

Institut für Ernährungswissenschaft
Justus-Liebig-Universität Giessen

**Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden
auf Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen
im Immunsystem**

Dissertation zum Erlangen des Doktorgrades im Fachbereich
"Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement"
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von
Dipl. oec. troph. Lars Bode

Giessen 2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Humanmilch-Oligosaccharide	2
1.1.1 Struktur und Variabilität	2
1.1.2 Digestion, Absorption und Ausscheidung	4
1.1.3 Postulierte biologische Effekte	9
1.2 Selektine	10
1.2.1 Molekulare Struktur der Selektine	12
1.2.2 Mechanismen zur Regulation der Selektin-Expression	14
1.2.3 Selektin-Liganden: Bindungsdeterminanten und Trägermoleküle	15
1.3 Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen im Immunsystem	22
1.3.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	22
1.3.2 Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen	31
1.3.3 Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	34
1.4 Humamilch-Oligosaccharide als Selektin-Liganden-Analoga	36
2 Zielsetzung	38

3	Methoden	39
3.1	Oligosaccharide	39
3.1.1	Isolierung der Humanmilch-Oligosaccharid-Fractionen	39
3.1.2	Charakterisierung der Oligosaccharide	44
3.2	Humane Endothelzellen	46
3.2.1	Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen	46
3.2.2	Charakterisierung der Endothelzellen	47
3.3	Humane Leukozyten und Thrombozyten	50
3.3.1	Isolierung und Charakterisierung von Monozyten und Lymphozyten	50
3.3.2	Isolierung und Charakterisierung von Granulozyten	53
3.3.3	Isolierung und Charakterisierung von Thrombozyten	55
3.4	Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	57
3.4.1	Kultivierung und Inkubation der Endothelzellen	57
3.4.2	<i>In-vitro</i> -Flussmodell	57
3.4.3	Auswertung	59
3.5	Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen	60
3.5.1	Konfokalmikroskopische Charakterisierung	60
3.5.2	Durchflusszytometrische Bestimmung	62
3.6	Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	64
3.6.1	Untersuchungen mit isolierten Thrombozyten und Granulozyten	64
3.6.2	Untersuchungen mit verdünntem Vollblut	64
4	Ergebnisse	66
4.1	Isolierung und Charakterisierung der Humanmilch-Oligosaccharide	66
4.1.1	Charakterisierung mittels HPAEC-PAD	68
4.1.2	Charakterisierung mittels Nanoelektrospray-MS	69
4.1.3	Bestimmung der Natrium-Konzentration	73
4.1.4	Bestimmung der Endotoxin-Konzentration	73
4.1.5	Berechnung der HMO-Konzentration im Blut des Säuglings	75

4.2	Untersuchung der Wirkung von Oligosacchariden auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	76
4.2.1	Charakterisierung der Endothelzellen	77
4.2.2	Charakterisierung der Monozyten	81
4.2.3	Struktur-Wirkungs-Beziehung	81
4.2.4	Dosis-Wirkungs-Beziehung	85
4.2.5	Potentielle Liganden-Analoga der sHMO-Fraktion	87
4.2.6	Einfluss auf Lymphozyten-Endothelzell-Interaktionen	90
4.2.7	Einfluss auf Granulozyten-Endothelzell-Interaktionen	92
4.2.8	Vergleich der Effekte auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	94
4.2.9	Einfluss der Endotoxin-Konzentration	96
4.3	Untersuchung der Wirkung von Oligosacchariden auf Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen	97
4.3.1	Konfokalmikroskopische Charakterisierung	97
4.3.2	Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe in ADP-stimuliertem Vollblut	99
4.3.3	Qualitative Struktur-Wirkungs-Beziehung	102
4.3.4	Zeit-Wirkungs-Beziehung	103
4.3.5	Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung	104
4.3.6	Dosis-Wirkungs-Beziehung	106
4.3.7	Einfluss der Endotoxin-Konzentration	108
4.4	Untersuchung der Wirkung von Oligosacchariden auf Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	111
4.4.1	Untersuchungen mit isolierten Thrombozyten und Granulozyten	111
4.4.2	Untersuchungen mit verdünntem Vollblut und Endothelzellen	113
5	Diskussion	117
5.1	Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	117
5.1.1	Bewertung des <i>In-vitro</i> -Systems	117
5.1.2	Struktur-Wirkungs-Beziehung	120
5.1.3	Multivalente Bindungshypothese	123
5.1.4	Potentielle Liganden-Analoga	125

5.2	Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden auf Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen	128
5.2.1	Struktur-Wirkungs-Beziehung	128
5.2.2	Zeit-Wirkungs-Beziehung	129
5.2.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung	130
5.2.4	Einfluss der HMO auf Signaltransduktionswege	131
5.3	Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	134
5.4	HMO-Konzentration in der systemischen Zirkulation	137
5.5	Mögliche (patho-)physiologische Bedeutung	139
5.5.1	Epidemiologie und Klinik der NEC	140
5.5.2	Postulierte Mechanismen in der Pathogenese der NEC	140
5.5.3	Protektive Wirkung von Humanmilch	142
5.5.4	Möglicher Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden	143
5.5.5	Interindividuelle Unterschiede	146
5.6	Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden auf weitere Lektin-vermittelte Interaktionen	148
5.6.1	Galectine	148
5.6.2	Siglecs	151
6	Zusammenfassung	154
7	Summary	156
8	Anhang	157
8.1	Material	157
8.1.1	Chemikalien	157
8.1.2	Lösungen und Puffer	158
8.1.3	Zellkulturmedien und Supplemente	161
8.1.4	Oligosaccharid-Standards	163
8.1.5	Antikörper und Kernfärbereagenz	164

8.2	Geräte	165
8.2.1	Allgemein	165
8.2.2	Isolierung und Charakterisierung der Oligosaccharide	165
8.2.3	Isolierung und Charakterisierung der Endothelzellen	166
8.2.4	Isolierung und Charakterisierung von Leukozyten und Thrombozyten	166
8.2.5	Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	166
8.2.6	Durchflusszytometrie	167
8.2.7	Konfokalmikroskopie	167
	Literaturverzeichnis	168

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Molekulare Struktur der Selektine	13
Abb. 2	Oligosaccharid-Strukturen mit Einfluss auf die E-Selektin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion	17
Abb. 3	Interaktionen zwischen P-Selektin und PSGL-1	19
Abb. 4	Oligosaccharid-Bindungsdomänen der L-Selektin-Liganden	21
Abb. 5	Selektin-Liganden	21
Abb. 6	Leukozyten-Adhäsions-Kaskade	23
Abb. 7	Leukozyten- <i>Rolling</i>	25
Abb. 8	Leukozyten-Transmigration	29
Abb. 9	Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe	33
Abb. 10	Multizelluläre Interaktionen bei der Leukozyten-Extravasation	35
Abb. 11	Ablaufschema zur Isolierung von Oligosacchariden aus Humanmilch	40
Abb. 12	Funktionsprinzip der Elutriation	51
Abb. 13	Funktionsprinzip der Durchflusskammer	58
Abb. 14	Chromatographische Isolierung von HMO	67
Abb. 15	HPAEC-PAD der neutralen und sauren HMO-Fraktion	68
Abb. 16	Massenspektrum der neutralen HMO-Fraktion	70
Abb. 17	Massenspektrum der sauren HMO-Fraktion	70
Abb. 18	HPAEC-PAD-Chromatogramme der sauren HMO-Fraktion vor und nach Affinitätschromatographie	75
Abb. 19	Charakterisierung der Endothelzellen	77
Abb. 20	Selektin-Expression nach Inkubation mit TNF- α	79
Abb. 21	Expression der Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie nach Inkubation mit TNF- α	80
Abb. 22	Charakterisierung der Monozyten	81
Abb. 23	Monozyten-Endothelzell-Adhäsion	82
Abb. 24	Einfluss der Monozyten-Lagerdauer auf die Adhäsion	83
Abb. 25	Struktur-Wirkungs-Beziehung	84
Abb. 26	Dosis-Wirkungs-Beziehung	86
Abb. 27	Strukturen der untersuchten Oligosaccharid-Standards	87
Abb. 28	Einfluss von Oligosaccharid-Standards der sHMO-Fraktion	89
Abb. 29	Charakterisierung der Lymphozyten	90
Abb. 30	Einfluss auf Lymphozyten-Endothelzell-Interaktionen	92

Abb. 31	Charakterisierung der Granulozyten	93
Abb. 32	Einfluss auf Granulozyten-Endothelzell-Interaktionen	94
Abb. 33	Vergleich der Effekte auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen	95
Abb. 34	Einfluss der Endotoxin-Konzentration auf Monozyten-Endothelzell-Interaktionen	96
Abb. 35	Konfokalmikroskopische Darstellung der Expression der Granulozyten-Adhäsionsmoleküle CD15s und CD11b	98
Abb. 36	Konfokalmikroskopische Darstellung der Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen	99
Abb. 37	Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe in Vollblut	101
Abb. 38	Qualitative Struktur-Wirkungs-Beziehung	102
Abb. 39	Zeit-Wirkungs-Beziehung	104
Abb. 40	Struktur-Wirkungs-Beziehung	105
Abb. 41	Dosis-Wirkungs-Beziehung	107
Abb. 42	Einfluss der Endotoxin-Konzentration	110
Abb. 43	CD11b-Expression auf der Oberfläche von isolierten Granulozyten	112
Abb. 44	Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe in Vollblut nach Stimulation mit ADP, TRA oder fMLP	114
Abb. 45	Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen mit Vollblut	115
Abb. 46	Adhäsion von Leukozyten aus Vollblut an aktivierte Endothelzellen	116
Abb. 47	Erklärungsansatz für einen unterschätzten Effekt auf das <i>Rolling</i>	119
Abb. 48	Vergleich der Strukturen von Sialyl-Lewis x, 3'-Sialyl-3-fucosyllactose, 3'-Sialyllactosamin und 3'-Sialyllactose	122
Abb. 49	E- und P-Selektin-vermittelte Aktivierung der Granulozyten	136
Abb. 50	Modell zur Pathogenese der NEC	145

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Grundstrukturen von Humanmilch-Oligosacchariden	3
Tab. 2	Klassifizierung tierischer Lektine	10
Tab. 3	Selektine - Synonyme und Vorkommen	12
Tab. 4	Struktur-Massen-Zuordnung für die Oligosaccharide der neutralen HMO-Fraktion	71
Tab. 5	Struktur-Massen-Zuordnung für die Oligosaccharide der sauren HMO-Fraktion	72
Tab. 6	Endotoxin-Konzentration der HMO-Fractionen vor und nach Detoxifikation	74
Tab. 7	Vorkommen und Funktionen der Galectine	149
Tab. 8	Vorkommen und Funktionen der Siglecs	152

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ADP	Adenosin-Diphosphat
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
BBM	Bürstensaummembran
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDG IIc	<i>Congenital Disorder of Glycosylation Type IIc</i>
CHO-Zellen	<i>Chinese Hamster Ovary Cells</i>
ECGS	<i>Endothelial Cells Growth Supplement</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELAM-1	<i>Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1</i>
ESI-Q-TOF-MS	Quadrupol <i>Time-of-flight</i> Massenspektrometrie mit Elektrospray Ionisierung
ESL-1	<i>E-Selectin Ligand-1</i>
FAB-MS	<i>Fast Atom Bombardment</i> Massenspektrometrie
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL-x (FL-1, FL-2, FL-3)	<i>Fluorescence signal-x</i>
FSC	<i>Forward-Scatter</i>
GlyCAM-1	<i>Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule-1</i>
GMP-140	<i>Granule Membrane Protein 140</i>
HBS	<i>HEPES-Buffered Saline</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solutions</i>
HDA	Humanes Duodenalaspirat
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethan Sulfonsäure
HEV	<i>High Endothelial Venules</i>
HMO	Humanmilch-Oligosaccharide
HPAEC-PAD	<i>High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detetcion</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>

HSA	Humanes Serumalbumin
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
LAD	<i>Leukocyte Adhesion Deficiency</i>
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAdCAM-1	<i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1</i>
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MS	Massenspektrometrie
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
nHMO	neutrale Humanmilch-Oligosaccharide
PADGEM-Protein	<i>Platelet Activation-Dependent Granule to External Membrane Protein</i>
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCLP	<i>Podocalyxin-Like-Protein</i>
PE	Phycoerythrin
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCR	<i>Short Consensus Repeats</i>
sHMO	saure Humanmilch-Oligosaccharide
SSC	<i>Side-Scatter</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>

Monosaccharide

Glc	Glucose
Gal	Galactose
Fuc	Fucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
NeuAc	N-Acetyl-Neuraminsäure, Sialinsäure

Oligosaccharide

LNT	Lacto-N-Tetraose
LNH	Lacto-N-Hexaose
LNO	Lacto-N-Octaose
LNFP	Lacto-N-Fucopentaose
Le ^x	Lewis x
Le ^y	Lewis y
sLe ^a	Sialyl-Lewis a
sLe ^x	Sialyl-Lewis x

1 Einleitung

Der Begriff Milch bezeichnet das Sekret weiblicher Säugetiere, dessen primäre Funktion in der Ernährung des Neugeborenen liegt (FOX UND MCSWEENEY 1998). Neben diesem nutritiven Aspekt erfüllt die Humanmilch mit ihren vielfältigen Inhaltsstoffen diverse andere physiologische Funktionen und unterstützt die Gesundheit des neugeborenen Menschen (RODRIGUEZ-PALMERO *et al.* 1999). An diesem Schutzsystem sind sowohl spezifische (Antikörper-abhängige) als auch unspezifische Faktoren der Humanmilch beteiligt, die gemeinsam zu einer niedrigeren Morbidität und Mortalität des gestillten Neugeborenen beitragen (VILLALPANDO UND HAMOSH 1998).

Zu den spezifischen Schutzfaktoren gehört beispielsweise das sekretorische Immunglobulin A, während Lysozym oder Lactoferrin zu den unspezifischen Faktoren gezählt werden. Daneben gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, von denen antimikrobielle Eigenschaften (Komplement-C3, Fibronektin oder Muzine), anti-inflammatorische (Prostaglandine) oder immunmodulatorische Wirkungen (Nukleotide und Zytokine) bekannt sind oder postuliert werden (RODRIGUEZ-PALMERO *et al.* 1999).

Im Gegensatz zur Milch der meisten bislang untersuchten Säugetiere enthält Humanmilch eine Vielzahl ungebundener, komplexer Oligosaccharide (Abschnitt 1.1.1), die ebenfalls zu den unspezifischen Schutzfaktoren gerechnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass Humanmilch-Oligosaccharide (HMO) im Gastrointestinaltrakt des Säuglings nahezu unverdaut bleiben, zu einem Teil über die Darmmucosa absorbiert werden und schließlich in intakter Form im Urin des gestillten Säuglings ausgeschieden werden (Abschnitt 1.1.2). Da HMO somit offenbar in der systemischen Zirkulation des Säuglings vorkommen, werden neben lokalen Effekten im Darm auch systemische Effekte der HMO postuliert (Abschnitt 1.1.3).

Ob HMO auf systemischer Ebene eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen, indem sie in Zell-Zell-Interaktionen des Immunsystems eingreifen, ist Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

1.1 Humanmilch-Oligosaccharide

In reifer Humanmilch beträgt die Oligosaccharid-Konzentration 5 bis 10 g/l (KUNZ *et al.* 1999). Damit zählen die Oligosaccharide neben Lactose, Lipiden und Proteinen zu den quantitativ bedeutendsten Komponenten der Humanmilch. Eine Reihe von Studien belegen, dass der Gesamtgehalt der Oligosaccharide im Laktationsverlauf abnimmt. Im Kolostrum wurden teilweise Oligosaccharid-Konzentrationen von bis zu 50 g/l gemessen (MONTREUIL UND MULLETT 1960, VIVERGE *et al.* 1985, VIVERGE *et al.* 1990b, COPPA *et al.* 1993, COPPA *et al.* 1999, KUNZ *et al.* 1999). Bislang konnten in der Humanmilch mehr als 130 verschiedene Oligosaccharid-Strukturen identifiziert werden. Die Zusammensetzung der Oligosaccharide weist eine erhebliche interindividuelle Variabilität auf, die teilweise genetisch determiniert ist (KUNZ 1994).

1.1.1 Struktur und Variabilität

Die biologische Funktion von Oligosacchariden hängt im Wesentlichen von ihrer Struktur ab. Diese wird determiniert durch die einzelnen Monomere sowie durch die glykosidischen Bindungen zwischen den Monomeren. Die Oligosaccharide der Humanmilch sind aus den folgenden Monomeren aufgebaut: D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal), N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc), L-Fucose (Fuc) und Sialinsäure, genauer N-Acetyl-Neuraminsäure (NeuAc). Am reduzierenden Ende der HMO findet sich in der Regel das Disaccharid Lactose (Gal β 1-4Glc). Durch die enzymatische Modifikation der Lactose mit Fucose oder N-Acetyl-Neuraminsäure entstehen kleinere Oligosaccharide wie 2'-Fucosyllactose oder 3-Fucosyllactose bzw. 3'-Sialyllactose oder 6'-Sialyllactose (EGGE *et al.* 1983, KUNZ *et al.* 1996, STAHL *et al.* 1994, FINKE *et al.* 1999).

Lacto-N-Tetraose (LNT, Typ 1 Kette, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) bzw. Lacto-N-neo-Tetraose (Typ 2 Kette, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) bilden die Grundstrukturen der komplexen Oligosaccharide, die ebenfalls Lactose am reduzierenden Ende tragen und sich lediglich durch die Art der glykosidischen Bindung zwischen der terminalen Galactose und dem subterminalen N-Acetyl-Glucosamin unterscheiden. Eine wiederholte Elongation dieser Grundstrukturen mit dem Disaccharid Lactosamin (Gal β 1-3/4GlcNAc) führt zu komplexen Oligosacchariden unterschiedlicher Kettenlängen wie Hexaosen, Octaosen, Decaosen usw. Es konnten Kettenlängen mit bis zu 15 Lactosamin-Einheiten identifiziert werden (STAHL *et al.* 1994, FINKE *et al.* 1999). Einen Überblick über die HMO-Grundstrukturen gibt Tabelle 1 (EGGE *et al.* 1993). Zusätzlich können diese Strukturen mit

Tabelle 1. GRUNDSTRUKTUREN VON HUMANMILCH-OLIGOSACCHARIDEN

Komponente	Strukturen
Lactose	Gal β 1-4Glc
Lacto-N-Tetraose (Typ 1)	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Lacto-N-neo-Tetraose (Typ 2)	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Lacto-N-Hexaose	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc Gal β 1-4GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc Gal β 1-3GlcNAc β 1-3[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6]Gal β 1-4Glc

Fucose in α 1-2-, α 1-3- und/oder α 1-4-glykosidischer Bindung modifiziert werden. Durch die Verknüpfung der neutralen Grundstrukturen mit N-Acetyl-Neuraminsäure in α 2-3- und/oder α 2-6-glykosidischer Bindung, werden über die Carboxylgruppe zusätzlich eine oder mehrere negative Ladungen eingebracht. Diese Strukturen werden als saure Oligosaccharide bezeichnet (EGGE *et al.* 1983, KUNZ *et al.* 1996, STAHL *et al.* 1994, FINKE *et al.* 1999). Zusammen wurden bislang mehr als 130 verschiedene Oligosaccharide aus Humanmilch isoliert.

Bei der Synthese der HMO in der Brustdrüse der Frau spielt die Expression und Regulation von Glycosyltransferasen offenbar eine entscheidende Rolle für die Quantität und Variabilität der Oligosaccharide. Die Fucosylierung der Oligosaccharide wird von mindestens drei verschiedenen Fucosyltransferasen katalysiert, die ebenfalls an der Synthese von Blutgruppenantigenen des ABO- und Lewis-Systems beteiligt sind (LLOYD 2000, MORGAN UND WATKINS 2000). Die Expression der einzelnen Fucosyltransferasen ist genetisch determiniert, woraus sich eine interindividuelle, strukturelle Variabilität der HMO ableiten lässt.

Eine α 1-2-Fucosyltransferase wird von rund 77% der Menschen kaukasischer Abstammung exprimiert, die als Sekretoren bezeichnet werden (KUMAZUKI UND YOSHIDA 1984, LLOYD 2000, MORGAN UND WATKINS 2000). Die Humanmilch von Frauen mit Sekretor-Status ist durch das Vorkommen von 2'-Fucosyllactose und Lacto-N-Fucopentaose I (LNFP I, Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) charakterisiert. Darüber hinaus finden sich in der Humanmilch eine Reihe komplexer Oligosaccharide, die

Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc-Reste enthalten (EGGE *et al.* 1983, Kunz *et al.* 1996, STAHL *et al.* 1994, THURL *et al.* 1997, STAHL *et al.* 2001).

Eine weitere Fucosyltransferase katalysiert die α 1-4-glykosidische Bindung zwischen Fucose und einem subterminalen N-Acetyl-Glucosamin-Rest auf Typ 1 Ketten (JOHNSON UND WATKINS 1992, LLOYD 2000, MORGAN UND WATKINS 2000). Wird lediglich diese α 1-4-Fucosyltransferase exprimiert, ist Lacto-N-Fucopentaose II (LNFP II, Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) das dominierende fucosylierte Oligosaccharid in der Humanmilch (EGGE *et al.* 1983, Kunz *et al.* 1996, STAHL *et al.* 1994, THURL *et al.* 1997, STAHL *et al.* 2001). Diese Struktur ist identisch mit der Lewis a-Blutgruppenderminante und findet sich bei rund 20% der Bevölkerung kaukasischer Abstammung (LLOYD 2000, MORGAN UND WATKINS 2000). Lacto-N-Difucohexaose I (Fuc α 1-2Gal β 1-3[Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) ist eine der Hauptkomponenten der HMO, wenn sowohl die α 1-2- als auch die α 1-4-Fucosyltransferase aktiv ist (EGGE *et al.* 1983, Kunz *et al.* 1996, STAHL *et al.* 1994, THURL *et al.* 1997, STAHL *et al.* 2001).

Bei rund 5% der Bevölkerung kaukasischer Abstammung wird keine der beiden Fucosyltransferasen exprimiert. Dafür ist eine α 1-3-Fucosyltransferase aktiv, die die Übertragung von Fucose auf subterminales N-Acetyl-Glucosamin auf Typ 2 Ketten in einer α 1-3-glykosidischen Bindung katalysiert (LLOYD 2000, MORGAN UND WATKINS 2000). Die Humanmilch von Frauen mit einer aktiven α 1-3-Fucosyltransferase ist durch das Vorkommen von Lacto-N-Fucopentaose III (LNFP III, Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) charakterisiert (EGGE *et al.* 1983, Kunz *et al.* 1996, STAHL *et al.* 1994, THURL *et al.* 1997, STAHL *et al.* 2001).

1.1.2 Digestion, Absorption und Ausscheidung

Das metabolische Schicksal der HMO ist entscheidend für ihre biologischen Funktionen. Die Digestion und Absorption der Oligosaccharide wurde in *In-vitro*-Experimenten untersucht (Abschnitt 1.1.2.1 und 1.1.2.2). Zur Ausscheidung der Oligosaccharide über die Faeces und den Urin liegen darüber hinaus auch *In-vivo*-Daten vor (Abschnitt 1.1.2.3).

1.1.2.1 Digestion

Werden die HMO im Gastrointestinaltrakt des Säuglings bereits metabolisiert, stehen sie für die Ausübung biologischer Funktionen nicht mehr zur Verfügung. Beim Abbau der HMO könnten jedoch möglicherweise aktive Metabolite entstehen, die eine eigene biologische Wirksamkeit aufweisen.

Glycosidasen, die die Abspaltung von Fucose, N-Acetyl-Neuraminsäure oder N-Acetyl-Glucosamin katalysieren, konnten bislang nicht im Gastrointestinaltrakt des Neugeborenen identifiziert werden. Allerdings konnte eine enzymatische Aktivität der Disaccharidasen Amylase, Maltase, Lactase und Saccharase nachgewiesen werden (ANTONOWICZ *et al.* 1974, GRAY 1975, HAMOSH 1996, KIEN 1996).

Der Einfluss der humanen Speichelamylase auf die Digestion von HMO wurde von Gnoth *et al.* untersucht (GNOTH *et al.* 2000a). Da die Speichelamylase auch für längere Zeit im Magen aktiv bleibt (HODGE 1983), wurden die Oligosaccharide sowohl für eine Minute als auch für zwei Stunden bei 37°C mit dem Enzym inkubiert. Eine Degradation der HMO konnte unter diesen Bedingungen jedoch nicht beobachtet werden (GNOTH *et al.* 2000a).

Engfer *et al.* untersuchten den Einfluss von Glycosidasen der intestinalen Bürstensaummembran und des Pankreassekrets. HMO wurden bis zu 20 Stunden mit humanen Bürstensaummembranpräparationen (BBM) und Duodenalaspiraten (HDA) inkubiert. Die Zusammensetzung der Oligosaccharide und das Auftreten von Degradationsprodukten wurde sowohl massenspektrometrisch (MALDI-TOF-MS), chromatographisch (HPAEC) als auch anhand von enzymatischen Monosaccharid-Assays analysiert. Während das Kontroll-Oligosaccharid Maltodextrin nach der Inkubation mit BBM und HDA nahezu vollständig degradiert wurde, konnte keine signifikante Hydrolyse der HMO beobachtet werden (ENGFER *et al.* 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Gnoth *et al.* (2000a) nach der Inkubation der HMO mit BBM vom Schwein.

Der Einfluss des niedrigen pH-Wertes im Magen des Neugeborenen auf die Hydrolyse der HMO wurde ebenfalls von Gnoth *et al.* untersucht. Nach der Inkubation der HMO bei pH 2,5 und 37°C für zwei Stunden, konnte keine Veränderung in der Zusammensetzung der neutralen Oligosaccharide beobachtet werden. Die sauren Oligosaccharide wurden unter diesen Bedingungen jedoch geringfügig hydrolysiert. Dadurch stieg die Konzentration der freien N-Acetyl-Neuraminsäure leicht an und einige neue neutrale Komponenten konnten detektiert werden (GNOTH *et al.* 2000a).

Aus den bislang veröffentlichten *In-vitro*-Experimenten kann der Schluss gezogen werden, dass HMO sowohl dem enzymatischen Abbau durch Glycosidasen als auch dem niedrigen pH-Wert des Magens weitgehend widerstehen.

1.1.2.2 Absorption

Die HMO-Absorption wurde von Gnoth *et al.* anhand eines *In-vitro*-Systems untersucht (GNOTH *et al.* 2001). Die humane Zelllinie Caco-2, die biochemische und morphologische Charakteristika von differenzierten Epithelzellen repräsentiert (HIDALGO *et al.* 1989, ARTURSSON 1990), wurde in Transwells bis zur Konfluenz kultiviert. Der Caco-2-Monolayer wurde für 90 min bei 37°C und 5% CO₂ mit neutralen oder sauren HMO bzw. verschiedenen Oligosaccharid-Standards inkubiert. Anschließend wurden die Oligosaccharide aus dem Medium der apikalen und basolateralen Seite des Transwells sowie aus den präparierten, intrazellulären Kompartimenten isoliert und mittels HPLC-MS identifiziert (GNOTH *et al.* 2001).

Für die neutralen Oligosaccharide konnte gezeigt werden, dass der Flux von der apikalen zur basolateralen Seite signifikant höher ist als der umgekehrte Flux von der basolateralen zur apikalen Seite. Bei den sauren Oligosacchariden war der Flux in beiden Richtungen nicht signifikant verschieden (GNOTH *et al.* 2001).

Nach der Inkubation der Caco-2-Zellen mit HMO konnten neutrale HMO im intrazellulären Kompartiment nachgewiesen werden. Degradationsprodukte konnten dabei nicht identifiziert werden, woraus geschlossen wurde, dass die Oligosaccharide in der Epithelzelle nicht metabolisiert werden. Durch die Inkubation der Caco-2-Zellen mit Brefeldin A bzw. Bafilomycin A, welche die Translokation von frühen zu späten Endosomen inhibieren (KLAUSNER *et al.* 1992, BAYER *et al.* 1998, MAKSYMOWYCH UND SIMPSON 1998), konnte der apikal-basolaterale Flux der neutralen Oligosaccharide signifikant reduziert werden. Brefeldin A und Bafilomycin A hatte jedoch keinen Einfluss auf den Flux saurer Oligosaccharide (GNOTH *et al.* 2001).

Aus diesen Daten wurde gefolgert, dass die neutralen Oligosaccharide zum Teil über einen transzytosolischen Mechanismus absorbiert werden, der über eine endozytotische Aufnahme in die Zelle eingeleitet wird. Die Aufnahme der untersuchten Oligosaccharid-Standards LNT und LNFP I erfolgte mit einer für eine Rezeptor-vermittelte Endozytose charakteristischen Sättigungskinetik. Da keine kompetitive Hemmung bei der

gemessenen Aufnahme von LNT und LNFP I beobachtet werden konnte, wurde vermutet, dass für diese beiden Oligosaccharide unterschiedliche Rezeptoren existieren (GNOTH *et al.* 2001).

Da es für saure HMO in der Studie von Gnoth *et al.* keine Hinweise auf einen transzellulären Absorptionsmechanismus gab, scheinen diese Oligosaccharide lediglich über einen parazellulären Weg absorbiert zu werden (GNOTH *et al.* 2001).

1.1.2.3 Ausscheidung

Aufgrund von Atemgasanalysen kamen Brand-Miller *et al.* zu dem Schluss, dass HMO vorwiegend im Kolon des gestillten Säuglings metabolisiert werden (BRAND-MILLER *et al.* 1998). Darüber hinaus konnten Sabharwal *et al.* in einer Reihe von Studien an Reif- und Frühgeborenen belegen, dass die Ausscheidung spezifischer Oligosaccharide über die Faeces von der Aufnahme der HMO abhängt (SABHARWAL *et al.* 1984, SABHARWAL *et al.* 1988a, SABHARWAL *et al.* 1988b, SABHARWAL *et al.* 1991a). Es konnte gezeigt werden, dass diese spezifische Oligosaccharid-Zusammensetzung im Faeces des Säuglings mit dem Abstillen abnimmt, so dass eine Korrelation zwischen der HMO-Aufnahme und der Oligosaccharid-Ausscheidung vermutet wurde (SABHARWAL *et al.* 1991 b).

Rudloff *et al.* konnten HMO in intakter Form im Urin von Frühgeborenen nachweisen. Die Oligosaccharide im Urin von mit Humanmilch ernährten Frühgeborenen wurden isoliert und mittels HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromatography*), HPAEC-PAD (*High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) und FAB-MS (*Fast Atom Bombardment Massenspektrometrie*) analysiert. Die Ergebnisse wurden mit der Oligosaccharid-Zusammensetzung im Urin von Frühgeborenen verglichen, die ausschließlich Säuglingsmilchnahrung bekamen (RUDLOFF *et al.* 1996).

Während die Ernährung mit Humanmilch oder Säuglingsmilchnahrung keinen Einfluss auf die Gesamtmenge der renal ausgeschiedenen Oligosaccharide hatte, konnten deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Urin-Oligosaccharide beobachtet werden. Im Urin der mit Humanmilch ernährten Gruppe konnten die für Humanmilch typischen Oligosaccharide Lactose, Fucosyllactose, Difucosyllactose, LNT sowie fucosylierte und sialylierte LNT-Derivate als Hauptkomponenten identifiziert werden. Darüber hinaus fanden sich eine Reihe komplexerer Oligosaccharide, wie beispielsweise Lacto-N-Hexaose (RUDLOFF *et al.* 1996).

Im Gegensatz dazu war die Oligosaccharid-Zusammensetzung im Urin der mit Säuglingsmilchnahrung ernährten Gruppe weniger komplex. Neben Lactose wurden geringe Mengen Fucosyllactose, Difucosyllactose und LNT identifiziert. Darüber hinaus wurden relativ große Mengen freie Sialinsäure sowie geringe Mengen 3'-Sialyllactose und 6'-Sialyllactose detektiert (RUDLOFF *et al.* 1996).

Die in der Studie verwendete Säuglingsmilchnahrung basierte auf Kuhmilch (RUDLOFF *et al.* 1996). Im Vergleich zur Humanmilch enthält Kuhmilch nur Spuren komplexer Oligosaccharide, wobei Sialyllactose die Hauptkomponente darstellt (KOBATA 1972, PARKKINEN UND FINNE 1987). Der Gehalt komplexer Oligosaccharide im Urin von Frühgeborenen, die mit Säuglingsmilchnahrung ernährt wurden, war äußerst gering. Deshalb kamen Rudloff *et al.* zu dem Schluss, dass die im Urin von gestillten Frühgeborenen detektierten komplexen Oligosaccharide aus der Humanmilch stammten (RUDLOFF *et al.* 1996).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Obermeier *et al.* bei der Untersuchung von Oligosacchariden im Urin von Reifgeborenen. Die Oligosaccharid-Zusammensetzung im Urin der gestillten Säuglinge zeigte Ähnlichkeiten mit der Zusammensetzung der HMO. Daraus wurde geschlossen, dass ein Teil der HMO im Gastrointestinaltrakt des Säuglings absorbiert wird und ohne eine weitere Metabolisierung mit dem Urin zur Ausscheidung gelangt (OBERMEIER *et al.* 1999).

Die Identifizierung von spezifischen Oligosacchariden der Humanmilch im Urin von humanmilchernährten Säuglingen gilt als indirekter Beweis für das Vorkommen von HMO in der systemischen Zirkulation des gestillten Säuglings. Unter der Annahme, dass die im Urin detektierten Oligosaccharide aus der Humanmilch stammen, entspräche die renale Ausscheidung dieser Strukturen etwa 1% der täglichen Aufnahme über die Humanmilch (RUDLOFF *et al.* 1996).

1.1.3 Postulierte biologische Effekte

Um die Wende zum 20. Jahrhundert konnten Moro und Tissier in unabhängigen Untersuchungen zeigen, dass Bifidusbakterien die Darmflora von gestillten Säuglingen dominieren (MORO 1900, TISSIER 1900). Die bifidogenen Faktoren der Humanmilch wurden später als Bestandteil der Nicht-Protein-Stickstoff-Fraktion identifiziert (SCHÖNFELD 1926). György *et al.* konnten schließlich nachweisen, dass unter anderem auch HMO als Wachstumsfaktoren der nicht-pathogenen Bifidusflora angesehen werden können (GYÖRGY *et al.* 1954).

Daneben gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die belegen, dass Oligosaccharide auch direkt mit verschiedenen pathogenen Keimen interagieren können. Der initiale Kontakt von Bakterien, Viren oder Toxinen wird häufig über Kohlenhydratstrukturen der Glykocalyx auf der Oberfläche der Wirtszellen vermittelt. Die Adhäsion von Bakterien an die Epithelzellen der Darmmucosa verhindert ihre Ausscheidung mit dem Mucus und ermöglicht somit eine Besiedelung an der Darmwand (MIRELMAN 1986, OFEK UND SHARON 1990). Es konnte gezeigt werden, dass HMO strukturelle Ähnlichkeiten mit den Oligosacchariden auf der Epithelzell-Oberfläche aufweisen, mit denen eine Reihe von Bakterien, Viren und Toxine interagieren (PARKKINEN *et al.* 1983, HOLMGREN *et al.* 1983). Daraus wurde gefolgert, dass HMO als lösliche Liganden-Analoga dieser bakteriellen bzw. viralen Rezeptoren wirken und dadurch die Adhäsion dieser pathogenen Mikroorganismen vermindern (KUNZ UND RUDLOFF 1993, DAI UND WALKER 1999, SHARON *et al.* 2000).

Aufgrund ihres Vorkommens in der systemischen Zirkulation können neben lokalen Effekten der HMO auch systemische Effekte postuliert werden. Zahlreiche Prozesse im menschlichen Organismus werden über Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen vermittelt. Selektine repräsentieren eine Untergruppe von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen (Abschnitt 1.2). Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen spielen eine zentrale Rolle im Inflammationsgeschehen des Menschen (Abschnitt 1.3). Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit den Bindungsdeterminanten der Selektin-Liganden stellen HMO potentielle Liganden-Analoga der Selektine dar (Abschnitt 1.4). Anhand dieser Argumentationskette wurden Wirkungen der HMO auf systemischer Ebene postuliert (KUNZ *et al.* 2000).

1.2 Selektine

Selektine gehören zu den Kohlenhydrat-bindenden Proteinen, die allgemein als Lektine bezeichnet werden. Das Vorkommen von Lektinen in Pflanzen wurde bereits vor mehr als 100 Jahren beschrieben. Lektine wurden darüber hinaus auch bei den meisten Mikroorganismen und Tieren gefunden (Überblick: CUMMINGS 1999). Drickamer führte anhand von Sequenzhomologien der jeweiligen Kohlenhydrat-Bindungsdomänen eine erste Klassifizierung der verschiedenen Lektine tierischen Ursprungs ein (DRICKAMER 1988). Mittlerweile werden sieben verschiedene Lektin-Klassen unterschieden, die zusammen mit den jeweiligen Oligosaccharid-Bindungs determinanten in Tabelle 2 aufgeführt sind (VARKI 1999). Darüber hinaus gibt es eine ganze Reihe weiterer tierischer Lektine, die untereinander keine Sequenzhomologien aufweisen und aus diesem Grund nicht weiter klassifiziert werden (VARKI 1999).

Die Familie der Selektine zählt zur Klasse der Calcium-abhängigen C-Typ-Lektine und umfaßt die drei Proteine L-Selektin, E-Selektin und P-Selektin. Die Entdeckung von L-Selektin erfolgte im Rahmen der Untersuchung der molekularen Mechanismen des sogenannten Lymphozyten-*Homings*. Darunter versteht man die Adhäsion von Lymphozyten an spezielle Endothelzellen in den postkapillaren Venolen von Lymphknoten

Tabelle 2. KLASSIFIZIERUNG TIERISCHER LEKTINE¹

Lektin-Klasse	Anzahl	Oligosaccharid-Bindungs determinante
• C-Typ-Lektine (Selektine , Collectine u.a.)	>20	sehr variabel
• S-Typ-Lektine (Galektine)	>8	β-Galactoside und Poly-N-Acetyl-Lactosamine
• P-Typ-Lektine (Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren)	2	Mannose-6-Phosphat auf <i>N</i> -Glykanen (<i>high-mannose-type</i>)
• I-Typ-Lektine (Siglecs u.a.)	10	Sialinsäure (Siglecs) u.a.
• Calnexin, Calreticulin, Calmegin	3	Glycosylierte <i>N</i> -Glykane (<i>high-mannose-type</i>) im endoplasmatischen Retikulum
• Hyaluronan-bindende Proteine	>5	Hyaluronan-Ketten
• Frosch-Ei-Lektine	unbekannt	Galactose, Sialinsäure, Heparine

¹ modifiziert nach VARKI 1999

(HEV, *High Endothelial Venules*). Die Adhäsion leitet den Übertritt der Lymphozyten von der Blutbahn ins Lymphsystem ein. L-Selektin wurde als Antigen eines monoklonalen Antikörpers (MEL14) identifiziert, der das Lymphozyten-*Homing* bei der Maus blockierte (GALLATIN *et al.* 1983). Etwa zur gleichen Zeit konnte gezeigt werden, dass Oligosaccharide der HEV-Glykocalyx eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Lymphozyten spielen. Diese Oligosaccharid-Determinanten wurden als Liganden des MEL14-Antigens identifiziert (STOOLMAN UND ROSEN 1983, STOOLMAN *et al.* 1984). Durch die Klonierung des MEL14-Antigens konnte gezeigt werden, dass das Protein eine N-terminale Lektin-Domäne besitzt, die Sequenzhomologien mit anderen Calcium-abhängigen Lektinen tierischen Ursprungs aufweist (LASKY *et al.* 1989, SIEGELMAN *et al.* 1989). Das MEL14-Antigen wurde in der Folge als L-Selektin (CD62L) bezeichnet.

E-Selektin wurde ebenfalls mit einem monoklonalen Antikörper identifiziert, der die Adhäsion von Granulozyten an Zytokin-aktivierte Endothelzellen blockierte (BEVILACQUA *et al.* 1987, POBER *et al.* 1987). Das entsprechende Antigen wurde deshalb zunächst *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1* (ELAM-1) genannt. Die Klonierung von ELAM-1 zeigte die enge Verwandtschaft zu L-Selektin (BEVILACQUA *et al.* 1989). ELAM-1 wurde folglich als E-Selektin (CD62E) bezeichnet.

P-Selektin wurde als Membranprotein von Speichervesikeln in humanen Thrombozyten identifiziert, die nach der Thrombozyten-Aktivierung an die Thrombozyten-Oberfläche transloziert werden. Das Protein wurde deshalb ursprünglich als *Granule Membrane Protein 140* (GMP-140) oder *Platelet Activation-Dependent Granule to External Membrane Protein* (PADGEM-Protein) bezeichnet (HSU-LIN *et al.* 1984). Durch die Klonierung von GMP-140 wurde eine hohe Sequenzhomologie zu den beiden bisher beschriebenen Selektinen nachgewiesen (JOHNSTON *et al.* 1989). In der Folge konnte gezeigt werden, dass P-Selektin (CD62P) auch von Endothelzellen synthetisiert wird und sowohl an der Granulozyten-Adhäsion an Thrombozyten (LARSON *et al.* 1989, HAMBURGER UND MCEVER 1990) als auch an der Granulozyten-Adhäsion an Endothelzellen beteiligt ist (GENG *et al.* 1990).

Tabelle 3 gibt einen Überblick über das Vorkommen und die historisch bedingten Synonyme der drei Mitglieder der Selektin-Familie.

Tabelle 3. SELEKTINE - SYNONYME UND VORKOMMEN

	Synonyme	Vorkommen
L-Selektin (CD62L)	MEL-14-Antigen, LECAM-1, LAM-1, Leu-8, TQ-1, DREG	Leukozyten (konstitutiv exprimiert)
E-Selektin (CD62E)	ELAM-1	aktivierte Endothelzellen
P-Selektin (CD62P)	GMP-140, PADGEM-Protein	aktivierte Endothelzellen, aktivierte Thrombozyten

1.2.1 Molekulare Struktur der Selektine

Der extrazelluläre Bereich der Selektine setzt sich aus drei verschiedenen Domänen zusammen. Der N-Terminus wird aus 120 Aminosäuren gebildet und zeigt die typischen Charakteristika der Lektin-Domäne anderer C-Typ-Lektine (DRICKAMER 1988). Sowohl anhand eines Epitop-Mappings mit blockierenden Antikörpern als auch durch gerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass die Lektin-Domäne der Selektine wesentlich an der Liganden-Bindung beteiligt ist (BOWEN *et al.* 1990, PIGOTT *et al.* 1991, ERBE *et al.* 1992, ERBE *et al.* 1993). Die Bindung zwischen der Lektin-Domäne und dem Liganden ist Calcium-abhängig (GENG *et al.* 1992).

Der Lektin-Domäne folgt ein Bereich der sich aus rund 35 bis 40 Aminosäuren zusammensetzt und Sequenzhomologien zu einer Struktur aufweist, die zuerst beim epidermalen Wachstumsfaktor (*Epidermal Growth Factor*, EGF) beschrieben wurde (GRAVES *et al.* 1994). Es wird vermutet, dass die EGF-Domäne an der Liganden-Bindung beteiligt ist, entweder indirekt durch eine Stabilisierung der Konformation der Lektin-Domäne oder durch die direkte Interaktion mit dem Liganden (PIGOTT *et al.* 1991).

An die EGF-Domäne schließen sich mehrere Wiederholungssequenzen an, die jeweils aus rund 60 Aminosäuren bestehen. Sie werden als *Short Consensus Repeats* (SCR) bezeichnet. Die drei Mitglieder der Selektin-Familie unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl der SCR-Domänen. L-Selektin hat lediglich zwei SCR-Domänen, E-Selektin sechs und P-Selektin neun (SIEGELMANN UND WEISSMAN 1989, BEVILACQUA *et al.* 1989, JOHNSTON *et al.* 1989, LI *et al.* 1994).

Die drei Selektine sind jeweils über eine kurze Transmembran-Domäne in der Zellmembran verankert. Die zytoplasmatische C-terminale Domäne besteht lediglich aus 17 bis 35 Aminosäuren. Zwischen den drei Selektinen gibt es keine Sequenzhomologien innerhalb dieser Region. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Sequenz der einzelnen Selektine zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert ist, was möglicherweise mit ihrer Funktion bei der Signaltransduktion zusammenhängt (JOHNSTON *et al.* 1989, BEVILACQUA UND NELSON 1993, CROVELLO *et al.* 1993).

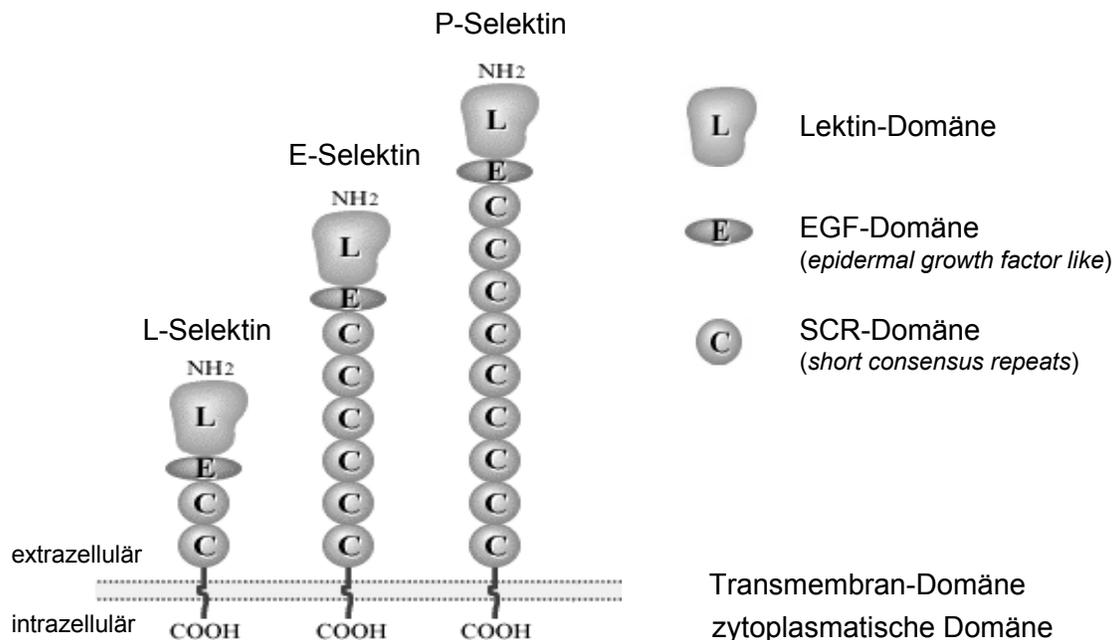


Abbildung 1. MOLEKULARE STRUKTUR DER SELEKTINE

Die drei Mitglieder der Selektin-Familie, L-, E- und P-Selektin, besitzen eine N-terminale Lektin-Domäne, die direkt mit der Oligosaccharid-Determinante des Liganden interagiert. Daran schließt sich die EGF-Domäne an, die Sequenzhomologien zu einer Region des *Epidermal Growth Factors* (EGF) aufweist. Die drei Selektine besitzen eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungssequenzen, die als *Short Consensus Repeats* (SCR) bezeichnet werden. Über die Transmembran-Domäne sind die Selektine in der Zellmembran verankert. Die zytoplasmatische Domäne ist über die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten an der Signaltransduktion beteiligt.

(modifiziert nach <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEAO5E.html> - 31.01.2003)

1.2.2 Mechanismen zur Regulation der Selektin-Expression

1.2.2.1 E-Selektin

Die E-Selektin-Expression wird durch verschiedene pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), Interleukin-1 β (BEVILACQUA *et al.* 1987, POBER *et al.* 1987), Interleukin-3 (BRIZZI *et al.* 1993), Interleukin-10 (VORA *et al.* 1996) und Oncostatin M (MODUR *et al.* 1997) induziert. Neben Lipopolysacchariden (LPS) als Bestandteil gram-negativer Bakterien trägt auch die Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien zu einer Stimulierung der E-Selektin-Expression bei (BEVILACQUA *et al.* 1987, KAWAMURA *et al.* 1995). Die Induktion erfolgt auf der Ebene der Transkription. Drei bis vier Stunden nach der Stimulation mit TNF- α oder Interleukin-1 β kommt es zu einer maximalen E-Selektin-Expression auf der Endothelzell-Oberfläche. Die Ausgangswerte werden erst nach 16 bis 24 Stunden wieder erreicht (BEVILACQUA *et al.* 1989). Auch der Kontakt mit Leukozyten führt möglicherweise über eine Interaktion mit CD40 zu einer vermehrten E-Selektin-Expression auf der Endothelzell-Oberfläche (KARMANN *et al.* 1995, YELLIN *et al.* 1995, RAINGER *et al.* 1996, NOBLE *et al.* 1996, SUNDERKÖTTER *et al.* 1996).

Interleukin-4 (THORNHILL UND HASKARD 1995), Glukokortikoide (CRONSTEIN *et al.* 1992) und der *Transforming Growth Factor* β (GAMBLE *et al.* 1993) inhibieren die E-Selektin-Expression, ebenso wie eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration (POBER *et al.* 1993, GHERSA *et al.* 1994).

1.2.2.2 P-Selektin

Die Induktion der P-Selektin-Expression wird über zwei verschiedene Mechanismen reguliert. P-Selektin wird in den α -Granula der Thrombozyten bzw. den Weibel-Palade-Vesikeln der Endothelzellen gespeichert. Erfolgt eine Stimulation der Zellen mit Histamin, Thrombin oder Adenosin-Diphosphat (ADP), kann P-Selektin aus diesem Pool innerhalb weniger Minuten mobilisiert werden (WEIBEL UND PALADE 1964, GENG *et al.* 1990). Nach 5 bis 10 min ist die maximale P-Selektin-Expression auf der Zell-Oberfläche bereits erreicht und nach 30 bis 60 min wird P-Selektin durch Clathrin-vermittelte Endozytose wieder internalisiert (SUBRAMANIAM *et al.* 1993).

Ein weiterer Regulationsmechanismus der P-Selektin-Expression greift ähnlich wie bei E-Selektin auf der Ebene der Transkription an. Die Stimulation mit TNF- α resultiert in einer vermehrten P-Selektin-Expression auf der Endothelzell-Oberfläche bei der Maus oder

beim Rind (SANDERS *et al.* 1992, WELLER *et al.* 1992, HAHNE *et al.* 1993). Auf humanen Endothelzellen, die aus Nabelschnurvenen isoliert wurden (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), konnte die P-Selektin-Expression jedoch weder mit TNF- α noch mit Interleukin-1 β oder LPS induziert werden (YAO *et al.* 1996). Interleukin-4 und Oncostatin M sind hingegen potente Aktivatoren der P-Selektin-Expression (MODUR *et al.* 1997).

1.2.2.3 L-Selektin

Im Gegensatz zu E- und P-Selektin wird L-Selektin konstitutiv exprimiert und kommt auf der Oberfläche von myeloiden Zellen sowie einer Reihe von Lymphozyten vor (LEWINSOHN *et al.* 1987). Durch die Aktivierung der Zellen wird die L-Selektin-Expression herunterreguliert. Dieser als *Shedding* bezeichnete Prozess wird durch die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domänen kurz oberhalb der Zellmembran reguliert und findet bereits 1 bis 5 min nach der Aktivierung der Zellen statt (KISHIMOTO *et al.* 1989).

1.2.3 Selektin-Liganden: Bindungsdeterminanten und Trägermoleküle

Crocker und Feizi beschrieben das Bindungssystem zwischen Lektinen und ihren Liganden als funktionelle Triade aus Rezeptor, Ligand und Trägermolekül. Der Rezeptor ist das Lektin und die Liganden sind die Oligosaccharid-Bindungsdeterminanten, die vom Lektin erkannt werden. Diese Bindungsdeterminanten werden dem Lektin als Bestandteile von Trägermolekülen präsentiert. Dabei handelt es sich in der Regel um Glykoproteine, die die Oligosaccharide in *N*- oder *O*-glykosidischer Bindung tragen (CROCKER UND FEIZI 1996). Die Gesamtheit aus Bindungsdeterminante und Trägermolekül wird im Folgenden als Ligand bezeichnet.

1.2.3.1 E-Selektin

Nach der Identifizierung einer Lektin-Domäne am N-terminalen Ende von E-Selektin wurde vermutet, dass E-Selektin mit Glykokonjugaten auf der Leukozyten-Oberfläche interagiert. Erste Hinweise auf die Bindungsdeterminanten lieferte der Vergleich der Glykane auf der Oberfläche verschiedener Zellen, die mit E-Selektin interagieren. Diese Glykane bestehen aus Polylactosamin-Ketten, die mit α 2-3- oder α 2-6-glykosidisch gebundener Sialinsäure modifiziert sind. Darüber hinaus tragen die Polylactosamin-Ketten α 1-3-glykosidisch gebundene Fucose-Reste (FUKUDA *et al.* 1984, SPOONER *et al.* 1984).

Weitere Beweise für die Essentialität dieser fucosylierten, sialylierten Strukturen lieferten *In-vitro*-Studien, die zeigen konnten, dass diese Oligosaccharide in löslicher Form die E-Selektin-vermittelte Zell-Adhäsion inhibieren können. Das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis x (sLe^x) und das Stereoisomer Sialyl-Lewis a (sLe^a) sowie einige sulfatierte Formen wurden schließlich als mögliche Bindungsdeterminanten der E-Selektin-Liganden identifiziert (PHILLIPS *et al.* 1990, TYRRELL *et al.* 1991, BERG *et al.* 1991). Die Strukturen der Oligosaccharide, die *in vitro* einen Einfluss auf die E-Selektin-vermittelte Zell-Adhäsion zeigten, sind in Abbildung 2 dargestellt (CUMMINGS UND LOWE 1999). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass das Stereoisomer sLe^a eine höhere Bindungsaffinität für E-Selektin aufweist als sLe^x (NELSON *et al.* 1993, BRUNK UND HAMMER 1997). Unter Berücksichtigung, dass sLe^a und die sulfatierten Formen von sLe^x und sLe^a bisher nicht auf der Oberfläche von Leukozyten identifiziert werden konnten (FUKUDA *et al.* 1984), kann lediglich sLe^x als physiologische Bindungsdeterminante von E-Selektin angesehen werden (VARKI 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die nicht-sialylierten Determinanten, Lewis x (Le^x) und Lewis a (Le^a), nicht zur E-Selektin-vermittelten Zell-Adhäsion beitragen (BERG *et al.* 1991).

Der auf nahezu allen Leukozyten exprimierte *E-Selectin Ligand-1* (ESL-1) trägt ausschließlich *N*-glykosidisch gebundene Oligosaccharide, die die Bindungsdeterminante sLe^x enthalten (CARLOS *et al.* 1990, WELLER *et al.* 1991, PICKER *et al.* 1991, SHIMIZU *et al.* 1991, LENTER *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu sind die Bindungsdeterminanten aller anderen Selektin-Liganden Bestandteile von *O*-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden.

E-Selektin bindet neben ESL-1 auch an *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1* (PSGL-1), ein Glykoprotein, das auf der Leukozyten-Oberfläche exprimiert wird und zunächst als Ligand für P-Selektin identifiziert wurde (LENER *et al.* 1994, MOORE *et al.* 1994, ASA *et al.* 1995, LI *et al.* 1996, GOETZ *et al.* 1997).

Ein dritter E-Selektin-Ligand ist L-Selektin. L-Selektin ist selbst ein Glykoprotein, dessen Oligosaccharide mit der E-Selektin-Bindungsdomäne interagieren können (JONAS *et al.* 1997). Diese Bindung konnte mit L-Selektin-Antikörpern blockiert werden (ZÖLLNER *et al.* 1997).

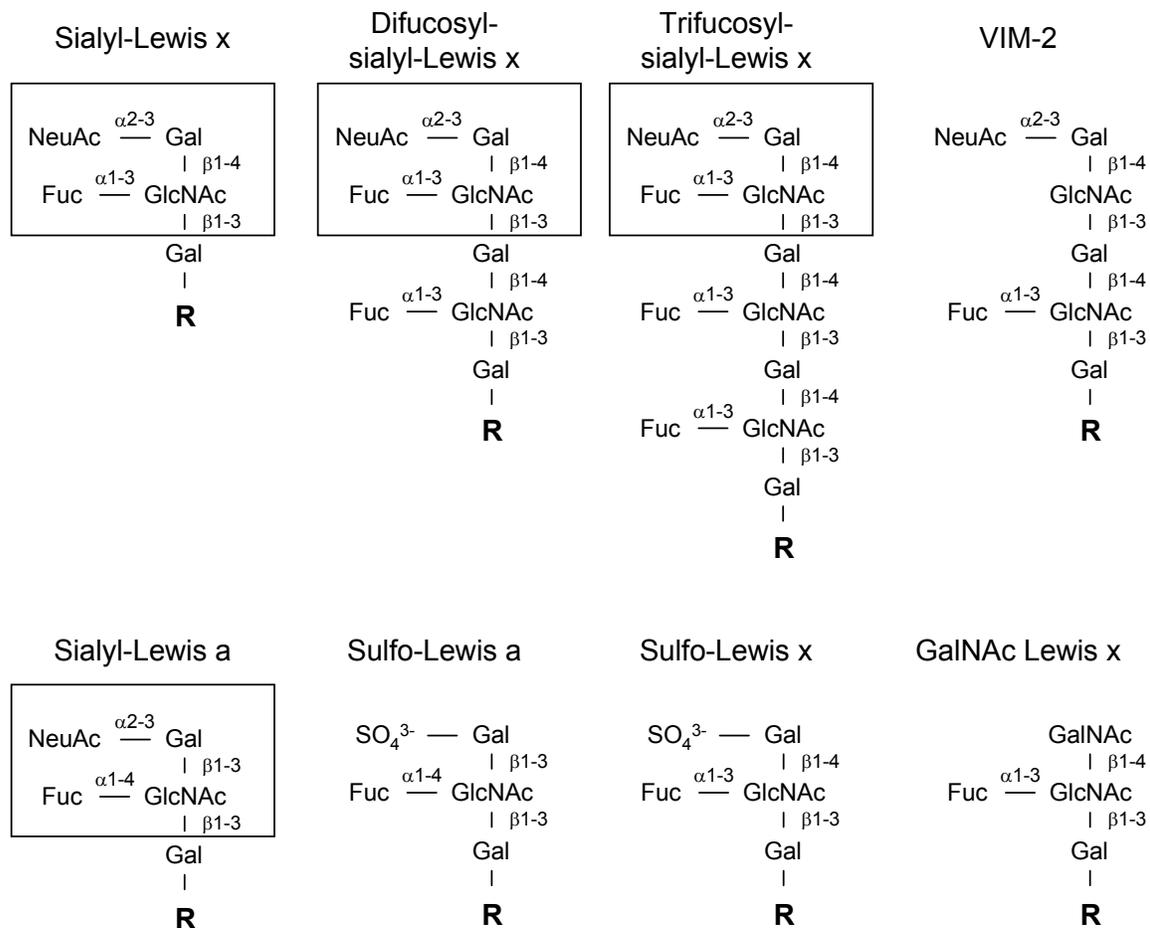


Abbildung 2. OLIGOSACCHARID-STRUKTUREN MIT EINFLUSS AUF DIE E-SELEKTIN-VERMITTELTE ZELL-ADHÄSION

Zu den Oligosaccharid-Strukturen, die *in vitro* eine inhibitorische Wirkung auf die E-Selektin-vermittelte Zell-Adhäsion ausüben, zählen Sialyl-Lewis x und die di- und trifucosylierten Sialyl-Lewis x-Determinanten sowie das Stereoisomer Sialyl-Lewis a und die sulfatierten Lewis x- und Lewis a-Determinanten. Daneben haben auch VIM-2, mit einer Fucosylierung am internen GlcNAc, sowie GalNAc-Lewis x einen Einfluss auf die E-Selektin-vermittelte Zell-Adhäsion *in vitro*. Die sLe^x- bzw. sLe^a-Determinanten sind jeweils mit einer Umrahmung markiert (modifiziert nach CUMMINGS UND LOWE 1999).

1.2.3.2 P-Selektin

Auf der Leukozyten-Oberfläche wurde bislang lediglich ein Glykoprotein identifiziert, das mit einer hohen Affinität an P-Selektin bindet. Dabei handelt es sich um *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1* (PSGL-1) (MOORE *et al.* 1992, SAKO *et al.* 1993, MOORE *et al.* 1994). PSGL-1 ist ein Homodimer, dessen zwei Untereinheiten über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind und die zahlreiche O- und N-glykosidisch gebundene Oligosaccharid-Ketten tragen (MOORE *et al.* 1992). Die funktionelle Expression von rekombinantem PSGL-1 erfordert die Co-Transfektion einer $\alpha 1-3$ -Fucosyltransferase, was

auf die Essentialität einer α 1-3-Fucosylierung der Bindungsdeterminante schließen lässt (ZHOU *et al.* 1991, SAKO *et al.* 1993). Die Inkubation von Granulozyten mit dem Enzym Sialidase führte dazu, dass P-Selektin nicht mehr an die Granulozyten binden konnte. Daraus wurde geschlossen, dass auch Sialinsäure ein essentielles Strukturelement der Oligosaccharid-Bindungsdeterminanten von P-Selektin-Liganden darstellt (NORGARD *et al.* 1993, MOORE *et al.* 1994). Die mögliche Bedeutung des fucosylierten und sialylierten Tetrasaccharids Sialyl-Lewis x (sLe^x) als Bindungsdeterminante wurde unter anderem aus den folgenden Beobachtungen abgeleitet:

- P-Selektin bindet an CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary Cells*) die sLe^x exprimieren, nicht aber an CHO-Zellen, denen sLe^x fehlt (LI *et al.* 1996).
- Monoklonale Antikörper gegen sLe^x blockieren die Bindung zwischen P-Selektin und HL60-Zellen (TAMATANI *et al.* 1995, ZHANG *et al.* 1998).
- Glykane, welche die sLe^x-Determinante enthalten, blockieren die P-Selektin-vermittelte Zell-Adhäsion. P-Selektin bindet darüber hinaus an immobilisierte Glykane, die die sLe^x-Determinante enthalten (NELSON *et al.* 1993).

Die Inkubation von PSGL-1 mit *N*-Glykosidase F führte zwar zu einer Abspaltung der *N*-Glykane hatte jedoch keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten an P-Selektin (MOORE *et al.* 1994). Durch die Inkubation von HL60-Zellen mit Benzyl- α -GalNAc wurde die Synthese von *O*-Glykanen inhibiert, was zu einer verminderten Bindung dieser Zellen an immobilisiertes P-Selektin führte (KOJIMA *et al.* 1992). Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass die essentielle Oligosaccharid-Bindungsdeterminante, sLe^x, *O*-glykosidisch gebunden vorliegt (MOORE *et al.* 1994).

Auch wenn PSGL-1 eine ganze Reihe *O*-glykosidisch gebundener Oligosaccharide mit sLe^x-Determinanten trägt, führte lediglich die Blockierung der Oligosaccharid-Domäne in der N-terminalen Region zu einer Inhibierung der P-Selektin-Bindung. Alle anderen sLe^x-Determinanten tragen nicht zur Interaktion mit P-Selektin bei (LI *et al.* 1996).

Durch die Inkubation von PSGL-1 mit Sulfatase und durch gerichtete Mutationen der N-terminalen Tyrosin-Reste konnte gezeigt werden, dass neben einer korrekten Glykosylierung von PSGL-1 auch die Sulfatierung eines N-terminalen Tyrosin-Restes für die Bindung an P-Selektin erforderlich ist (WILKINS *et al.* 1995, POUYAMI UND SEED 1995, SAKO *et al.* 1995). Im Gegensatz dazu ist eine Sulfatierung der Tyrosin-Reste für die Bindung von PSGL-1 mit E-Selektin nicht notwendig (LI *et al.* 1996, GOETZ *et al.* 1997).

Die Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Sowohl P-Selektin als auch PSGL-1 liegen als Homodimere vor. Die Lektin-Domäne von P-Selektin interagiert mit dem N-terminalen Oligosaccharid von PSGL-1. Das O-glykosidisch gebundene Oligosaccharid trägt die fucosylierte und sialylierte sLe^x-Determinante (MCEVER UND CUMMINGS 1997).

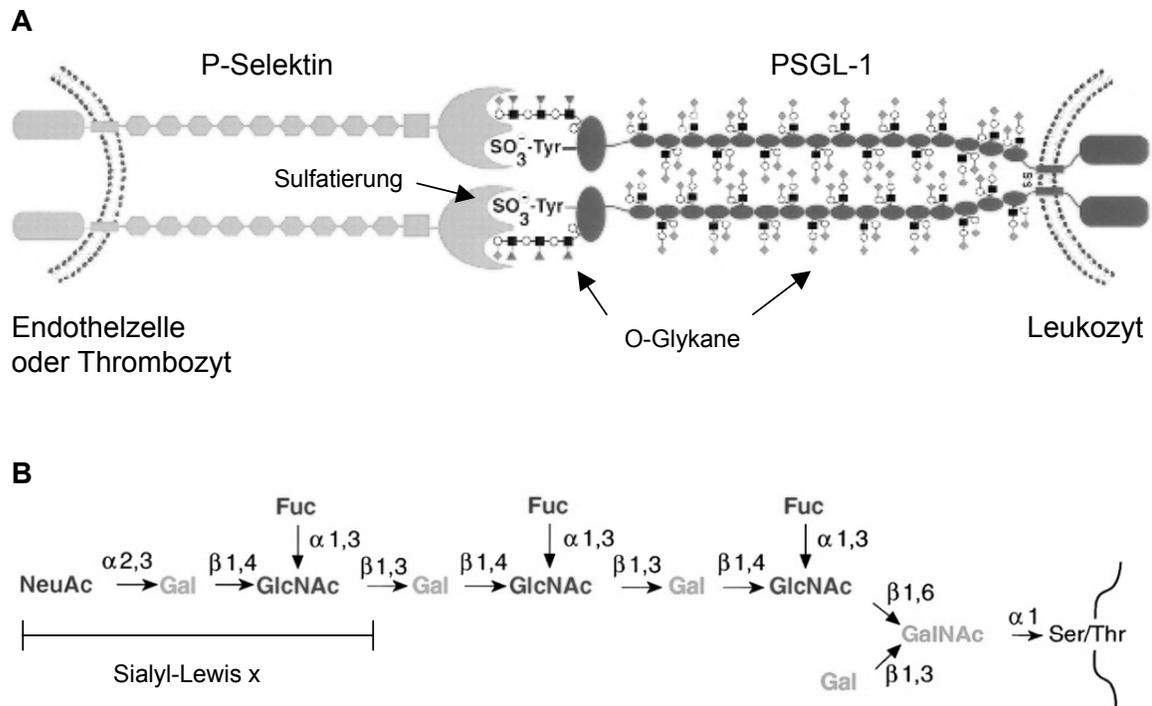


Abbildung 3. INTERAKTIONEN ZWISCHEN P-SELEKTIN UND PSGL-1

A: Sowohl P-Selektin (auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen oder Thrombozyten) als auch PSGL-1 (auf der Oberfläche von Leukozyten) liegen bei der Bindung als Homodimere vor. Für die Bindung der Lektin-Domäne muss der N-Terminus der PSGL-1-Untereinheit sowohl sulfatiert sein als auch eine charakteristische Oligosaccharid-Bindungs-determinante tragen. Alle anderen O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharid-Seitenketten sind nicht an der Bindung mit P-Selektin beteiligt.

B: Die Oligosaccharid-Bindungs-determinante ist O-glykosidisch an Serin- oder Threonin-Reste der PSGL-1-Untereinheit gebunden und trägt Sialyl-Lewis x als essentielles Strukturelement.

(modifiziert nach MCEVER UND CUMMINGS 1997)

1.2.3.3 L-Selektin

Bislang konnten vier verschiedene Glykoproteine als L-Selektin-Liganden identifiziert werden. Der erste L-Selektin-Ligand, der in seiner molekularen Struktur aufgeklärt werden konnte, war das *Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule-1* (GlyCAM-1). GlyCAM-1 ist ein hochglykosyliertes Sialomuzin und besitzt keine Transmembran-Domäne (LASKY *et al.* 1992). GlyCAM-1 konnte folglich auch nicht direkt auf der Oberfläche von HEV identifiziert werden (KIKUTA UND ROSEN 1994), sondern ist ein löslicher Bestandteil des Serums (BRUSTEIN *et al.* 1992, SINGER UND ROSEN 1996). Es wird vermutet, dass es sich bei GlyCAM-1 eher um ein Anti-Adhäsionsmolekül handelt, indem es die L-Selektin-Bindungsstelle von zirkulierenden Granulozyten blockiert (HOKE *et al.* 1995, VARKI 1997).

Des Weiteren wurden CD34 (BAUMHUETER *et al.* 1992, SIMMONS *et al.* 1992), das *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1* (MAdCAM-1) (BERLIN *et al.* 1993) und das *Podocalyxin-Like-Protein* (PCLP) (HEMMERICH *et al.* 1994, HOKE *et al.* 1995) als L-Selektin-Liganden identifiziert. Im Gegensatz zu GlyCAM-1 besitzen diese Glykoproteine alle eine Transmembran-Domäne. Auch der P-Selektin-Ligand PSGL-1 auf der Leukozyten-Oberfläche stellt einen Liganden für L-Selektin dar (SPERTINI *et al.* 1996, TU *et al.* 1996). Über die L-Selektin-PSGL-1-Bindung werden Leukozyten-Leukozyten-Interaktionen vermittelt (GUYER *et al.* 1996, WALCHECK *et al.* 1996).

Die posttranslationalen Glykosylierungen der L-Selektin-Liganden wurden bei GlyCAM-1 bislang am besten untersucht. Um als L-Selektin-Ligand fungieren zu können, müssen die Oligosaccharid-Bindungs determinanten von GlyCAM-1 sulfatiert sein (IMAI *et al.* 1993). Anhand struktureller und funktioneller Untersuchungen mit Lektinen und verschiedenen Exoglykosidasen konnten die beiden sulfatierten und sialylierten Oligosaccharide 6-Sulfosialyl-Lewis x und 6'-Sulfosialyl-Lewis x als Bindungs determinanten von GlyCAM-1 identifiziert werden (HEMMERICH UND ROSEN 1994, HEMMERICH *et al.* 1995). Die Strukturen der beiden sulfatierten Sialyl-Lewis x-Determinanten sind in Abbildung 4 dargestellt.

Das Tetrasaccharid sLe^x interagiert nicht nur mit E- und P-Selektin, sondern auch mit der L-Selektin-Bindungsdomäne. Sowohl L-Selektin allein als auch Zellen, die L-Selektin exprimieren, binden an immobilisiertes sLe^x. Diese Interaktionen konnten jeweils mit L-Selektin-Antikörpern blockiert werden. Foxall *et al.* schlossen daraus, dass sLe^x als eine universale Grundstruktur der Liganden-Bindungs determinanten aller drei Selektine angesehen werden kann (FOXALL *et al.* 1992).

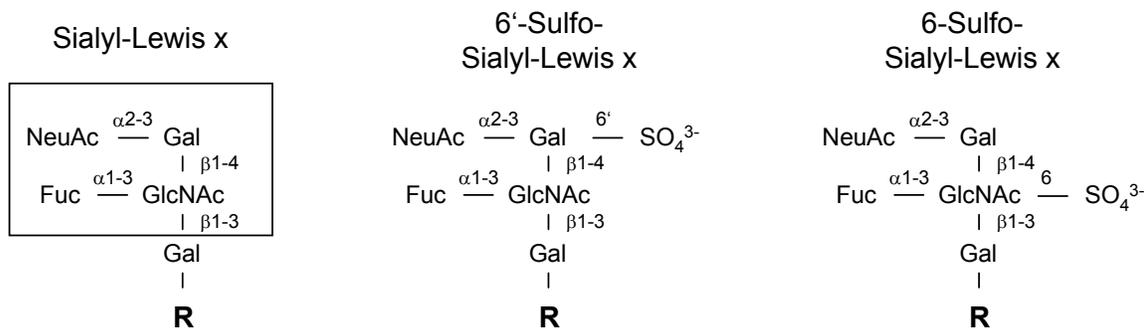


Abbildung 4. OLIGOSACCHARID-BINDUNGSDOMÄNEN DER L-SELEKTIN-LIGANDEN

Sowohl Sialyl-Lewis x (sLe^x) als auch die beiden sulfatierten Sialyl-Lewis x-Determinanten, 6'-Sulfo-Sialyl-Lewis x und 6-Sulfo-Sialyl-Lewis x, konnten als Bindungsdeterminanten von L-Selektin-Liganden identifiziert werden. Die sLe^x-Determinante ist mit einer Umrahmung markiert (angelehnt an CUMMINGS UND LOWE 1999).

Die bislang identifizierten Selektin-Liganden sind in Abbildung 5 dargestellt (VESTWEBER UND BLANKS 1999).

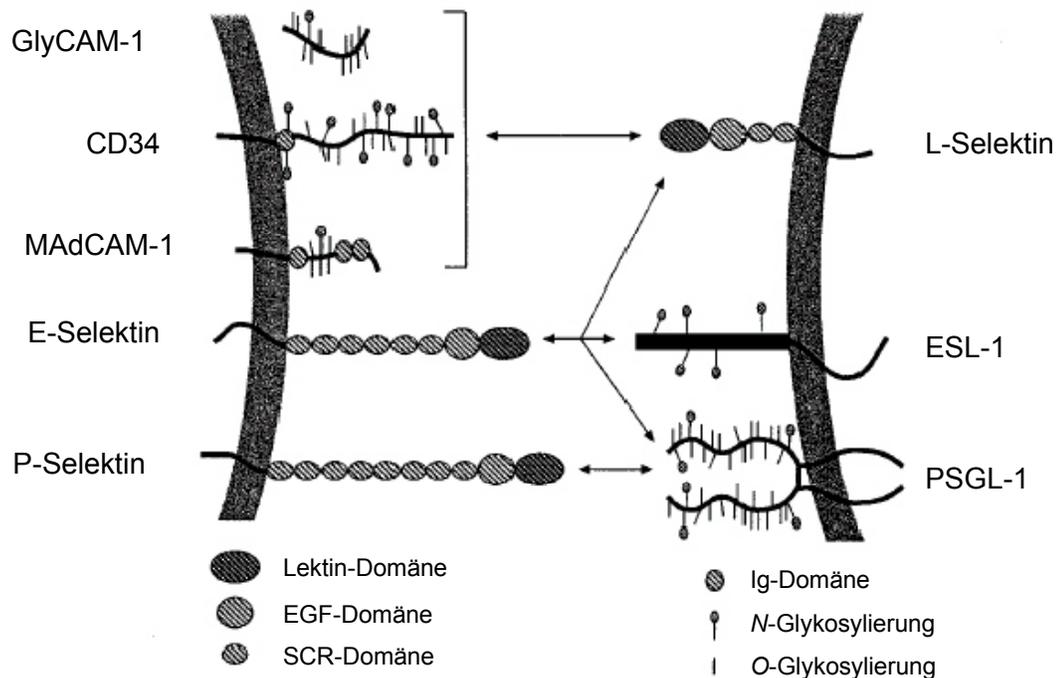


Abbildung 5. SELEKTIN-LIGANDEN

Mit Ausnahme von ESL-1 handelt es sich bei den Selektin-Liganden um Sialomucine, d.h. sie tragen O-glykosidisch gebundene Oligosaccharid-Seitenketten. Die Oligosaccharide von ESL-1 sind hingegen N-glykosidisch gebunden. L-Selektin interagiert mit dem löslichen GlyCAM-1, sowie mit den membrangebundenen Molekülen CD34, MAdCAM-1 und PCLP (nicht dargestellt). E-Selektin bindet sowohl an ESL-1 und PSGL-1 als auch an L-Selektin. Für P-Selektin wurde bislang nur PSGL-1 als Ligand identifiziert (modifiziert nach VESTWEBER UND BLANKS 1999).

1.3 Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen im Immunsystem

Eine Inflammation stellt eine essentielle Abwehrreaktion des Körpers dar, die allgemein durch Gewebeläsionen ausgelöst wird und durch Rötung, Wärmeentwicklung, Schwellung und Schmerz charakterisiert ist. Dabei kommt es zunächst zu einer lokalen Vasodilatation, um den Blutstrom in den Kapillaren des betroffenen Gewebes zu erhöhen. Durch die lokale Freisetzung inflammatorischer Mediatoren werden unter anderem Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten aktiviert. Die komplexen Interaktionen dieser Zellen dienen der Lokalisation und Bekämpfung der auslösenden Noxe und der anschließenden Reparatur des Gewebes. Sowohl an den Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Abschnitt 1.3.1) als auch an den Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten (Abschnitt 1.3.2) sind Selektine beteiligt (OSBORN 1990, SPRINGER 1994, DORÉ 1998, CERLETTI *et al.* 1999).

1.3.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Die lokale Rekrutierung und Extravasation von Leukozyten stellen zentrale Schritte im Inflammationsgeschehen dar. Diese Prozesse werden durch eine Vielzahl inflammatorischer Mediatoren koordiniert, die sowohl von Pathogenen als auch von Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen sowie Zellen des extravaskulären Gewebes sezerniert werden. Diese Mediatoren beeinflussen unter anderem die lokale Hämodynamik, verändern die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche und induzieren die Synthese und Sekretion von Leukozyten-chemotaktischen Faktoren. Über diese Mechanismen kommt es zu einer selektiven Rekrutierung von Leukozyten in das betroffene Gewebe. Die Leukozyten-Extravasation ist ein mehrstufiger Prozess, der als Leukozyten-Adhäsions-Kaskade bezeichnet wird (OSBORN 1990, SPRINGER 1994).

1.3.1.1 Leukozyten-Adhäsions-Kaskade

Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Sequenz der Leukozyten-Adhäsions-Kaskade werden von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen vermittelt. Danach lässt sich die Leukozyten-Extravasation in drei Abschnitte unterteilen (SPRINGER 1994):

- *Rolling*
- Feste Adhäsion
- Transmigration

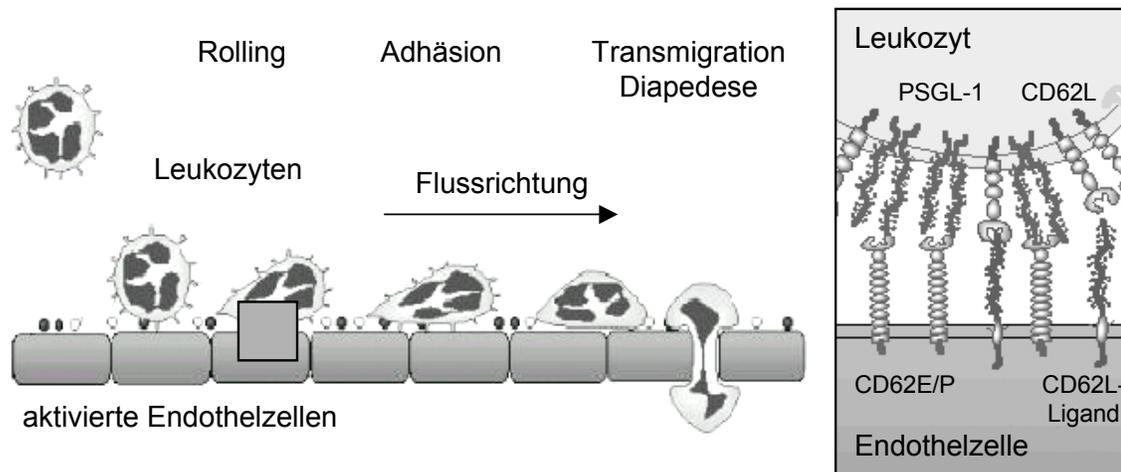


Abbildung 6. LEUKOZYTEN-ADHÄSIONSKASKADE

Die Leukozyten-Extravasation erfolgt in einem Mehrstufen-Prozess. Die Leukozyten werden zunächst aus dem Blutstrom verlangsamt, indem sie auf dem Endothel rollen. Am Leukozyten-*Rolling* sind Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine beteiligt (vergrößerter Ausschnitt, rechts). In der Folge kommt es zu einer festen Adhäsion und schließlich zum Durchtritt der Leukozyten durch das Endothel. Dieser Vorgang wird als Transmigration oder Diapedese bezeichnet.

(modifiziert nach <http://www.virginia.edu/medicine/basic-sci/biomed/ley/> - 30.01.2003)

Jeder dieser Abschnitte scheint ein essentieller Bestandteil der Leukozyten-Extravasation zu sein, da die Blockierung jeweils einer dieser Abschnitte zu einer deutlichen Reduzierung der Leukozyten-Akkumulation im Gewebe führen kann. Bei den Abschnitten der Leukozyten-Adhäsions-Kaskade handelt es sich nicht um verschiedene Phasen des Inflammationsgeschehens. Die Sequenz repräsentiert vielmehr die Interaktionsereignisse eines einzelnen Leukozyten mit den aktivierten Endothelzellen (LEY 1996).

1.3.1.1.1 Leukozyten-*Rolling*

Die Leukozyten-Extravasation setzt eine feste Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen voraus. Die feste Adhäsion wird durch die Verlangsamung der Leukozyten aus dem Blutstrom eingeleitet. Die Verminderung der Leukozyten-Geschwindigkeit erfolgt in drei Stufen (LEY 1996):

- Margination
- *Tethering*
- *Rolling*

Als Margination wird die Annäherung der Leukozyten an die Endothelzellen bezeichnet. Dazu verlassen die Leukozyten den zentralen Blutstrom. Die Margination erfolgt aufgrund von Interaktionen zwischen Leukozyten und Erythrozyten, die sich gemeinsam in einer Kapillare bewegen. Aufgrund eines geringeren Zell-Querschnitts und einer höheren Flussrate drängen die Erythrozyten die Leukozyten näher an die Gefäßwand, wo diese in Kontakt mit den Endothelzellen kommen. Bei der Margination handelt es sich um einen physiologischen Vorgang in Kapillaren, der nicht direkt zum Inflammationsprozess gehört (GOLDSMITH UND SPAIN 1984).

Der initiale Kontakt der Leukozyten mit aktivierten Endothelzellen wird als *Tethering* oder *Capture* bezeichnet. Im Rahmen des Inflammationsgeschehens setzt das *Tethering* die Aktivierung der Endothelzellen voraus, so dass die beteiligten Adhäsionsmoleküle auf der Endothelzell-Oberfläche exprimiert werden (SPRINGER 1994, LEY 1996).

Endothelständiges P-Selektin gilt als das primäre Adhäsionsmolekül beim *Tethering*. Nach der Stimulation der Endothelzellen wird P-Selektin innerhalb weniger Minuten auf der Endothelzell-Oberfläche exprimiert und liefert damit einen ersten Bindungspartner für die Adhäsionsmoleküle der Leukozyten (DORÉ *et al.* 1993, OLOFSSON *et al.* 1994, LUSCINSKAS *et al.* 1996, HENRIQUES *et al.* 1996, SRIRAMARAO *et al.* 1996). PSGL-1 wurde als ein konstitutiv exprimierter P-Selektin-Ligand auf der Leukozyten-Oberfläche identifiziert (MOORE *et al.* 1995, VACHINO *et al.* 1995). P-Selektin ist mit neun SCR-Domänen das größte Selektin und reicht somit am weitesten in den Blutstrom. Aus diesen sterischen Gründen ist P-Selektin möglicherweise für die Vermittlung des initialen Kontakts mit Leukozyten prädestiniert (JOHNSTON *et al.* 1989). Darüber hinaus konnten mehrere *In-vivo*-Studien zeigen, dass auch L-Selektin auf der Leukozyten-Oberfläche eine Rolle beim *Tethering* spielt (LEWINSOHN *et al.* 1987, JUTILA *et al.* 1989, BOSSE UND VESTWEBER 1994, FINGER *et al.* 1996). Der L-Selektin-Ligand auf der Endothelzell-Oberfläche konnte bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Es wird vermutet, dass L-Selektin möglicherweise mit endothelständigem E-Selektin interagiert (KISHIMOTO *et al.* 1991, PICKER *et al.* 1991).

Nach dem *Tethering*, dem initialen Kontakt der Leukozyten mit den aktivierten Endothelzellen, beginnen die Leukozyten auf dem Endothel zu rollen (Abbildung 7). Die Zellen bewegen sich dabei mit einer geringeren Geschwindigkeit als solche Zellen, die sich frei im Blutstrom bewegen. Das *Rolling* wird ebenfalls durch Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine vermittelt (SPRINGER 1994, LEY 1996) (Abschnitt 1.2).

P-Selektin ist sowohl am *Tethering* als auch am Leukozyten-*Rolling* beteiligt. Die kritische Rolle von P-Selektin beim Leukozyten-*Rolling* wird sowohl durch *in vitro* als auch durch *In-vivo*-Experimente gestützt. In *In-vitro*-Modellen konnte gezeigt werden, dass humane Granulozyten auf isolierten und immobilisierten P-Selektinen rollen (SCHMUCKE UND WELPLY 1995). Bei P-Selektin-*knock-out* Mäusen konnte nach einem operativen Trauma kein *Rolling* auf venösem Endothel beobachtet werden. Im Vergleich zum Wildtyp fand sich bei den P-Selektin-defizienten Mäusen eine erhöhte Anzahl zirkulierender Granulozyten. Daraus wurde geschlossen, dass P-Selektin bei der Extravasation von Granulozyten eine essentielle Rolle zukommt, indem sie die Granulozyten aus dem Blutstrom verlangsamen und somit die feste Adhäsion und Transmigration einleiten (MAYADAS *et al.* 1993, BULLARD *et al.* 1995).

Auch L-Selektin und E-Selektin sind am Leukozyten-*Rolling* beteiligt. Bei Abwesenheit von P-Selektin wird das Leukozyten-*Rolling* teilweise durch L-Selektin vermittelt. Die *Rolling*-Geschwindigkeit ist in diesem Fall jedoch drei bis fünf Mal höher, was darauf schließen läßt, dass die Bindung über L-Selektin weniger effizient ist (JUNG *et al.* 1996, PURI *et al.* 1997). Da L-Selektin-Antikörper *in vivo* zu einer teilweisen Blockierung des *Rollings* führten, scheint L-Selektin ein kritisches Adhäsionsmolekül beim Leukozyten-*Rolling* zu sein (VON ANDRIAN *et al.* 1991, LEY *et al.* 1991).

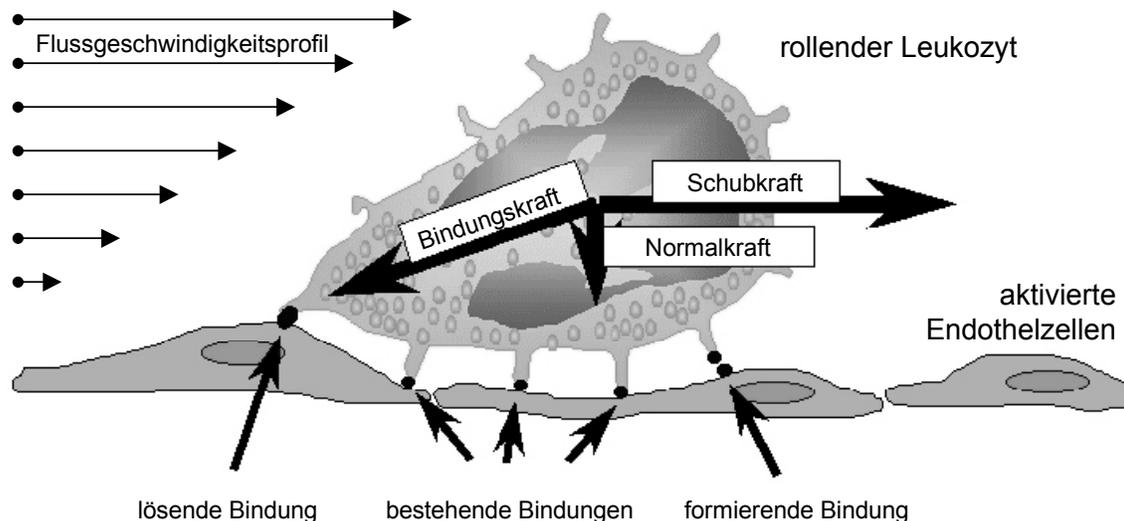


Abbildung 7. LEUKOZYTEN-ROLLING

Die Selektin-vermittelten Bindungen mit den aktivierten Endothelzellen führen zu einer rollenden Verlangsamung der Leukozyten aus dem Blutstrom. Die Bindungskräfte zwischen den Selektinen und ihren Liganden wirken der Schubkraft des Blutstroms entgegen. Die auf den Leukozyten wirkende Normalkraft resultiert aus dem Flussgeschwindigkeitsprofil über dem Gefäßquerschnitt (modifiziert nach <http://www.virginia.edu/medicine/basic-sci/biomed/ley/> - 30.01.2003).

Die Funktionen von P-Selektin und E-Selektin überlappen sich teilweise in der Leukozyten-Adhäsions-Kaskade. Bei E-Selektin-*knock-out* Mäusen konnten zunächst keine Abnormalitäten im Inflammationsgeschehen beobachtet werden (LABOW *et al.* 1994, BULLARD *et al.* 1996). Eine detailliertere Untersuchung der E-Selektin-defizienten Mäuse zeigte jedoch, dass die besonders langsam rollenden Leukozyten mit einer Geschwindigkeit von unter 5 $\mu\text{m/s}$ fehlten (KUNKEL UND LEY 1996). Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise auf eine schnellere Geschwindigkeit des Leukozyten-*Rollings* in Abwesenheit von E-Selektin zurückführen. Es wird vermutet, dass E-Selektin an Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen beteiligt ist, die als *Slow Rolling* bezeichnet werden und einen Übergang vom *Rolling* zur festen Adhäsion darstellen. Beim *Slow Rolling* wird die Geschwindigkeit der Leukozyten bei der Maus beispielsweise von 40 $\mu\text{m/s}$ auf 5 bis 10 $\mu\text{m/s}$ reduziert (LAWRENCE UND SPRINGER 1993, JUNG *et al.* 1996, KUNKEL UND LEY 1996, LEY *et al.* 1998, MILSTONE *et al.* 1998, JUNG *et al.* 1998, JUNG UND LEY 1999). Obwohl durch das *Slow Rolling* die Rekrutierung von Leukozyten effizienter wird, ist es kein essentieller Bestandteil der Leukozyten-Adhäsions-Kaskade. Bei entsprechend hohen Konzentrationen chemotaktischer Faktoren können auch schnell-rollende Leukozyten fest an Endothelzellen adhären (SCHARFFETTER-KOCHANEK *et al.* 1998).

1.3.1.1.2 Feste Adhäsion

Die feste Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Endothelzellen wird über Integrine auf der Leukozyten-Oberfläche und endothelständige Moleküle der Immunglobulin Superfamilie vermittelt. Die Familie der Integrine umfaßt eine Vielzahl heterodimerer Proteine, die an Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind. Integrine setzen sich aus einer großen α - und einer kleinen β -Untereinheit zusammen (WILLIAMS UND HELLEWELL 1992).

Zu den β_2 -Integrinen, die ausschließlich von Leukozyten exprimiert werden, gehören vier verschiedene Heterodimere (HARRIS *et al.* 2000). Das *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1* (LFA-1, CD11a/CD18) wird auf nahezu allen Immunzellen exprimiert (FLOTTE *et al.* 1983, MILLER *et al.* 1985, CAMPANA *et al.* 1986, MILLER *et al.* 1986). Mac-1 (CD11b/CD18) wird vor allem auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert (SANCHEZ-MADRID *et al.* 1983, MILLER *et al.* 1986, MICHISHITA *et al.* 1993). CD11c/CD18 wird auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert, daneben aber auch auf aktivierten Lymphozyten (MILLER *et al.* 1986). CD11d/CD18 wird ebenfalls auf einer Reihe

von Leukozyten exprimiert. Die Funktion ist jedoch noch weitgehend unbekannt (NOTI *et al.* 2000).

Die Rolle der β_2 -Integrine CD11a/CD18 und CD11b/CD18 im Inflammationsgeschehen wurde *in vivo* mittels Intravitalmikroskopie eingehend untersucht (SCHMITS *et al.* 1996, LU *et al.* 1997). Die Expression der β_2 -Integrine wird durch eine Reihe chemotaktischer Faktoren stimuliert (LARSON UND SPRINGER 1990). Darüber hinaus resultiert auch der Kontakt mit Endothelzellen oder Thrombozyten in einer Aktivierung der Leukozyten mit einer vermehrten β_2 -Integrin-Expression. So führt die Interaktion über L-Selektin zur Aktivierung einer Signalkaskade, an deren Ende eine vermehrte Expression von β_2 -Integrinen erfolgt (SIMON *et al.* 1995, STEEBER *et al.* 1997). Die Bindung von P- bzw. E-Selektin an PSGL-1 auf der Leukozyten-Oberfläche resultiert ebenfalls in der Aktivierung von Signalwegen, die zu einer Induktion der β_2 -Integrin-Expression führen (ALTIERI *et al.* 1993, DIACOVO *et al.* 1994, WEBER UND SPRINGER 1997, SIMON *et al.* 2000). Die P-Selektin-vermittelte Aktivierung der β_2 -Integrine spielt eine entscheidende Rolle bei der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion