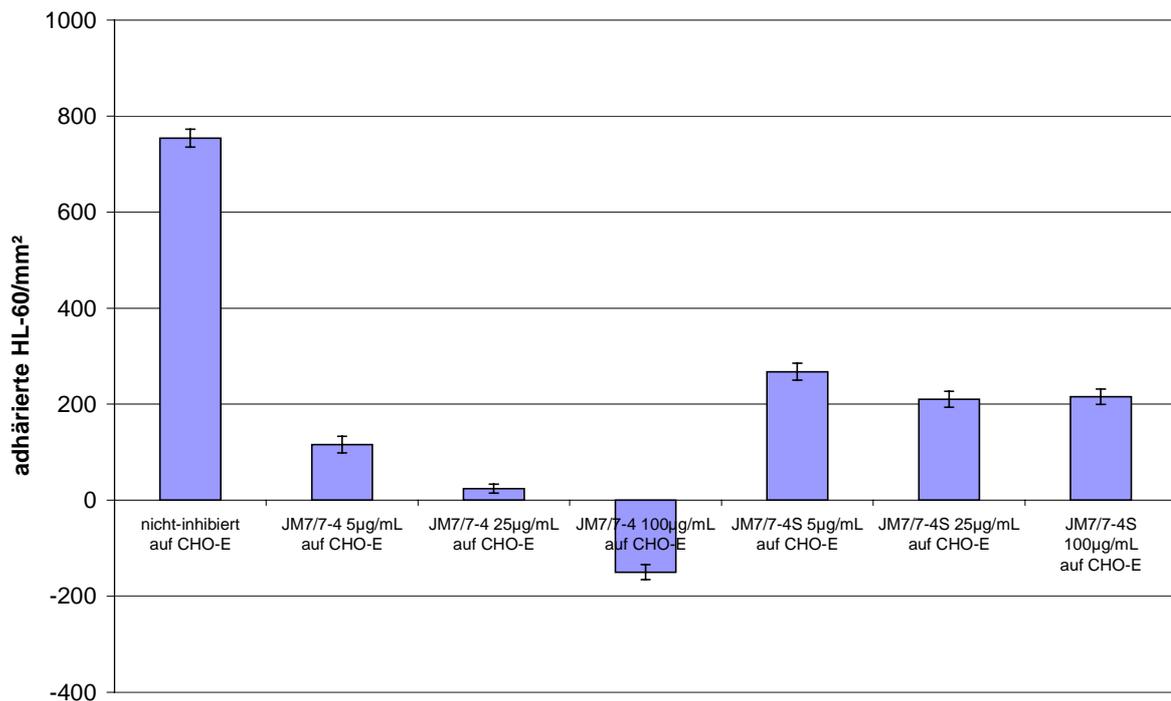


Abbildung 3.84: Differenz der Anzahl adhärenender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von CHO-E-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die CHO-E-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Fraktionen JM07/7-3S und JM07/7-4S wurden wie bei hypo-physiologischer auch bei physiologischer Wandschubspannung auf ihre Adhäsions-vermittelnde Eigenschaft mit CHO-K1 Zellen getestet. Nach Inkubation der CHO-K1 Zellen wurde keine Zunahme der Anzahl statisch adhätierender Zellen gemessen (siehe Abbildung 3.85). Daher läßt sich folgern, daß die Ganglioside mit ihrem Ceramidteil nicht in die Plasmamembran der CHO-K1 Zellen inserierten und die von der Fraktion JM07/7-3S ausgelöste und in Abbildung 3.83 dargestellte Steigerung der Anzahl statisch adhätierender HL-60 Zellen auf E-Selektin-abhängige Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

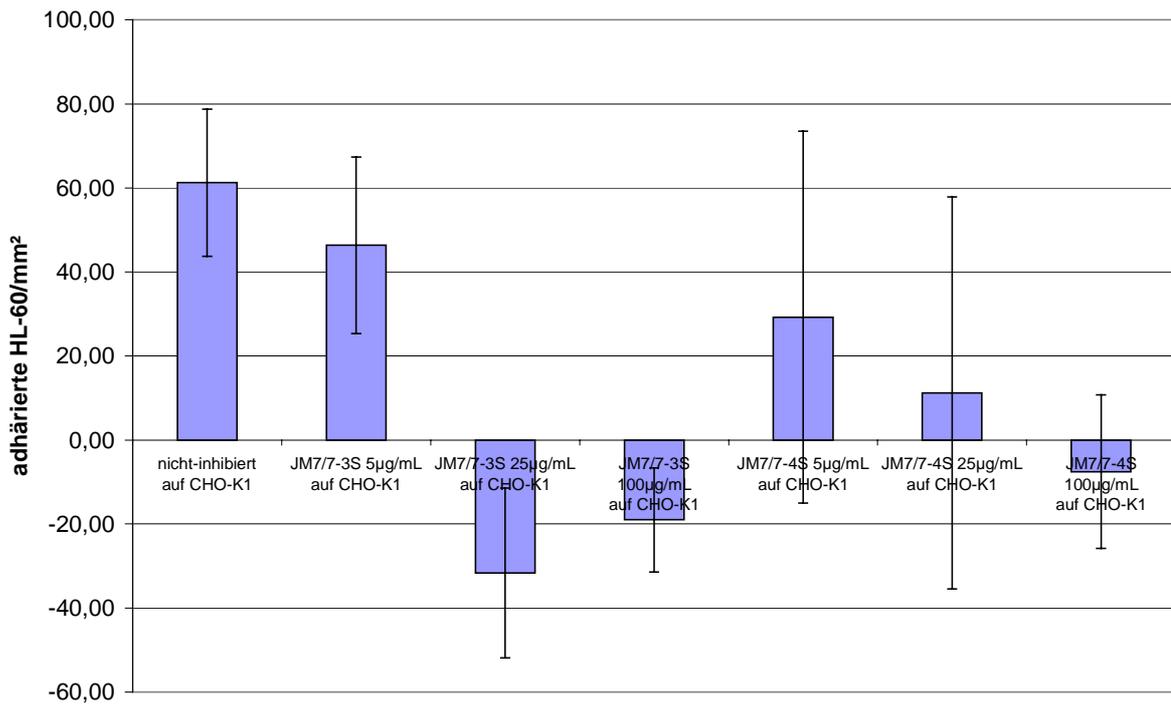


Abbildung 3.85: Differenz der Anzahl adhätierender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von CHO-K1-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die CHO-K1-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 µg/mL der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Mit den gleichen Gangliosidfraktionen wurde deren Einfluß auf das Adhäsionsvermögen von HL-60 Zellen auf HUVEC-Layern bei physiologischer Wandschubspannung von $1,0 \cdot 10^{-5}$ N/cm² untersucht. Zunächst wurde die Anzahl der innerhalb von zehn Minuten statisch adhätierenden HL-60 Zellen auf nicht-induzierten HUVEC Layern gemessen. Dabei wurde eine (sd 4) HL-60 Zelle/mm² abgespült (siehe Abbildung 3.86). Ohne Induktion der E-Selektin-Expression wurden demnach keine HL-60 Zellen statisch gebunden. Nach vierstündiger Induktion mit IL-1 β adhätierten 119 (sd 15) HL-60/mm² und damit 69,2% weniger als bei hypo-physiologischer Wandschubspannung. Aufgrund der geringeren E-Selektin-Expression der HUVEC im Vergleich zu den CHO-E Zellen konnten weniger

HL-60 Zellen zum Stillstand gebracht werden. Das human/humane System war also sensibler für Scherkraftänderungen als das human/murine. Die Ergebnisse verdeutlichen aber auch den bei Vasodilatation im Falle einer Entzündung auftretenden Effekt der erleichterten Adhäsion durch Reduktion der Wandschubspannung. Um die Einwirkung von HL60-Integrinen auf die Zell-Zell-Adhäsion zu untersuchen wurden HUVEC Layer für 24 Stunden mit IL-1 β induziert. Die dadurch induzierten Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (vgl. Abbildung 1.6) können mit Integrinen wechselwirken. Der Expressiongrad des E-Selektins beträgt nach 24 Stunden Induktion nur noch ca. 30% wogegen die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf einem Niveau von ca. 100% bzw. ca. 85% präsentiert werden (Imhof and Dunon, 1995). Auf den für 24 Stunden induzierten HUVEC-Layern adhärten 19 (sd 9) HL-60 Zellen/mm² und damit 84,0% weniger als auf den für vier Stunden induzierten Layern. Im statischen System betrug die prozentuale Differenz 33,2% (vgl. Abbildung 3.40). Dies veranschaulicht die Notwendigkeit der E-Selektin-Wechselwirkung bezüglich der HL-60 Zell-Zell-Adhäsion im dynamischen System. Die Reduktion der E-Selektin-Dichte auf der Plasmamembran konnte nicht durch die Expression von den Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 kompensiert werden um eine äquivalente Anzahl statischer Adhäsionen zu verursachen. Ohne die E-Selektin-Interaktion mit HL-60 Liganden wird der initiale Schritt der Zelladhäsion – das Tethering – in dem verwendeten dynamischen *in vitro*-System nicht ausgelöst.

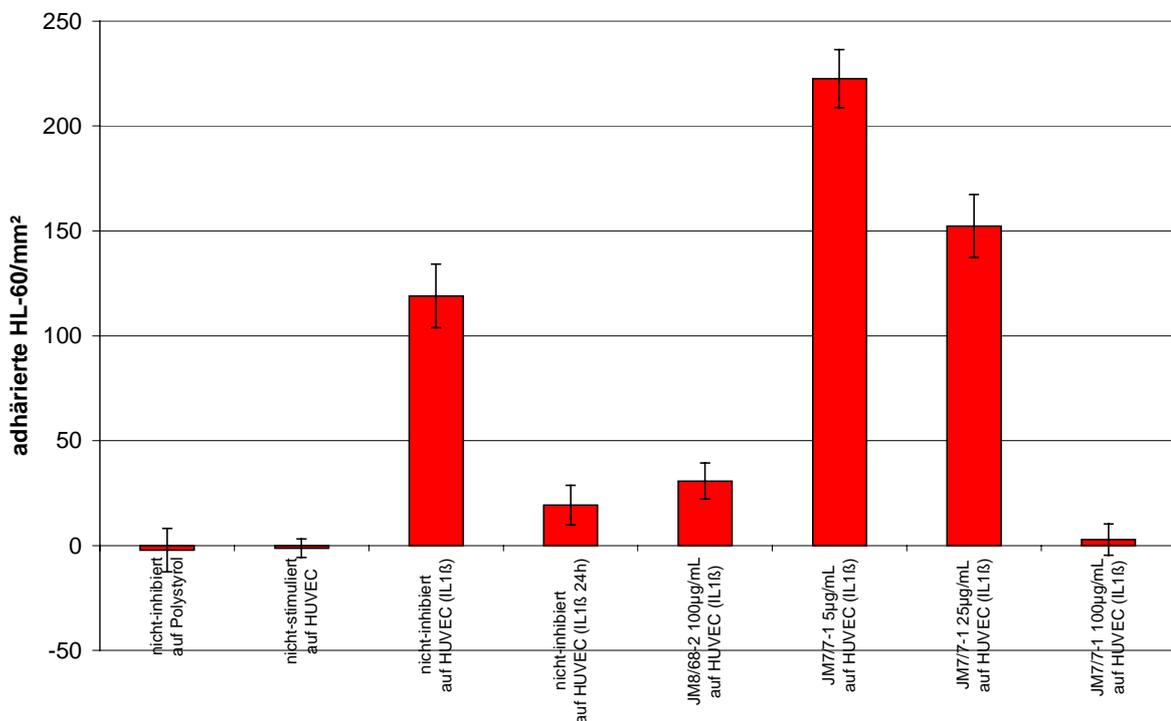


Abbildung 3.86: Differenz der Anzahl adhätierender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von Polystyrol und HUVEC-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die IL-1 β -induzierten HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 μ g/mL der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Inkubation der HUVEC-Layer mit der humanen Hirngangliosidfraktion JM08/68-2 in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ergab nach anschließendem Überströmen mit der HL-60 Suspension eine Anzahl von 31 (sd) statisch adhätierenden HL-60 Zellen/ mm^2 . Das entspricht einer Reduktion von 73,9% im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz. Somit inhibierte die Hirngangliosidfraktion ebenfalls deutlich die Zell-Zell-Adhäsion. Verantwortlich dafür könnte ein E-Selektin-bindendes Gangliosid sein, das im HPTLC-Overlay detektiert wurde und das kein sLe^x-Epitop trägt (vgl. Abbildung 3.23). Während bei hypo-physiologischer Wandschubspannung keine Reduktion der HL-60 Adhäsion auf HUVEC-Layern auftrat, könnte bereits die Maskierung eines geringen Prozentsatzes der E-Selektin-Moleküle den gemessenen Effekt bei physiologischer Wandschubspannung auslösen wie dies bereits im Ansatz zur Untersuchung der Integrin-Wechselwirkung deutlich wurde.

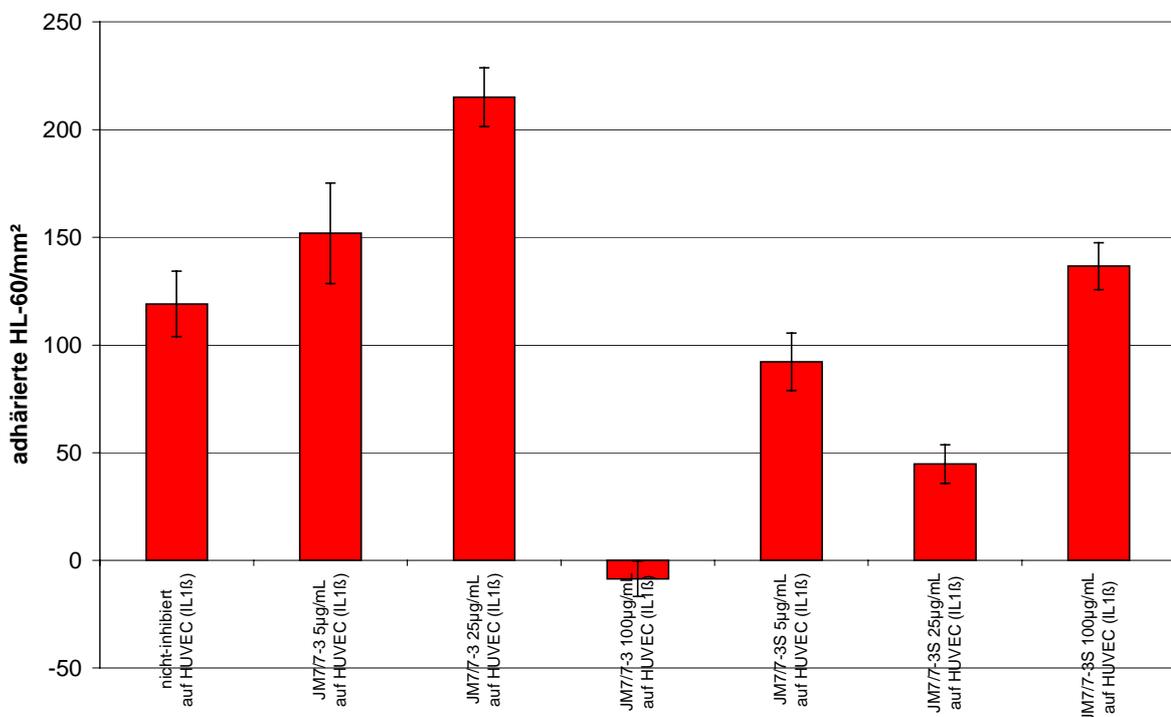


Abbildung 3.87: Differenz der Anzahl adhätierender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von HUVEC-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ mL . Die IL-1 β -induzierten HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Die Inkubation der HUVEC-Layer mit humanen Granulocytengangliosiden der Fraktion JM07/7-1 in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ maskierte die E-Selektin-Moleküle derart, daß lediglich 3 (sd 7) HL-60 Zellen/ mm^2 fest gebunden wurden. Im Vergleich zum nicht-inhibierten Kontrollansatz ist das eine Reduzierung der statisch adhätierenden HL-60 Zellen von 97,5%. Geringere Konzentrationen von 5 bzw. 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ führten zu gesteiger-

ten Zahlen gebundener HL-60 Zellen von 223 (sd 14) bzw. 152 (sd 15). Diese Werte legen die Vermutung nahe, daß in den Kontrollansätzen auffallend wenige HL-60 Zellen statisch adhärten, da auch im Vergleich zu HUVEC-Layern, die mit der Fraktion JM07/7-3 in diesem Konzentrationsbereich inkubiert wurden, in den nicht-inhibierten Ansätzen weniger bindende Zellen gezählt wurden (vgl. Abbildung 3.87).

Erst eine Konzentration von 100 µg/mL der Fraktion JM07/7-3 konnte die Anzahl der statisch adhärierenden HL-60 Zellen im Vergleich zum nicht-inhibierten Ansatz deutlich reduzieren, so daß acht HL-60 Zellen/mm² abgespült wurden und die Reduktion über 100% betrug.

Die zugeführten Ganglioside der Fraktion JM07/7-3S erhöhten die Anzahl der statisch gebundenen HL-60 Zellen bei physiologischer Wandschubspannung bei einer angewendeten Konzentration von 100 µg/mL um 15,1%. Geringere Konzentrationen von 5 bzw. 25 µg/mL wirkten adhäsionsinhibierend und reduzierten die Anzahl fest gebundener HL-60 Zellen um 41,7% bzw. 62,2%.

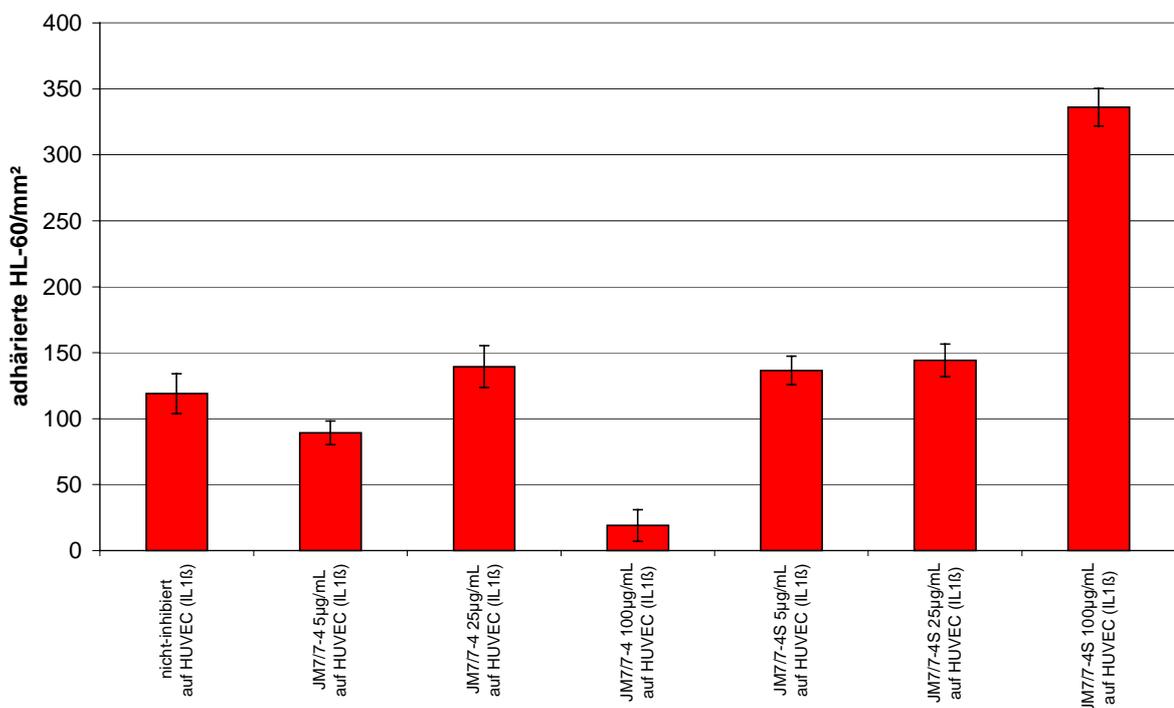


Abbildung 3.88: Differenz der Anzahl adhärrender HL-60 Zellen ($t_{10}-t_0$) nach 10minütigem Überströmen von HUVEC-Layern mit HL-60 Suspensionen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die IL-1 β -induzierten HUVEC-Layer wurden vor dem Überströmen für fünf Minuten mit 5, 25 bzw. 100 µg/mL der angegebenen Gangliosidfraktionen inkubiert.

Auch die Ganglioside der Fraktion JM07/7-4 konnten erst mit Anwendung der höchsten Konzentration von 100 µg/mL eine deutliche Inhibition der Zell-Zell-Adhäsion von 84,0% erreichen (siehe Abbildung 3.88). Geringere Konzentrationen von 5 bzw. 25 µg/mL bewirkten eine Reduktion um 25,2% bzw. eine Zunahme um 17,6%. Die Fraktion JM07/7-4S

verursachte nach Inkubation der HUVEC-Layer mit Konzentrationen von 5, 25 bzw. 100 µg/mL eine Steigerung der fest gebundenen HL-60 Zellen von 15,1%, 21,0% bzw. 182,4%. Bei physiologischer Wandschubspannung wirkten die Ganglioside dieser Fraktion im human/humanen System adhäsionsvermittelnd.

Der Vergleich der Ergebnisse aus den Fließkammerexperimenten zeigt, daß die Gangliosidfraktionen JM07/7-1, JM07/7-3 und JM07/7-4 in den Konzentrationen 5, 25 und 100 µg/mL sowohl bei hypo-physiologischer als auch bei physiologischer Wandschubspannung die statische Adhäsion auf CHO-E Zellen verhindert. Die sialylierten, aber nicht fucosylierten (vgl. Abbildung 1.11 und Abbildung 3.23) Hirnganglioside der Fraktion JM08/68-2 vermindern die Anzahl der fest gebundenen HL-60 Zellen in der höchsten angewendeten Konzentration von 100 µg/mL 3-8fach weniger. Dabei wird möglicherweise ein im HPTLC-Overlay detektiertes Gangliosid unphysiologisch aber spezifisch gebunden (vgl. Abbildung 3.23). In den Fraktionen JM07/7-1, JM07/7-3 und JM07/7-4 sind mindestens 16 E-Selektin-bindende Einzelstrukturen vorhanden. Daher reicht bereits eine Konzentration von 5 µg/mL aus, um die Anzahl der statischen Adhäsionen um bis zu 95,8% zu reduzieren.

Da die CHO-E Zellen keine anderen Granulocyten-relevanten Adhäsionsmoleküle außer E-Selektin exprimieren, konnte die E-Selektin-Wechselwirkung mit Liganden auf den HL-60 Zellen anhand der kompetitiven Hemmung mit humanen Granulocytengangliosiden nachgewiesen werden. Damit wurde im dynamischen System bewiesen, daß humane Granulocytenganglioside Liganden des E-Selektins darstellen.

Die Gangliosidfraktionen JM07/7-3S und JM07/7-4S enthalten Ganglioside mit langkettigen Kohlenhydratepitopen, die Liganden auf HL-60 Zellen binden und adhäsionsvermittelnd wirken. Dabei handelt es sich möglicherweise um Strukturen der in Abbildung 3.23 dargestellten Bandenregion 16 die eine schwache Affinität zu E-Selektin aufweisen. Diese könnten in Micellen mit E-Selektin-bindenden Gangliosiden als Bindeglied adhäsionsvermittelnd zu L-Selektin wirken oder eine Affinität zu HL-60 Gangliosiden aufweisen.

Im Unterschied zur reinen E-Selektin-vermittelten Adhäsion zwischen CHO-E- und HL-60 Zellen konnte bei der Wechselwirkung zwischen HUVEC und HL-60 Zellen ein differentes Adhäsionsmuster in Abhängigkeit von der Wandschubspannung entdeckt werden. Bei geringer Scherkraft genügen geringe Granulocytengangliosidkonzentrationen von 5 µg/mL, um die Anzahl statisch adhärrierender HL-60 Zellen bis zu 78,5% zu verringern. Bei höherer physiologischer Scherkraft ist eine Konzentration von 100 µg/mL notwendig, die dann aber die Anzahl der adhärrierten HL-60 Zellen um 84,0% bis 100% verringert. Da sowohl die Induktionsart der E-Selektin-Expression als auch die eingesetzten Konzentrationen der Ganglioside bei hypo-physiologischer und physiologischer Wandschubspannung gleich waren, existiert möglicherweise ein E-Selektin-unabhängiger Mechanismus, der für eine Adhäsion der HL-60 Zellen mitverantwortlich ist und erst bei physiologischen Scherkräften wirkt. Der Ligand dieses Mechanismus muß auf endothelialer Seite transient exprimiert werden, da nach 24 Stunden die Zell-Zell-Adhäsion um 84% reduziert ist. Deshalb können die Proteine ICAM-1 und VCAM-1 der Immunglobulingensuperfamilie nicht

dafür verantwortlich sein, denn diese werden nach 24stündiger Induktion nahezu maximal exprimiert. Vielmehr könnte es sich dabei um ein glykosyliertes Protein oder um Ganglioside handeln, die nach Induktion durch IL-1 β exprimiert werden. Als Rezeptor käme dabei das konstitutiv auf Granulocyten und HL-60 Zellen exprimierte L-Selektin in Frage. Da L-Selektin selbst auch eine Affinität zu sLe^x-Strukturen aufweist, könnte eine Maskierung des L-Selektins mit den zugegebenen Granulocytengangliosiden bei hoher Konzentration eine statische Adhäsion verhindern.

Eine mit größerer Wandschubspannung gesteigerte Affinität des E-Selektins zu HL-60 Liganden ist dagegen eher auszuschließen, da bei physiologischer Scherkraft 69,2% weniger HL-60 Zellen statisch adhäreren als bei hypo-physiologischer.

4 Zusammenfassung

Die Infektionsabwehr *in vivo* beruht neben der humoralen auch auf der zellulären Immunantwort. Dabei wird vom Organismus u.a. die Strategie der Phagozytose zur Beseitigung von Erregern angewendet. Die dafür verantwortlichen Zellen sind u.a. Granulocyten, die aus dem Blutstrom zum Ort der Entzündung in das Gewebe geleitet werden müssen. Der Gesamtprozeß der Adhäsionskaskade besteht aus vier Schritten und beginnt mit dem Verlangsamen der Granulocytengeschwindigkeit durch „Anbinden“ und „Rollen“ (engl.: „tethering“ und „rolling“). Mit dem zweiten Schritt werden die Granulocyten aktiviert und adhären schließlich im dritten Schritt fest an die Endothelzellen. Der vierte und letzte Schritt beinhaltet die Durchdringung der Endothelzellbarriere (Diapedese) und das anschließende Einwandern in das darunterliegende Gewebe. Cytokin-induzierte Endothelzellen exprimieren transient E-Selektin, das membranständig auf der Plasmamembranoberfläche präsentiert wird und die Granulocyten über Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen *in situ* „einfängt“. Diese Interaktion stellt den ersten Schritt der Kaskade dar. Als Ligand des E-Selektins wurde das sialyl-Lewis^x-Epitop (sLe^x; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-R) entdeckt. Dieses Epitop wurde sowohl auf Glykoproteinen als auch auf granulocytären Gangliosiden detektiert.

Das Arbeitsziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der funktionellen Bedeutung dieser Ganglioside für die E-Selektin-vermittelte Zell-Zell-Wechselwirkung. Dazu wurden ein statisches und ein dynamisches Zell-Zell-Adhäsionssystem entwickelt. Das statische System beruhte auf einem Mikrotiterplattenassay und das dynamische auf einer Fließkammer, in der die *in vivo*-Verhältnisse simuliert wurden. Als Modellzelllinien wurden HL-60 Zellen statt primärer Granulocyten und E-Selektin-transfizierte CHO-Zellen (CHO-E) bzw. primäre humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) statt primärer mikrovasculärer Endothelzellen eingesetzt. Die HL-60 Zellen wurden im statischen System auf CHO-E Zellen bzw. HUVEC zentrifugiert und nicht adhären Zellen mit einem Mikrotiterplattenspülgerät abgespült. Die adhären Zellen wurden gezählt. Im dynamischen System wurden die innerhalb von zehn Minuten auf den CHO-E- bzw. HUVEC-Layern adhären Zellen ausgezählt. Die Zellzählung wurde mit einem „Adhex“-System automatisiert.

Die Untersuchungen zur Inhibition der Zell-Zell-Adhäsion basierten auf drei grundsätzlichen Methoden: der spezifischen enzymatischen Hydrolyse potentieller Liganden bzw. Rezeptoren, der metabolischen Blockade des Anabolismus potentieller Liganden und der spezifischen Maskierung potentieller Liganden bzw. Rezeptoren.

Die Substanzklasse (Protein, Lipid) und die funktionelle Bedeutung der an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligten Oligosaccharide wurden enzymatisch mit Trypsin, Papain, einer cytosolischen Säugetiersialidase (rCHO-Sialidase), der *Vibrio cholerae* Sialidase, PNGase F und einer Endoglykoceramidase aus *Rhodococcus* ermittelt. Nachfolgend wurde die Ligandenbiosynthese der HL-60 Zellen mit den Glykosylierungsinhibitoren D-PDMP, Fumonisin B₁, Brefeldin A und Tunicamycin verändert.

Die Zell-Zell-Adhäsion wurde auf leukocytärer Seite mit dem monoklonalen Antikörper CSLEX und einem rekombinanten löslichen E-Selektin-IgG-Protein blockiert. Auf endothelialer Seite wurden die E-Selektin-Moleküle mit granulocytären sLe^x-Gangliosiden maskiert.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil ist die Produktion der zur Blockierung der Zell-Zell-Adhäsion verwendeten Proteine sowie die biochemische Charakterisierung der zur Maskierung eingesetzten Gangliosidfraktionen aus humanen Granulocyten dargestellt. Der zweite Teil umfaßt die Zell-Zell-Adhäsionsexperimente im statischen und dynamischen System.

Produktion des CSLEX-Antikörpers

Das CSLEX-Hybridom wurde an serumfreie Kultivierungsbedingungen adaptiert. Zur Produktion des Maus IgM-Antikörpers wurden die Zellen im SuperSpinner und im 5 L-Bioreaktor in wiederholt satzweiser Prozeßführung mit Zellrückführung nach Zentrifugation kultiviert. Im 5 L-Bioreaktor wuchsen die Zellen mit einer spezifischen Wachstumsrate von $0,86 \text{ d}^{-1}$ und produzierten $16,6 \mu\text{g Antikörper}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$. Die spezifischen Verbrauchsdaten für Glucose und Lactat betragen dabei $-7,14 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ und $12,24 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$. Aus sieben Produktionssätzen der SuperSpinner-Kultur und sechs Ansätzen der 5 L-Bioreaktorkultur mit einem Überstandgesamtvolumen von 32 L wurden nach zweistufiger Zentrifugation, Ultra- und Diafiltration sowie Lyophilisierung und Solvatisierung in CMF-PBS 335 mg CSLEX-Antikörper bei einer Gesamtausbeute von 43% isoliert.

Produktion des E-Selektin-IgG-Proteins

Der Vergleich der spezifischen Produktionsraten der in Suspension kultivierten CHO-IE Zellen unter serumfreien und serumhaltigen sowie auf Microcarriern unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen ergab Werte von $17,3 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ und $100 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ sowie $163 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$. Aus Kostengründen wurde auf den Einsatz von Microcarriern und um die Produktaufreinigung zu erleichtern auf den Einsatz von Serum verzichtet und die CHO-IE Zellen stattdessen an serumfreie Kultivierungsbedingungen adaptiert. Satzweise Kultivierungen im 5 L-Bioreaktor und 10 L-Spinner mit spezifischen Produktionsraten von $12 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ bzw. $17 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ ergaben 0,8 mg bzw. 8,5 mg E-Selektin-IgG. Nach der Selektionierung von Zellklonen im Spinner wurden die Produktionsraten in einer SuperSpinnerkultur auf $205 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ gesteigert. Kultivierungen im 2 L-Perfusionssystem bzw. im wiederholt satzweise geführten 100 L-Bioreaktor lieferten bei spezifischen Produktionsraten von $121 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ bzw. $145 \text{ ng}/(10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d})$ Gesamtmengen von 35,2 mg bzw. 105,6 mg E-Selektin-IgG. Nach den Aufarbeitungsschritten Zentrifugation, $3 \mu\text{m}$ -Tiefenfiltration, 10 kDa-Ultrafiltrationskonzentration und Protein A-Affinitätsreinigung erfolgte die Aliquotierung und das Einfrieren bei -80°C . Mit Ausbeuten von 52,0% bzw. 67,7% konnten letztendlich aus der 2 L-Perfusionsbioreaktorkultur 18,3 mg und aus der 100 L-Bioreaktorkultur 71,5 mg E-Selektin-IgG in aufgereinigter Form gewonnen werden.

Charakterisierung der Gangliosidfraktionen aus humanen Granulocyten

Massenspektrometrische Untersuchungen belegten die grundsätzliche strukturelle Übereinstimmung der detektierten Ganglioside von humanen Granulocyten und HL-60 Zellen. Es wurden fünf verschiedene humane Granulocytengangliosidfraktionen (JM07/7-1, JM07/7-3, JM07/7-3S, JM07/7-4, JM07/7-4S), zwei HL-60 Gangliosidfraktionen (JM08/72-1, JM08/72-2) und eine humane Hirngangliosidfraktion (JM08/68-2) mittels HPTLC getrennt und im Overlay-Assay auf Anwesenheit von CSLEX- und E-Selektin-Epitopen getestet.

Die Granulocytengangliosidfraktionen enthielten neben G_{M3} ca. 26 ihrem Laufverhalten nach unterscheidbare Ganglioside der Neolacto-Serie, wovon 18 als sLe^x -Ganglioside identifiziert wurden, die das sLe^x -Epitop besaßen, und somit E-Selektin-bindende Eigenschaften aufwiesen. Die Gangliosidfraktion JM07/7-1 bestand hauptsächlich aus G_{M3} sowie sialylierten Tetra- und Hexaosylceramiden der Neolacto-Serie. Die Fraktion JM07/7-3 enthielt überwiegend sialylierte Tetra- und Hexaosylceramide sowie sLe^x -Ganglioside mit Octaosylceramidgrundstruktur. Die Ganglioside der Fraktion JM07/7-4 reichten von G_{M3} bis zu sLe^x -Gangliosiden mit Decaosylceramid-Grundgerüst. Die Sediment-Fractionen JM07/7-3S und JM07/7-4S waren angereichert mit Deca- und Dodecaosylceramiden der Neolacto-Serie mit terminalem sLe^x -Epitop.

Der CSLEX-Antikörper und das E-Selektin-IgG-Protein zeigten ein identisches Bindungsverhalten und erkannten beide im gleichen Ausmaß die verschiedenen Varianten an sLe^x -Gangliosiden. Ganglioside der Ganglio-Reihe, wie die Hirnganglioside der Fraktion JM08/68-2 G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} und G_{T1b} , werden von dem CSLEX-Antikörper und dem E-Selektin-IgG-Protein nicht gebunden.

HL-60 Adhäsion im statischen System

Die Adhäsion von HL-60 Zellen an CHO-E Zellen war zu 100% und die an IL-1 β -induzierte HUVEC zu 96% Calcium-abhängig. Der verwendete HL-60 Zellklon adhärte nicht an P-Selektin exprimierende CHO-P Zellen, aber an CHO-E Zellen, die murines E-Selektin, und an HUVEC, die natives humanes E-Selektin exprimieren.

Der hydrolytische Verdau von HL-60 Membranproteinen mit Trypsin oder Papain zeigte keine Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten von HL-60 Zellen. Die Inkubation der CHO-E Zellen mit diesen Proteasen ergab eine Trypsin- aber nicht Papain-sensitive Adhäsion. Die enzymatische Desialylierung der HL-60 Oberflächenantigene reduzierte die Anzahl adhärterter HL-60 Zellen auf CHO-E Zellen um 63,7% und auf HUVEC um 73,7%. Die Deglykosylierung N-glykosidisch gebundener Kohlenhydrate auf HL-60 Zellen mit PNGase F reduzierte nicht das Adhäsionspotential gegenüber CHO-E Zellen, aber um 49,7% für HUVEC. Die Deglykosylierung der Ganglioside auf der Zelloberfläche von HL-60 Zellen mittels Endoglykoceramidase reduzierte die Anzahl adhärerender HL-60 Zellen auf CHO-E Zellen um 41,2% und auf HUVEC um 71,5%.

Die Inhibition der Gangliosidbiosynthese durch D-PDMP reduzierte das Adhäsionspotential der HL-60 Zellen gegenüber CHO-E Zellen um 25%. Bei gleichzeitiger D-PDMP-Inkubation und Deglykosylierung mit der Endoglykoceramidase stieg dieser Wert auf

77,7%. Auf HUVEC adhärirten 25,2% weniger HL-60 Zellen nach D-PDMP-Behandlung als nicht-inhibierte HL-60 Zellen. Die Inhibition der Gangliosidbiosynthese durch Fumonisin B₁ reduzierte die Anzahl adhärirender HL-60 Zellen auf CHO-E Zellen um 5,5% und auf HUVEC um 44,1%. Die gleichzeitige Inhibition der Gangliosidbiosynthese und des Vesikeltransportes im Golgi-Apparat durch Brefeldin A reduzierte das Adhäsionspotential der HL-60 Zellen gegenüber CHO-E Zellen um 42,7% und für HUVEC um 70,7%. Die Blockierung der Biosynthese von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden der HL-60 Glykoproteine durch Tunicamycin verursachte bezüglich der Adhäsion auf CHO-E Zellen keine Reduktion; die Adhäsion auf HUVEC wurde hingegen zu 42,1% inhibiert.

Die Blockierung der HL-60 Oberflächenantigene durch CSLEX-Antikörper führte zu einer um 50,4% bzw. 54,6% reduzierten Zellzahl im statischen HL-60/CHO-E-Adhäsionsmodell bzw. HUVEC-Adhäsionsmodell. Die Bindung der HL-60 Oberflächenantigene mit E-Selektin-IgG resultierte bei CHO-E Zellen und HUVEC jeweils in einer um 78,3% und 64,7% verminderten Anzahl an adhärirenden HL-60 Zellen. Die Blockierung des E-Selektins auf HUVEC mit anti-E-Selektin-Antikörpern reduzierte die Bindungszellzahl um 49,2%.

Bei der Zugabe von Gangliosiden in micellärer Form mit einer Konzentration von 200 µg/mL konnte nur die Fraktion JM07/7-3 aus Granulocyten eine Inhibition der Zell-Zell-Adhäsion hervorrufen. Diese verringerte das Adhäsionspotential von HL-60 Zellen gegenüber CHO-E Zellen um 18,9% und gegenüber HUVEC um 72,5%. In Liposomen in-seriert wirkten die Fraktionen JM07/7-1, JM07/7-3, JM07/7-3S und JM07/7-4 nach Inkubation der CHO-E Zellen in einer Konzentration von 200 µg/mL zu 23,3%, 8,7%, 8,1% und 32,9% inhibierend. An Albumin bzw. HDL adsorbiert verringerte die Fraktion JM07/7-4 die Bindungszellzahl an CHO-E-Layer erst bei einem Konzentrationsbereich von ca. 600-800 µg/mL um 32,1% bzw. 17,8%. Hirnganglioside inhibierten die Zell-Zell-Adhäsion nicht.

HL-60 Adhäsion im dynamischen System

Bei hypo-physiologischer Wandschubspannung von $0,15 \cdot 10^{-5}$ N/cm² genügte bereits die Inkubation der CHO-E Zellen mit einer micellären Konzentration von 5 µg/mL der Fraktionen JM07/7-1, JM07/7-3 bzw. JM07/7-4 um 76,5%, 80,8% bzw. 95,8% der sonst fest bindenden HL-60-Zellen an einer statischen Adhäsion zu hindern. Umgekehrt erhöhten Konzentrationen von 25 und 100 µg/mL der Fraktion JM07/7-3S die Anzahl adhärirender Zellen um 122,9% bzw. 137,6%. Dieser Effekt war E-Selektin-vermittelt. Auf HUVEC-Layern wurde die Anzahl der gebundenen HL-60 Zellen bei Inkubation mit den Fraktionen JM07/7-1, JM07/7-3 bzw. JM07/7-4 in einer micellären Konzentration von 5 µg/mL um 78,5%, 38,1% bzw. 71,0% vermindert. Die in gleicher Konzentration applizierte Fraktion JM07/7-3S erhöhte hingegen die Anzahl um 79,5%. Hirnganglioside der Fraktion JM08/68-2 reduzierten bei einer Konzentration von 100 µg/mL nicht die Adhäsionsfähigkeit der HL-60 Zellen gegenüber HUVEC.

Bei physiologischer Wandschubspannung von $1,0 \cdot 10^{-5}$ N/cm² adhärirten im Vergleich zur hypo-physiologischen Wandschubspannung generell 19,1% weniger HL-60 Zellen statisch

auf den CHO-E-Layern und 69,2% weniger auf den HUVEC-Layern. Die Gangliosidfraktionen JM07/7-1, JM07/7-3 bzw. JM07/7-4 verminderten die HL-60 Bindungszahlen gegenüber CHO-E Zellen bei einer micellären Konzentration von 5 µg/mL um 70,4%, 90,7% bzw. 84,6%. Eine deutliche Abnahme der HL-60 Adhäsion trat mit diesen Fraktionen bei Inkubation von HUVEC-Layern erst bei Konzentrationen von 100 µg/mL auf. Dabei verminderte sich deren Anzahl um 97,5%, 106,7% bzw. 84,0%. Im Gegensatz dazu verursachte die Fraktion JM07/7-3S bei einer Konzentration von 100 µg/mL auf CHO-E-Layern 249,2% mehr und die Fraktion JM07/7-4S auf HUVEC-Layern 182,4% mehr statische Adhäsionen.

5 Fazit und Ausblick

Die sLe^x-Ganglioside von humanen Granulocyten fungieren als Liganden für E-Selektin und vermitteln Zell-Zell-Adhäsionen sowohl im statischen als auch im dynamischen System. Terminale Sialylierung und subterminale Fucosylierung sind essentiell für die Bindung. Die Adhäsion der HL-60 Zellen an CHO-E Zellen wird durch die Wechselwirkung des sialylierten und fucosylierten Kohlenhydratanteils der HL-60-Neolactoganglioside mit dem E-Selektin-Protein der CHO-E Zellen verursacht. Zusätzlich zu dieser Wechselwirkung wird die Adhäsion von HL-60 Zellen an HUVEC nach IL-1β-induzierter E-Selektin-Expression durch N-glykosylierte HL-60 Proteine unterstützt. Auf endothelialer Seite muß ein IL-1β-induzierbarer, transient exprimierter E-Selektin-differenter Rezeptor bzw. Ligand für HL-60 Liganden bzw. Rezeptoren vorhanden sein. Außerdem besitzen Granulocyten Ganglioside, die vermutlich mit L-Selektin wechselwirken. Diese Ganglioside sind *in vivo* vermutlich für die Sekundäradhäsion (engl.: secondary tethering) von Granulocyten auf bereits adhärennten Granulocyten verantwortlich.

Zur weiteren Charakterisierung der Granulocytenganglioside bezüglich ihrer Funktion als Liganden für das E-Selektin bei der Zell-Zell-Adhäsion sollten die einzelnen sLe^x-Ganglioside aus den Mischfraktionen isoliert und diese auf ihre inhibitorische Wirksamkeit überprüft werden. Zusätzlich könnten Bindungsstudien mit L-Selektin-IgG-Proteinen unter Verwendung des HPTLC-Overlays bzw. zelluläre Adhäsionsexperimente mit L-Selektin-transfizierten CHO-Zellen und IL-1β-induzierten HUVEC weiteren Aufschluß über den Beitrag des L-Selektins zur inflammatorischen Zell-Zell-Adhäsion liefern. Ergänzend wäre die Untersuchung der Gangliosid- bzw. Glykoprotein-Komposition von IL-1β-induzierten HUVEC sinnvoll.

Solche Untersuchungen hätten möglicherweise einen Nutzen für die Entwicklung anti-inflammatorisch wirkender Pharmazeutika. Humane Granulocytenganglioside könnten die Adhäsion von Granulocyten an das Endothel bei Patienten mit akuter bzw. chronischer Arthritis hemmen. Denkbar wäre ebenfalls nach Prüfung der Immunogenität die Anwendung von Granulocyten-identischen HL-60 Gangliosiden. Die HL-60 Zellen könnten bio-

technologisch produziert und die relevanten Ganglioside der Neolacto-Serie isoliert werden. Zuvor müßten jedoch tierexperimentelle Untersuchungen die Wirksamkeit *in vivo* belegen. Die inhibitorische Wirkung könnte sich im Vergleich zum *in vitro*-Modell verringern, da zumindest eine P-Selektin-Wechselwirkung mit Granulocytenantigenen zusätzlich zu den E-Selektin- und Integrin-Bindungsmechanismen auftreten sollte. Wird das *in vitro*-Modell rechnerisch auf das Blutvolumen eines Menschen übertragen, so müßten bei 5 L Blutvolumen ca. 500 mg Ganglioside intravenös appliziert werden, um die Granulocytenadhäsion zu verhindern. Lokale Injektionen könnten möglicherweise geringere Mengen erlauben. Ungeklärt wäre dabei die Pharmakokinetik. Wenn eine solche Methode wirksam wäre, könnten möglicherweise auch Patienten mit Herzinfarkten bzw. Schlaganfällen, bei denen nach Ischämie eine E-Selektin-vermittelte Granulocyteninvasion auftritt, präventiv behandelt werden. Eine weitere Anwendung wäre die Applizierung von Adhäsions-vermittelnden sLe^x-Gangliosiden bei schweren Infektionen, wodurch möglicherweise mehr Granulocyten zum Ort der Entzündung gelangen könnten und die Infektion schneller abgewehrt werden würde.

Literaturverzeichnis

- Abe, A., Inokuchi, J., Jimbo, M., Shimeno, H., Nagamatsu, A., Shayman, J.A., Shukla, G.S., and Radin, N.S. (1991)
Improved inhibitors of glucosylceramide synthase.
J. Biochem. **111**: 191-196.
- Abe, A., Radin, N.S., and Shayman, J.A. (1996)
Induction of glucosylceramide synthase inhibitors and ceramide.
Biochim. Biophys. Acta **1299**: 333-341.
- Adamson, P., Tighe, M., and Pearson, J.D. (1996)
Protein tyrosine kinase inhibitors act downstream of IL-1alpha and LPS stimulated MAP-kinase phosphorylation to inhibit expression of E-selectin on human umbilical vein endothelial cells.
Cell Adhes. Commun. **3**: 511-525.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson J.D. (1990)
Molekularbiologie der Zelle.
VCH, Weinheim, 2. Auflage.
- Alon, R., Feizi, T., Yuen, C.-T., Fuhlbrigge, R.C., and Springer, T.A. (1995)
Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions.
J. Immunol. **154**: 5356-5366.
- Amit, A.G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E.V., and Poljak, R.J. (1986)
Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution.
Science **233**: 747-753.
- Andersson, L.C., Nilsson, K., and Gahmberg, C.G. (1979)
K562 – a human erythroleukemia cell line.
Int. J. Cancer **23**: 143-147.
- Ando, S., Isobe, M., and Nagai, Y. (1976)
High performance preparative column chromatography of lipids using a new porous silica, Iatrobeads.
Biochim. Biophys. Acta **424**: 98-105.
- von Andrian, U.H., Chambers, J.D., McEvoy, L.M., Bargatze, R.B., Arfors, K.E., and Butcher, E.C. (1991)
Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β_2 integrins in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 7538-7542.

- Asa, D., Raycroft, L., Ma, L., Aeed, P.A., Kaytes, P.S., Elhammer, A.P., and Geng, J.G. (1995)
The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins.
J. Biol. Chem. **270**: 11662-11670.
- Ashwood-Smith, M.J. and Friedman, G.B. (1979)
Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196°C in dimethyl sulfoxide.
Cryobiol. **16**: 132-140.
- Atkins, K., Berry, J.E., Zhang, W.Z., Harris, J.F., Chambers, A.F., Simpson, R.U., and Somerman, M.J. (1998)
Coordinate expression of OPN and associated receptors during monocyte/macrophage differentiation of HL-60 cells.
J. Cell. Physiol. **175**: 229-237.
- Bargatze, R.F., Jutila, M.A., and Butcher, E.C. (1995)
Distinct roles of L-selectin and integrins $\alpha_4\beta_7$ and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined.
Immunity **3**: 99-108.
- Barman, T.E. (1969)
Enzyme Handbook Vol. II.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Baumhueter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S. Renz, M., Rosen, S.D., and Lasky, L.A. (1993)
Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34.
Science **262**: 436-438.
- Becker-André, M., van Huijsduijnen, R.H., Losberger, C., Whelan, J., and Delamarter, J.F. (1992)
Murine endothelial leukocyte-adhesion molecule 1 is a close structural and functional homologue of the human protein.
Eur. J. Biochem. **206**: 401-411.
- Bella, J., Kolatkar, P.R., Marlor, C.W., Greve, J.M., and Rossmann, M.G. (1999)
The structure of the two amino-terminal domains of human intercellular adhesion molecule-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor.
Virus Res. **62**:107-117.
- Berg, E.L., McEvoy, L.M., Berlin, C., Bargatze, R.F., and Butcher, E.C. (1993)
L-selectin mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1.
Nature **366**: 695-698.
- Berg, E.L., Robinson, M.K., Mannson, O., Butcher, E.C., and Magnani, J.L. (1991)
A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(x) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1.
J. Biol. Chem. **266**: 14869-14872.

Berlin, C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von Andrian, U.H., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L., and Butcher, E.C. (1995)

$\alpha 4$ Integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow.

Cell **80**: 413-422.

Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., and Butcher, E.C. (1993)

$\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1.

Cell **74**: 185-195.

Bevilaqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, Jr., M.A., and Seed, B. (1989)

Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins.

Science **243**: 1160-1165.

Birnie, G.D. (1988)

The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation.

Br. J. Cancer **58**: 41-45.

Bochner, B.S., Luscinskas, F.W., Gimbrone, M.A. jr., Newman, W., Sterbinsky, S.A., Derse-Anthony, C.P., Klunk, D., and Schleimer, R.P. (1991)

Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules.

J. Exp. Med. **173**: 1553-1557.

Bohnsack, J.F., and Chang, J. (1994)

Activation of beta 1 integrin fibronectin receptors on HL60 cells after granulocytic differentiation.

Blood **83**: 543-552.

Bowler, K., and Fuller, J. (1987)

Temperature and animal cells.

Symposia of the society for experimental biology.

The Company of Biologists Limited, Cambridge.

Boyd, A.W., and Metcalf, D. (1984)

Induction of differentiation in HL60 leukemic cells: A cell cycle dependent all-or-none event.

Leuk. Res. **8**: 27-43.

Brackman D., Lund-Johansen, F., and Aarskog, D. (1995)

Expression of leukocyte differentiation antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3: comparison with the maturation of normal monocytic and granulocytic bone marrow cells.

J. Leukoc. Biol. **58**: 547-555.

- Bronzino, J.D. (1995)
The biomedical engineering handbook.
CRC Press.
- Brown, D.A., and London, E. (1998)
Functions of lipid rafts in biological membranes.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **14**: 111-136.
- Brown, D.A., and London, E. (2000)
Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts.
J. Biol. Chem. **275**: 17221-17224.
- Buckley, R.H. (1993)
Primary immunodeficiency diseases.
In: *Fundamental Immunology*; 3rd ed., 1353-1374, edited by: Paul, W.E.
Raven Press, New York.
- Büntemeyer, H. (1988)
Entwicklung eines Perfusionssystems zur kontinuierlichen Kultivierung tierischer Zellen in Suspension.
Dissertation, Universität Hannover.
- Burg, M., and Müthing, J. (2001)
Characterization of cytosolic sialidase from Chinese hamster ovary cells. Part I. Cloning and expression of soluble sialidase in Escherichia coli.
Carbohydr. Res. **330**: 335-346.
- Casasnovas, J.M., Springer, T.A., Liu, J.H., Harrison, S.C., and Wang J.H. (1997)
Crystal structure of ICAM-2 reveals a distinctive integrin recognition surface.
Nature **387**: 312-315.
- Chan, P.Y., and Aruffo, A. (1993)
VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin.
J. Biol. Chem. **268**: 24655-24664.
- Chandrasekaran, E.V., Jain, R.K., Larsen, R.D., Wlasichuk, K., DiCioccio, R.A., and Matta, K.L. (1996)
Specificity analysis of three clonal α 1,3-L-fucosyltransferases with sulfated, sialylated, or fucosylated synthetic carbohydrates as acceptors in relation to the assembly of 3'-sialyl-6'-sulfo Lewis x (the L-selectin ligand) and related complex structures.
Biochemistry **35**: 8925-8933.
- Chmiel, H. (1991)
Bioprozeßtechnik I.
UTB, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E. (1977)
Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.
Nature **270**: 347-349.
- Collins, S.J. (1987)
The HL60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression.
Blood **70**: 1233-1244.
- Crocker, P.R., and Feizi, T. (1996)
Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions.
Curr. Opin. Struct. Biol. **6** (5): 679-691.
- Dalla-Favera, R., Wong-Staal, F., and Gallo, R.C. (1982)
Onc-gene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient.
Nature **299**: 61-63.
- Dautry-Varsat, A., and Lodisch, H.F. (1984)
How receptors bring proteins and particles into cells.
Scient. Am. **250**: 48-54.
- Davenpeck, K.L., Brummet, M.E., Hudson, S.A., Mayer, R.J., and Bochner, B.S. (2000)
Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin in vitro.
J. Immunol. **65**: 2764-2772.
- Delia, D., Lampugnani, M.G., Resnati, M., Dejana, E., Aiello, A., Fontanella, E., Soligo, D., Pierotti, M.A., and Greaves, M.F. (1993)
CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro.
Blood **81**: 1001-1008.
- Diamond, M.S., and Springer, T.A. (1993)
A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen.
J. Cell Biol. **120**: 545-556.
- Dietrich, C., Bagatolli, L.A., Volovyk, Z.N., Thompson, N.L., Levi, M., Jacobson, K., and Gratton, E. (2001)
Lipid rafts reconstituted in model membranes.
Biophys. J. **80**: 1417-1428.
- Donti, E., Lanfrancone, L., Pelicci, P.-G., Birnie, G.D., and Dalla-Favera, R. (1991)
Loss of amplification and appearance of a novel translocation site of the c-myc oncogene in HL-60 leukemia cells.
Cancer Genet. Cytogenet. **56**: 57-64.

- Duvar, S. (1996)
Isolierung und strukturelle Charakterisierung der Glykosphingolipide von Endothelzellen aus Microcarrier-Bioreaktorkulturen.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Duvar, S., Müthing, J., Mohr, H., and Lehmann, J. (1996 b)
Scale up cultivation of primary human umbilical vein endothelial cells on microcarriers from spinner vessels to bioreactor fermentation.
Cytotechnology **21**: 61-72.
- van Echten, G., and Sandhoff, K. (1993)
Ganglioside metabolism.
J. Biol. Chem. **268**: 5341-5344.
- van Eeden, S.F., Bicknell, S., Walker, B.A., and Hogg, J.C. (1997)
Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation.
Am. J. Physiol. **272**: H401-408.
- Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyi, S., Hemler, M.E., and Lobb, R.R. (1990)
VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site.
Cell **60**: 577-584.
- Feizi, T. (2001)
Carbohydrate ligands for the leukocyte-endothelium adhesion molecules, selectins. Results and problems in cell differentiation.
In.: *Mammalian carbohydrate recognition system*; Vol. 33, edited by: Crocker, P.R.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- Folch, J.L.M., Lees, M., and Sloane-Stanley, G.H. (1957)
A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem. **226**: 497-509.
- Friedl, P., Tatje, D., and Czapla, R. (1989)
An optimized culture medium for human vascular endothelial cells from umbilical cord veins.
Cytotechnology **2**: 171-179.
- Friedrichson, T., and Kurzchalia, T.V. (1998)
Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking.
Nature **394**: 802-805.
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., and Ikehara, Y. (1988)
Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum.
J. Biol. Chem. **263**: 18545-18552.

- Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P.I., Wakisaka, A., Togashi, H., Chia, D., Suyama, N., Fukushi, Y., Nudelman, E., and Hakomori, S. (1984)
Characterization of sialosylated Lewis^x as a new tumor-associated antigen.
Cancer Research **44**: 5279-5285.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979)
Characterisation of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.
Blood **54**: 713-733.
- Gege, C., Vogel, J., Bendas, G., Rothe, U., and Schmidt, R.R. (2000)
Synthesis of the sialyl Lewis x epitope attached to glycolipids with different core structures and their selectin-binding characteristics in a dynamic test system.
Chem. Eur. J. **6**: 111-122.
- Gemsa, D., Kalden, J.R., and Resch, K. (1991)
Immunologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage.
- Gillard, B.K., Thurmon, L.T., and Marcus, D.M. (1993)
Variable subcellular localization of glycosphingolipids.
Glycobiology **3**: 57-67.
- Gimbrone, Jr., M.A., Cotran, R.S., and Folkman, J. (1974)
Human vascular endothelial cells in culture: growth and DNA synthesis.
J. Cell. Biol. **60**: 673-682.
- Goetz, D.J., Greif, D.M., Ding, H., Camphausen, R.T., Howes, S., Comess, K.M., Snapp, K.R., Kansas, G.S., and Luscinskas, F.W. (1997)
Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1. Dynamic adhesion to P- and E-selectin.
J. Cell Biol. **137**: 509-519.
- Gotsch, U., Jäger, U., Dominis, M., and Vestweber, D. (1994)
Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF- α in vivo.
Cell Adh. Commun. **2**: 15-26.
- Groß, W., Ring, K., und Lodemann, E. (1989)
Physiologische Chemie.
VCH, Weinheim.
- Hahne, M., Jäger, U., Isenmann, S., Hallmann, R., and Vestweber, D. (1993)
Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes.
J. Cell Biol. **121**: 655-664.
- Hakomori, S. (1986)
Glykosphingolipide.
Spektrum der Wissenschaft (Juli): 90-100.

- Hakomori, S. (1990)
Bifunctional role of glycolipids.
J. Biol. Chem. **265**: 18713-18716.
- Hakomori, S. (1993)
Structure and function of sphingoglycolipids in transmembrane signalling and cell-cell interactions.
Biochem. Soc. Trans. **21**: 583-595.
- Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S., and Prinetti, A. (1998)
New insights in glycosphingolipid function: „glycosignaling domain“, a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling.
Glycobiology **8**: xi-xix.
- Hakomori, S. (2000)
Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain.
Glyconj. J. **17**: 143-151.
- Halle, W. (1975)
Zell- und Gewebezüchtung bei Tieren.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Handa, K., Stroud, M.R., and Hakomori, S. (1997)
Sialosyl-fucosyl poly-LacNAc without the sialosyl-Le^x epitope as the physiological myeloid cell ligand in E-selectin-dependent adhesion: studies under static and dynamic flow conditions.
Biochemistry **36**: 12412-12420.
- Handa, K., Withers, D.A., and Hakomori, S. (1998)
The α -3 fucosylation at the penultimate GlcNAc catalyzed by fucosyltransferase VII is blocked by internally fucosylated residue in sialosyl long-chain poly-LacNAc: Enzymatic basis for expression of physiological E-selectin epitope.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **243**: 199-204.
- Hanna, N., Kloetzer, W., and Poste (1997)
Inflammation.
Encyclopedia of Human Biology, Vol. 5, 2nd Ed., Academic Press.
- Harari, O.A., McHale, J.F., Marshall, D., Ahmed, S., Brown, D., Askenase, P.W., and Haskard, D.O. (1999)
Endothelial cell E- and P-selectin up-regulation in murine contact sensitivity is prolonged by distinct mechanisms occurring in sequence.
J. Immunol. **163**: 6860-6866.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998)
Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components.
J. Cell Biol. **141**: 929-942.

- Heidemann, R., Riese, U., Lütkemeyer, D., Büntemeyer, H., and Lehmann, J. (1993)
The Super-Spinner – A new system for the mass cultivation of mammalian cells in the CO₂ incubator.
Eur. J. Cell Biol. **37**: 105.
- Heidemann, R. (1995)
Bestimmung und Anwendung zellspezifischer Parameter für die Kultivierung tierischer Zellen in Bioreaktoren.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Heitmann, D., Lissel, M., Kempken, R., and Müthing, J. (1996)
Replacement of chloroform throughout glycosphingolipid isolation.
Biomed. Chromatogr. **10**: 245-250.
- Heitmann, D. (1998)
Immunmodulation durch das Gangliosid GM3 und seine Derivate: Untersuchungen zu Struktur-Funktion-Beziehungen.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Heitmann, D., Ziehr, H., and Müthing, J. (1998 b)
Large scale purification of gangliosides GM3(Neu5Ac) and GM3(Neu5Gc) by TMAE-fractogel high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. **710**: 1-8.
- Heukeshoven, J., and Dernick, R. (1988)
Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit: I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels.
Electrophoresis **9**: 28-32.
- Hinghofer-Szalkay, H. (1994)
Praktische Physiologie.
Blackwell Wissenschaft, Berlin, 3. Auflage.
- Hoessli, D.C., Ilangumaran, S., Soltermann, A., Robinson, P.J., Borisch, B., and Din, N.U. (2000)
Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: The concept of signaling platform.
Glycoconjugate J. **17**: 191-197.
- Huang, M.C., Zöllner, O., Moll, T., Maly, P., Thall, A.D., Lowe, J.B., and Vestweber, D. (2000)
P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1 are differentially modified by fucosyltransferases Fuc-TIV and Fuc-TVII in mouse neutrophils.
J. Biol. Chem. **275**: 31353-31360.
- Ichikawa, S., and Hirabayashi, Y. (1998)
Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis.
Trends Cell Biol. **8**: 198-202.

- Ipsen, J.H., Karlström, G., Mouritsen, O.G., Wennerström, H., and Zuckerman, M.J. (1987)
Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system.
Biochim. Biophys. Acta **905**: 162-172.
- Imhof, B.A., and Dunon, D. (1995)
Leukocyte migration and adhesion.
Adv. Immunol. **58**: 345-416.
- Isobe, M., Emanuel, B.S., Givol, D., Oren, M., and Croce, C.M. (1986)
Localization of the gene for human p53 tumor antigen to band 17p13.
Nature **320**: 84-85.
- Ito, M., and Yamagata, T. (1989)
Endoglycoceramidase from Rhodococcus species G-74-2.
Methods Enzymol. **179**: 488-496.
- Iwabuchi, K., Zhang, Y., Handa, K., Withers, D.A., Sinay, P., Hakomori, S. (2000)
Reconstruction of membranes simulating „glycosignaling domain“ and their susceptibility to lyso-GM3.
J. Biol. Chem. **275**: 15174-15181.
- Iwamori, M., and Nagai, Y. (1978)
A new chromatographic approach to the resolution of individual gangliosides.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **528**: 257-267.
- Janeway, C.A., Travers, P., Hunt, S., and Walport, M. (1997)
Immunologie.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage.
- Jones, W.M., Watts, G.M., Robinson, M.K., Vestweber, D., and Jutila, M. (1997)
Comparison of E-selectin-binding glycoprotein ligands on human lymphocytes, neutrophils, and bovine gamma delta T cells.
J. Immunol. **159**: 3574-3583.
- Jones, S.P., Trocha, S.D., Strange, M.B., Granger, D.N., Kevil, C.G., Bullard, D.C., and Lefer, D.J. (2000)
Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury.
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **279**: H2196-2201.
- Jutila, M.A., Rott, L., Berg, E.L., and Butcher, E.C. (1989)
Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1.
J. Immunol. **143**: 3318-3324.
- Kanfer, J.N., and Spielvogel, C. (1973)
On the loss of gangliosides by dialysis.
J. Neurochem. **20**: 1483-1485.

- Kannagi, R. (1997)
Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer.
Glycoconjugate J. **14**: 577-584.
- Kao, F.T., and Puck, T.T. (1967)
Genetics of somatic mammalian cells. IV. Properties of Chinese hamster cell mutants with respect to the requirement for proline.
Genetics **55**: 513-524.
- Karin, M., and Mintz, B. (1981)
Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells.
J. Biol. Chem. **256**: 3245-3252.
- Kasahara, K., and Sanai, Y. (1999)
Possible roles of glycosphingolipids in lipid rafts.
Biophys. Chem. **82**: 121-127.
- Kasahara, K., and Sanai, Y. (2001)
Functional roles of glycosphingolipids in signal transduction via lipid rafts.
Glycoconjugate J. **17**: 153-162.
- Keller, R. (1994)
Immunologie und Immunpathologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage.
- Kemminer, S.E. (2001)
Auswirkungen der Kulturbedingungen auf die Produktion, Glykosylierung und Funktion des monoklonalen Maus-Antikörpers R₂₄.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L., and Butcher, E.C. (1989)
Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors.
Science **245**: 1238-1241.
- Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., and Butcher, E.C. (1990)
Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 2244-2248.
- Kishimoto, T.K., Warnock, R.A., Jutila, M.A., Butcher, E.C., Lane, C., Anderson, D.C., and Smith, C.W. (1991)
Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro.
Blood **78**: 805-811.

- Kitayama, J., Tsuno, N., Sunami, E., Osada, T., Muto, T., and Nagawa, H. (2000)
E-selectin can mediate the arrest type of adhesion of colon cancer cells under physiological shear flow.
Eur. J. Cancer **36**: 121-127.
- Klein, J. (1991)
Immunologie.
VCH, Weinheim, 1. Auflage.
- Kobayashi, T., and Hirabayashi, Y. (2001)
Lipid membrane domains in cell surface and vacuolar systems.
Glycoconjugate J. **17**: 163-171.
- Kolter, T., Doering, T., Wilkening, G., Werth, N., and Sandhoff, K. (1999)
Recent advances in the biochemistry of glycosphingolipid metabolism.
Biochem. Soc. Trans. **27**: 409-415.
- Kuijpers, T.W., Hakkert, B.C., Hoogerwerf, M., Leeuwenberg, J.F., and Roos, D (1991)
Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation.
J. Immunol. **147**: 1369-1376.
- Kuijpers, T.W., Hoogerwerf, M., van der Laan, L.J.W., Nagel, G., van der Schoot, C.E., Grunert, F., and Roos, D. (1992)
CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells.
J. Cell Biol. **118**: 457-466.
- Lawrence, M.B., McIntire, L.V., and Eskin, S.G. (1987)
Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion.
Blood **70**: 1284-1290.
- Lawrence, M.B., Bainton, D.F., and Springer, T.A. (1994)
Neutrophil tethering to and rolling on E-selectin are separable by requirement for L-selectin.
Immunity **1**: 137-145.
- Ledeen, R.W., and Yu, R.K. (1982)
Gangliosides: structure, isolation and analysis.
Methods Enzymol. **83**: 139-191.
- Lehmann, J., Piehl, G.W., and Schulz, R. (1987)
Bubble free cell culture aeration with porous moving membranes.
In: *7th General Meeting of ESACT on Advances in Animal Cell Technology: Cell Engineering, Evaluation and Exploitation.*
Develop. Biol. Standard. **66**: 227-240.

- Leino, L., Sorvajarvi, K., Katajisto, J., Laine, M., Lilius, E.M., Pelliniemi, T.T., Rajamaki, A., Silvoniemi, P., and Nikoskelainen, J. (1997)
Febrile infection changes the expression of IgG Fc receptors and complement receptors in human neutrophils in vivo.
Clin. Exp. Immunol. **107**: 37-43.
- Lenter, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., and Vestweber, D. (1994)
Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells.
J. Cell Biol. **125**: 471-481.
- Leeuwenberg, J.F., Smeets, E.F., Neefjes, J.J., Shaffer, M.A., Cinek, T., Jeunhomme, T.M., Ahern, T.J., and Buurman, W.A. (1992)
E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro.
Immunology **77**: 543-549.
- Levinovitz, A., Mühlhoff, J., Isenmann, S., and Vestweber, D. (1993)
Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells.
J. Cell Biol. **121**: 449-459.
- 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.
- Li, F., Wilkins, P.P., Crawley, S., Weinstein, J., Cummings, R.D., and McEver, R.P. (1996)
Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin.
J. Biol. Chem. **271**: 3255-3264.
- Li, R., and Ladisch, S. (1997)
Inhibition of endogenous ganglioside synthesis does not block neurite formation by retinoic acid-treated neuroblastoma cells.
J. Biol. Chem. **272**: 1349-1354.
- Lindl, T., und Bauer, J. (1994)
Zell- und Gewebekultur.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Liu, G., and Hebert, R.L. (1999)
Advances in the signal transduction of ceramide and related sphingolipids.
Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **36**: 511-573.
- Lloyd, K.O., and Furukawa, K. (1998)
Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances.
Glycoconjugate J. **15**: 627-636.

- Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L., and Marks, R.M. (1990)
ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA.
Cell **63**: 475-484.
- Lozzio, B.B., and Lozzio, C.B. (1979)
Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line.
Leuk. Res. **3**: 363-370.
- Lozzio, B.B., Lozzio, C.B., Bamberger, E.G., and Feliu, A.S. (1981)
A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **166**: 546-550.
- Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B. (1975)
Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.
Blood **45**: 321-334.
- Lümen, R. (2001)
Isolierung und strukturelle Charakterisierung von E-Selektin-bindenden Gangliosiden aus humanen Granulocyten.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Lund-Johansen, F., and Terstappen, L.W. (1993)
Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation.
J. Leukoc. Biol. **54**: 47-55.
- Luscinskas, F.W., Brock, A.F., Arnaout, M.A., and Gimbrone, M.A. (1989)
Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1-dependent and leukocyte (CD11/CD18)-dependent mechanisms contribute to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cytokine-activated human vascular endothelium.
J. Immunol. **142**: 2257-2263.
- Ma, L., Raycroft, L., Asa, D., Anderson, D.C., and Geng, J.-G. (1994)
A sialoglycoprotein from human leukocytes functions as a ligand for P-selectin.
J. Biol. Chem. **269**: 27739-27746.
- Maccioni, H.J.F., Daniotti, J.L., and Martina, J.A. (1999)
Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus.
Biochim. Biophys. Acta **1437**: 101-118.
- MacDonald, R.C., MacDonald, R.I., Menco, B.P., Takeshita, K., Subbarao, N.K., and Hu, L.R. (1991)
Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles.
Biochim. Biophys. Acta **1061**: 297-303.

- Marcus, D. (1984)
A review of the immunogenic and immuno-modulatory properties of glycosphingolipids.
Mol. Immunol. **21**: 1083-1091.
- Marx, N., Neumann, F.J., Zohnhofer, D., Dickfeld, T., Fischer, A., Heimerl, S., Schomig, A. (1998)
Enhancement of monocyte procoagulant activity by adhesion on vascular smooth muscle cells and intercellular adhesion molecule-1-transfected chinese hamster ovary cells.
Circulation **98**: 906-911.
- Masinovsky, B., Urdal, D., and Gallatin, W.M. (1990)
IL-4 acts synergistically with IL-1 β to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1.
J. Immunol. **145**: 2886-2895.
- Mather, J.P., and Sato, G.H. (1979)
The growth of mouse melanoma cells in hormone-supplemented, serum-free medium.
Exp. Cell Res. **120**: 191-200.
- Meager, A. (1999)
Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation.
Cytokine Growth Factor Rev. **10**: 27-39.
- Mebius, R.E., Dowbenko, D., Williams, A., Fennie, C., Lasky, L.A., and Watson, S.R. (1993)
Expression of GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin, is affected by afferent lymphatic flow.
J. Immunol. **151**: 6769-6776.
- Meisel, S.R., Shapiro, H., Radnay, J., Neuman, Y., Khaskia, A.R., Gruener, N., Pauzner, H., and David, D. (1998)
Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and Mac-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction: possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging.
J. Am. Coll. Cardiol. **31**: 120-125.
- Melkonian, K.A., Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G., and Brown, D.A. (1999)
Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts.
J. Biol. Chem. **274**: 3910-3917.
- Merrill, A.H. jr., van Echten, G., Wang, E., and Sandhoff, K. (1993)
Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ.
J. Biol. Chem. **268**: 27299-27306.

- Metelmann, W., Müthing, J., and Peter-Katalinić, J. (2000)
Nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometric analysis of a ganglioside mixture from human granulocytes.
Rapid Commun. Mass Spectrom. **14**: 543-550.
- Miller, L.J., Schwarting, R., and Springer, T.A. (1986)
Regulated expression of the Mac-1, LFA-1, p150.95 glycoprotein family during leukocyte differentiation.
J. Immunol. **137**: 2891-2900.
- Miller, S.G., Carnell, L., and Moore, H.H. (1992)
Post-Golgi membrane traffic: brefeldin A inhibits export from distal Golgi compartments to the cell surface but not recycling.
J. Cell Biol. **118**: 267-283.
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G., and Ikehara, Y. (1986)
Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. **261**: 11398-11403.
- Möbius, W., Herzog, V., Sandhoff, K., and Schwarzmann, G. (1999)
Gangliosides are transported from the plasma membrane to intralysosomal membranes as revealed by immuno-electron microscopy.
Bioscience Reports **19**: 307-316.
- Moffett, S., Brown, D.A., and Linder, M.E. (2000)
Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts.
J. Biol. Chem. **275**: 2191-2198.
- Monsigny, M., Petit, C., and Roche, A.C. (1988)
Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod.
Analyt. Biochem. **175**: 525-530.
- Montgomery, K.F., Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Goff, D., Vassallo, C., Tarr, P.I., Bomsztyk, K., Lobb, R., Harlan, J.M., and Pohlman, T.H. (1991)
Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**: 6523-6527.
- Montoya, M.C., Holtmann, K., Snapp, K.R., Borges, E., Sanchez-Madrid, F., Luscinskas, F.W., Kansas, G., Vestweber, D., and Landazuri, M.O. (1999)
Memory B lymphocytes from secondary lymphoid organs interact with E-selectin through a novel glycoprotein ligand.
J. Clin. Invest. **103**: 1317-1327.
- Moore, K.L., Varki, A., and McEver, R.P. (1991)
GMP-140 binds to a glykoprotein receptor on human neutrophils: evidence for a lectin-like interaction.
J. Cell Biol. **112**: 491-499.

- Moore, K.L., and Thompson, L.F. (1992)
P-selectin (CD62) binds to subpopulations of human memory T lymphocytes and natural killer cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **186**: 173-181.
- Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., and McEver, R.P. (1992)
Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells.
J. Cell Biol. **118**: 445-456.
- Moore, K.L., Eaton, S.F., Lyons, D.E., Lichtenstein, H.S., Cummings, R.D., and McEver R.P. (1994)
The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine.
J. Biol. Chem. **269**: 23318-23327.
- Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Li, L., Johnson, D.A., Lichtenstein, H.S., Cummings, R.D., Bainton, D.F., and McEver, R.P. (1995)
P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin.
J. Cell Biol. **128**: 661-667.
- Müthing, J., Peter-Katalinić, J., Hanisch, F., and Neumann, U. (1991)
Structural studies of gangliosides from YAC-1 mouse lymphoma cell line by immunological detection and fast atom bombardment mass spectrometry.
Glycoconjugate J. **8**: 414-423.
- Müthing, J., and Neumann, U. (1993)
Selective detection of terminally alpha 2-3 and alpha 2-6 sialylated neolacto-series gangliosides by immunostaining on thin layer chromatograms.
Biomed. Chromatogr. **7**: 158-161.
- Müthing, J., and Unland, F. (1994)
Improved separation of isomeric gangliosides by anion-exchange high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. **B 658**: 39-45.
- Müthing, J., Spanbroek, R., Peter-Katalinić, J., Hanisch, F.-G., Hanski, C., Hasegawa, A., Unland, F., Lehmann, J., Tschesche, H., and Egge, H. (1996)
Isolation and structural characterization of fucosylated gangliosides with linear poly-N-acetyllactosaminyl chains from human granulocytes.
Glycobiology **6**: 147-156.
- Müthing, J., Duvar, S., Nerger, S., Büntemeyer, H., and Lehmann, J. (1996 b)
Microcarrier cultivation of bovine aortic endothelial cells in spinner vessels and a membrane stirred bioreactor.
Cytotechnology **18**: 193-206.
- Müthing, J. (1996 c)
High-resolution thin-layer chromatography of gangliosides.
J. Chromatogr. **A 720**: 3-25.

- Müthing, J. (1998)
TLC in structure and recognition studies of glycosphingolipids.
In: *Glycoanalysis Protocols*. Edited by E. F. Hounsell, Humana Press Inc., Totowa, NJ
Methods Mol. Biol. **76**: 183-195.
- Müthing, J., Duvar, S., Heitmann, D., Hanisch, F.G., Neumann, U., Lochnit, G., Geyer, R.,
and Peter-Katalinić, J. (1999)
*Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of in vitro propagated
human umbilical vein endothelial cells.*
Glycobiology **9**: 459-468.
- Müthing, J., and Burg, J. (2001)
*Characterization of cytosolic sialidase from Chinese hamster ovary cells. Part II. Sub-
strate specificity for gangliosides.*
Carbohydr. Res. **330**: 347-356.
- Narita, T., Kawasaki-Kimura, N., Matsuura, N., Funahashi, H., and Kannagi, R. (1996)
*Adhesion of human breast cancer cells to vascular endothelium mediated by sialyl Le-
wis &supx; /E-selectin.*
Breast Cancer **29**: 19-23.
- Norton, J., Sloane, J.P., Delia, D., and Greaves, M.F. (1993)
*Reciprocal of CD34 and cell adhesion ELAM-1 on vascular endothelium in acute cuta-
neous graft-versus-host disease.*
J. Pathol. **170**: 173-177.
- Nylander-Lundqvist, E., Back, O., and Egelrud, T. (1996)
IL-1 beta activation in human epidermis.
J. Immunol. **157**: 1699-1704.
- Ohmori, K., Kanda, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., Nishi,
T., Tamatani, T., and Kannagi, R. (2000)
*P- and E-selectins recognize sialyl 6-sulfo Lewis x the recently identified L-selectin li-
gand.*
Biochem. Biophys. Res. Commun. **278**: 90-96.
- Ostermeyer, A.G., Beckrich, B.T., Ivarson, K.A., Grove, K.E., and Brown, D.A. (1999)
*Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane
rafts in melanoma cells.*
J. Biol. Chem. **274**: 34459-34466.
- Pahlsson, P., Strindhall, J., Srinivas, U., and Lundblad, A. (1995)
Role of N-linked glycosylation in expression of E-selectin on human endothelial cells.
Eur. J. Immunol. **25**: 2452-2459.
- Parekh, R., and Edge, C. (1991)
Selectins and glycosylation in inflammation.
Oxford GlycoSystems, Tools for glycobiology.

- Parekh, R.B., and Edge, C.J. (1994)
Selectins – glycoprotein targets for therapeutic intervention in inflammation.
Trends Biotechnol. **12**: 339-345.
- Paul, P., Bordman, A., Rosenfelder, G., and Towbin, H. (1992)
Simultaneous determination of sugar incorporation into glycosphingolipids and glycoproteins.
Analyt. Biochem. **204**: 265-272.
- Penzlin, H. (1991)
Lehrbuch der Tierphysiologie.
Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S., and Paulson, J.C. (1990)
ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x.
Science **250**: 1130-1132.
- Picker, L.J., Warnock, R.A., Burns, A.R., Doerschuk, C.M., Berg, E.L., and Butcher, E.C. (1991)
The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140.
Cell **66**: 921-933.
- Pirt, S.J., (1985)
Principles of microbe and cell cultivation.
Blackwell Scientific Publications, London.
- Pober, J.S., and Cotran, R.S. (1990)
The role of endothelial cells in inflammation.
Transplantation **50**: 537-544.
- Pober, J.S. (1998)
Activation and injury of endothelial cells by cytokines.
Pathol. Biol. **46**: 159-163.
- Pralle, A., Keller, P., Flosin, E.-L., Simons, K. and Hörber, J.K.H. (2000)
Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells.
J. Cell Biol. **148**: 997-1007.
- Prieschl, E.E., and Baumruker, T. (2000)
Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling.
Immunol. Today **21**: 555-560.
- Prieto, J., Eklund, A., and Patarroyo, M. (1994)
Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages.
Cell. Immunol. **156**: 191-211.

- Puck, T.T. (1958)
Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.
J. Exp. Med. **108**: 945-956.
- Radsak, K., Schwarzmann, G., and Wiegandt, H. (1982)
Studies on the cell association of exogenously added sialo-glycolipids.
Z. Physiol. Chem. **363**: 263-272.
- Ramos, C.L., Kunkel, E.J., Lawrence, M.B., Jung, U., Vestweber, D., Bosse, R., McIntyre, K.W., Gillooly, K.M., Norton, C.R., Wolitzky, B.A., and Ley, K. (1997)
Differential effect of E-selectin antibodies on neutrophil rolling and recruitment to inflammatory sites.
Blood **89**: 3009-3018.
- Rampersaud, A.A., Oblinger, J.L., Ponnappan, R.K., Burry, R.W., and Yates, A.J. (1999)
Gangliosides and growth factor regulation.
Biochem. Soc. Trans. **27**: 415-422.
- Rehm, H. (1996)
Der Experimentator: Proteinbiochemie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Renkonen, R., Mattila, P., Majuri, M.-L., Rabinä, J., Toppila, S., Renkonen, J., Hirvas, L., Niittymäki, J., Turunen, J.P., Renkonen, O., and Paavonen, T. (1997)
In vitro experimental studies of sialyl Lewis x and sialyl Lewis a on endothelial and carcinoma cells: crucial glycans on selectin ligands.
Glycoconjugate J. **14**: 593-600.
- Renkonen, J., Makitie, A., Paavonen, T., and Renkonen, R. (1999)
Sialyl-Lewis(x/a)-decorated selectin ligands in head and neck tumors.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. **125**: 569-576.
- Roitt, I.M. (1993)
Leitfaden der Immunologie.
Blackwell Wissenschaft, Berlin, 4. Auflage.
- Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L., and Juliano, R. (1995)
Signal transduction by cell adhesion receptors.
Biochim. Biophys. Acta **1242**: 77-98.
- Russell, J., Epstein, C.J., Grisham, M.B., Alexander, J.S., Yeh, K.Y., Granger, D.N. (2000)
Regulation of E-selectin expression in postischemic intestinal microvasculature.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **278**: G878-885.
- Sackstein R., and Dimitroff, C.J. (2000)
A hematopoietic cell L-selectin ligand that is distinct from PSGL-1 and displays N-glycan-dependent binding activity.
Blood **96**: 2765-2774.

- Sako, D., Chang, X.-J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., Cumming, D.A., and Larsen, G.R. (1993)
Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin.
Cell **75**: 1179-1186.
- Sandhoff, K., and Klein, A. (1994)
Intracellular trafficking of glycosphingolipids: role of sphingolipid activator proteins in the topology of endocytosis and lysosomal digestion.
FEBS letters **346**: 103-107.
- Sandhoff, K., and Kolter, T. (1998)
Processing of sphingolipid activator proteins and the topology of lysosomal digestion.
Acta Biochim. Pol. **45**: 373-384.
- Sandhoff, K., Kolter, T., and van Echten-Deckert, G. (1998)
Sphingolipid metabolism. Sphingoid analogs, sphingolipid activator proteins, and the pathology of the cell.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **845**: 139-151.
- Sagr, H.E., Pearl, D.K., and Yates, A.J. (1993)
A review and predictive model of ganglioside uptake by biological membranes.
J. Neurochem. **61**: 395-411.
- Schärfe, J. (1988)
Impulsflächenanalyse.
LaborPraxis **10**: 1096-1103.
- Schlossman, S.F. (1995)
Myeloid antigens. In: *Leucocyte Typing V*; edited by: Schlossman, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J.M., Kishimoto, T., Morimoto, C., Ritz, J., Shaw, S., Silverstein, R., Springer, T., Tedder, T.F., and Todd, R.
Oxford University Press.
- Schmidt, R.F., und Thews, G. (1987)
Physiologie des Menschen.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 23. Auflage.
- Schnaar, R.L. (1994)
Isolation of glycosphingolipids.
Methods Enzymol. **230**: 348-370.
- Schuette, C.G., Doering, T., Kolter, T., and Sandhoff, K. (1999)
The glycosphingolipidoses - from disease to basic principles of metabolism.
Biol. Chem. **380**: 759-766.
- Schwartz, M.A., Schaller, M.D., and Ginsberg, M.H. (1995)
Integrins: emerging paradigms of signal transduction.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **11**: 549-599.

- Schwarzmann, G., and Sandhoff, K. (1990)
Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids.
Biochemistry **29**:10865-10871.
- Schweighoffer, T., Tanaka, Y., Tidswell, M., Erle, D., Horgan, J., Luce, G.E., Lazarovits, A.I., Buck, D., and Shaw, S. (1993)
Selective expression of integrin $\alpha 4 \beta 7$ on a subset of human CD4⁺ memory T-cells with hallmarks of gut-trophism.
J. Immunol. **151**: 717-729.
- Seekamp, A., and Ward, P.A. (1993)
Ischemia-reperfusion injury.
Agents Actions Suppl. **41**: 137-152.
- Seewöster, T. (1995)
Einfluß nichtessentieller Aminosäuren auf die Transkriptionsaktivität tierischer Zellkulturen.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Sherwood, A.L., and Holmes, E.H. (1992)
Brefeldin A induced inhibition of de novo globo- and neolacto-series glycolipid core chain biosynthesis in human cells.
J. Biol. Chem. **267**: 25328-25336.
- Simon, S.I., Hu, Y., Vestweber, D., and Smith, C.W. (2000)
Neutrophil tethering on E-selectin activates $\beta 2$ integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.
J. Immunol. **164**: 4348-4358.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997)
Functional rafts in cell membranes.
Nature **387**: 569-572.
- Singbartl, K., and Ley, K. (2000)
Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin.
Crit. Care Med. **28**: 2507-2514.
- Sjogren, F., Stendahl, O., and Ljunghusen, O. (2000)
The influence of retinoic acid and retinoic acid derivatives on beta2 integrins and L-selectin expression in HL-60 cells in vitro.
Inflammation **24**: 21-32.
- Skipski, V. (1975)
Thin-layer chromatography of natural glycosphingolipids.
Methods Enzymol. **35**: 396-425.

- Snapp, K.R., Ding, H., Atkins, K., Warnke, R., Lusinkas, F.W., and Kansas, G.S. (1998)
A novel P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody recognizes an epitope within the tyrosine sulfate motif of human PSGL-1 and blocks recognition of both P- and L-selectin.
Blood **91**: 154-164.
- Somers, W.S., Tang, J., Shaw, G.D., and Camphausen, R.T. (2000)
Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1.
Cell **103**: 467-479.
- Spertini, O., Lusinkas, F.W., Kansas, G.S., Munro, J.M., Griffin, J.D., Gimbrone, M.A. jr., and Tedder, T.F. (1991)
Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion.
J. Immunol. **147**: 2565-2573.
- Springer, T., Galfré, G., Secher, D.S., and Milstein, C. (1979)
Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody.
Eur. J. Immunol. **9**: 301-306.
- Stegmaier, M., Blanks, J.E., Borges, E., and Vestweber, D. (1997)
P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of mouse bone marrow-derived mast cells on P-selectin but not efficiently on E-selectin.
Eur. J. Immunol. **27**: 1339-1345.
- Stegmaier, M., Borges, E., Berger, J., Schwarz, H., and Vestweber, D. (1997 b)
The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface.
J. Cell Science **110**: 687-694.
- Stocker, C.J., Sugars, K.L., Harari, O.A., Landis, R.C., Morley, B.J., and Haskard, D.O. (2000)
TNF- α , IL-4, and IFN- γ regulate differential expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells.
J. Immunol. **164**: 3309-3315.
- Stroud, M.R., Handa, K., Ito, K., Salyan, M.E.K., Fang, H., Lavery, S.B., Hakomori, S., Reinhold, B.B., and Reinhold, V.N. (1995)
Myelogylican, a series of E-selectin-binding polylectosaminolipids found in normal human leukocytes and myelocytic leukemia HL60 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **209**: 777-787.
- Stroud, M.R., Handa, K., Salyan, M.E.K., Ito, K., Lavery, S.B., Hakomori, S., Reinhold, B.B., and Reinhold, V.N. (1996 a)
Monosialogangliosides of human myelogenous leukemia HL60 cells and normal human leukocytes. 1. Separation of E-selectin binding from nonbinding gangliosides, and absence of sialosyl-Le^x having tetraosyl to octaosyl cores.
Biochemistry **35**: 758-769.

- Stroud, M.R., Handa, K., Salyan, M.E.K., Ito, K., Levery, S.B., Hakomori, S., Reinhold, B.B., and Reinhold, V.N. (1996 b)
Monosialogangliosides of human myelogenous leukemia HL60 cells and normal human leukocytes. 2. Characterization of E-selectin binding fractions and structural requirements for physiological binding to E-selectin.
Biochemistry **35**: 770-778.
- Stroud, M.R., and Holmes, E.H. (1997)
Fucosylation of complex glycosphingolipids by recombinant fucosyltransferase-VII.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **238**: 165-168.
- Stryer, L. (1990)
Biochemie.
Spektrum der Wissenschaft, 5. Auflage.
- Stults, C.L.M., Sweely, C.C., and Macher, B.A. (1989)
Glycosphingolipids: Structure, biological source, and properties.
Methods Enzymol. **179**: 167-214.
- Svennerholm, L. (1956)
The quantitative estimation of cerebroside in nervous tissue.
J. Neurochem. **1**: 42-53.
- Svennerholm, L. (1963)
Chromatographic separation of human brain gangliosides.
J. Neurochem. **10**: 613-623.
- Swerlick, R.A., Lee, K.H., Li, L.J., Sepp, N.T., Caughman, S.W., and Lawley, T.J. (1992)
Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells.
J. Immunol. **149**: 698-705.
- Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, A., Zenita, K., Hasegawa, A., and Kannagi, R. (1991)
Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **179**: 713-719.
- Takano, K., Kaganoi, J., Yamamoto, K., Takahashi, A., Kido, T., and Sasada, M. (2000)
Rapid and prominent up-regulation of high-affinity receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI) by cross-linking of beta 2 integrins on polymorphonuclear leukocytes.
Int. J. Hematol. **72**: 48-54.
- Taki, T., Ishikawa, D., Ogura, M., Nakajima, M., and Handa, S. (1997)
Ganglioside GD1 alpha functions in the adhesion of metastatic tumor cells to endothelial cells of the target tissue.
Cancer Research **57**: 1882-1888.

- Tamaru, M., and Narumi, S. (1999)
E-selectin gene expression is induced synergistically with coexistence of activated classic protein kinase C and signals elicited by interleukin-1beta but not tumor necrosis factor-alpha.
J. Biol. Chem. **274**: 3753-3763.
- Tangemann, K., Bistrup, A., Hemmerich, S., and Rosen, S.D. (1999)
Sulfation of a high endothelial venule-expressed ligand for L-selectin. Effects on tethering and rolling of lymphocytes.
J. Exp. Med. **190**: 935-942.
- Terada, M., Epner, E., and Nudel, V. (1978)
Induction of murine erythroleukemia differentiation by Actinomycin D.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 2795-2799.
- Terstappen, L.W., Buescher, S., Nguyen, M., and Reading, C. (1992)
Differentiation and maturation of growth factor expanded human hematopoietic progenitors assessed by multidimensional flow cytometry.
Leukemia **6**: 1001-1010.
- Thakor, P., Goelz, S.E., Lobb, R.R., and Parekh, R.B. (1994)
Isolation and characterization of natural protein-associated carbohydrate ligands for E-selectin.
Biochemistry **33**: 14815-14824.
- Thiemeyer, M., Swiedler, S.J., Ishihara, M., Moreland, M., Schweingruber, H., Hirtzer, P., and Brandley, B.K. (1991)
Carbohydrate ligands for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 1138-1142.
- Thorstensen, K., and Romslo, I. (1990)
The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake.
Biochem. J. **271**: 1-10.
- Tominaga, Y., Kita, Y., Satoh, A., Asai, S., Kato, K., Ishikawa, K., Horiuchi, T., and Takashi, T. (1998)
Affinity and kinetic analysis of the molecular interaction of ICAM-1 and leukocyte function-associated antigen-1.
J. Immunol. **161**: 4016-4022.
- Tomlinson, J., Wang, J.L., Barsky, S.H., Lee, M.C., Bischoff, J., and Nguyen, M. (2000)
Human colon cancer cells express multiple glycoprotein ligands for E-selectin.
Int. J. Oncol. **16**: 347-353.
- Trayner, I.D., Bustorff, T., Etches, A.E., Mufti, G.J., Foss, Y., and Farzaneh, F. (1998)
Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, alpha1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate.
Leuk. Res. **22**: 537-547.

- Truckenbrodt, E. (1996)
*Fluidmechanik, Band 1, Grundlagen und elementare Strömungsvorgänge dichtebe-
ständiger Fluide.*
Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage.
- Tsiftoglou, A.S., and Robinson, S.H. (1985)
*Differentiation of leukemic cell lines: A review focussing on murine erythroleukemia
and human HL-60 cells.*
Int. J. Cell Cloning **3**: 349-366.
- Tu, L.L., Murphy, P.G., Li, X., and Tedder, T.F. (1999)
*L-selectin ligands expressed by human leukocytes are HECA-452 antibody-defined
carbohydrate epitopes preferentially displayed by P-selectin glycoprotein ligand-1.*
J. Immunol. **163**: 5070-5078.
- Tyrrell, D., James, P., Rao, N., Foxall, C., Abbas, S., Dasgupta, F., Nashed, M., Hasegawa,
A., Kiso, M., Asa, D., Kidd, J., and Brandley, B.K. (1991)
Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 10372-10376.
- Varki, A. (1994)
Selectin ligands.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**: 7390-7397.
- Varma, R., and Mayor, S. (1998)
GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface.
Nature **394**: 798-801.
- Vauck, W.R.A., und Müller, H.A. (1988)
Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik.
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 7. Auflage.
- Verkade, P., and Simons, K. (1997)
Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells.
Histochem. Cell Biol. **108**: 211-220.
- Verrier, E. (1996)
The microvascular cell and ischemia-reperfusion injury.
J. Cardiovasc. Pharmacol. **27**: S26-30.
- Vestweber, D., and Blanks, J.E. (1999)
Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands.
Physiol. Reviews **79**: 181-213.
- Vogel, J., Bendas, G., Bakowsky, U., Hummel, G., Schmidt, R.R., Kettmann, U., and Ro-
the, U. (1998)
The role of glycolipids in mediating cell adhesion: a flow chamber study.
Biochim. Biophys. Acta **1372**: 205-215.

- Wagers, A.J., Stoolman, L.M., Kannagi, R., Craig, R., and Kansas, G.S. (1997)
Expression of leukocyte fucosyltransferases regulates binding to E-selectin.
J. Immunol. **159**: 1917-1929.
- Wagers, A.J., Stoolman, L.M., Craig, R., Knibbs, R.N., and Kansas, G.S. (1998)
An sLex-deficient variant of HL60 cells exhibits high levels of adhesion to vascular selectins: further evidence that HECA-452 and CSLEX1 monoclonal antibody epitopes are not essential for high avidity binding to vascular selectins.
J. Immunol. **160**: 5122-5129.
- Walleris, C. (1996)
Kontinuierliche Ammoniumentfernung im Bioreaktor zur Akkumulation von Wachstumsinhibitoren in der tierischen Zellkultur.
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., and Seed, B. (1990)
Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Le^x determinant on myeloid and tumor cells.
Science **250**: 1132-1135.
- Wang, T.Y., and Silviu, J.R. (2000)
Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers.
Biophys. J. **79**: 1478-1489.
- Wang, T.Y., Leventis, R., and Silviu, J.R. (2000)
Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: A model for molecular partitioning into „lipid rafts“.
Biophys. J. **79**: 919-933.
- Weller, A., Isenmann, S., and Vestweber, D. (1992)
Cloning of the mouse endothelial selectins.
J. Biol. Chem. **267**: 15176-15183.
- Weninger, W., Ulfman, L.H., Cheng, G., Souchkova, N., Quackenbush, E.J., Lowe, J.B., and von Andrian, U.H. (2000)
Specialized contributions by alpha(1-3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels.
Immunity **12**: 665-676.
- Werner, A. (1997)
Gezielte Reduzierung der metabolischen Aktivität tierischer Zellkulturen in Suspensions- und Immobilisationssystemen zur kontinuierlichen Bereitstellung eines Hochzell-dichtesystems.
Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Wilson, K., und Goulding, K.H. (1991)
Methoden der Biochemie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage.

- Wolf, D., and Rotter, V. (1985)
Major deletions in the gene encoding p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL60 cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **82**: 790-794.
- Yang, J., Hirata, T., Croce, K., Merrill-Skoloff, G., Tchernychev, B., Williams, E., Flaumenhaft, R., Furie, B.C., and Furie, B. (1999)
Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration.
J. Exp. Med. **190**: 1769-1782.
- Yang, Y., Harrison, J.E., Print, C.G., Lehnert, K., Sammar, M., Lazarovits, A., and Krissansen, G.W. (1996)
Interaction of monocytoid cells with the mucosal addressin MAdCAM-1 via the integrins VLA-4 and LPAM-1.
Immunol. Cell. Biol. **74**: 383-393.
- Yao, L., Pan, J., Setiadi, H., Patel, K.D., and McEver, R.P. (1996)
Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells.
J. Exp. Med. **184**: 81-92.
- Yao, L., Setiadi, H., Xia, L., Laszik, Z., Taylor, F.B., and McEver, R.P. (1999)
Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates.
Blood **94**: 3820-3828.
- Yates, A.J., and Rampersaud, A. (1998)
Sphingolipids as receptor modulators. An overview.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **845**: 57-71.
- Yoshida, M., Uchimura, A., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1993)
Synthesis of chemically modified sialic acid-containing sialyl-Le^x ganglioside analogues recognized by the selectin family.
Glycoconjugate J. **10**: 3-15.
- Yuen, C.-T., Lawson, A.M., Chai, W., Larkin, M., Stoll, M.S., Stuart, A.C., Sullivan, F.X., Ahern, T.J., and Feizi, T. (1992)
Novel sulfated ligands for the cell adhesion molecule E-selectin revealed by the neoglycolipid technology among O-linked oligosaccharides on ovarian cystadenoma glycoprotein.
Biochemistry **31**: 9126-9131.
- Zielke, H.R., Sumbilla, C.M., Sevdalian, D.A., Hawkins, R.L., and Ozand, P.T. (1980)
Lactate: A major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts.
J. Cell. Physiol. **104**: 433-441.
- Zimmermann, G.A., McIntyre, T.M., and Prescott, S.M. (1997)
Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions.
J. Clin. Invest. **98**: 1699-1701.

Zöllner, O., and Vestweber, D. (1996)

The E-selectin ligand-1 is selectively activated in Chinese hamster ovary cells by the alpha(1,3)-fucosyltransferases IV and VII.

J. Biol. Chem. **271**: 33002-33008.

Zöllner, O., Lenter, M.C., Blanks, J.E., Borges, E., Steegmaier, M., Zerwes, H.G., and Vestweber, D. (1997)

L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin.

J. Cell Biol. **136**: 707-716.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Werner
Anschrift: An der Reegt 39, 33611 Bielefeld
Geburtsdatum und -ort: 22. März 1970 in Lemgo

Schulbildung

1976-1980 Grundsule Hohenhausen, Kalletal
1980-1989 Engelbert Kämpfer Gymnasium, Lemgo

Wehrdienst

1989-1990 Erwin Rommel Kaserne, Augustdorf
4./PzBtl 213

Auslandsaufenthalt

1991 USA

Hochschulausbildung

1991 Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, Grundstudium Biologie
1994 Vordiplom
(Genetik, Neurophysiologie)
1994-1996 Hauptstudium Biologie
(Genetik, Immunologie, Biotechnologie)
1996-1997 Diplomarbeit
„Gezielte Reduzierung der metabolischen Aktivität tierischer Zellkulturen in Suspensions- und Immobilisationssystemen zur kontinuierlichen Bereitstellung eines Hochzell dichtesystems“
Lehrstuhl Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld
1997-1998 Projekt
„Massenzellkultur von humanen Hepatocyten zur Entwicklung einer biokünstlichen Leber“
Lehrstuhl Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld

Promotion

1998-2001 Dissertation
Lehrstuhl Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld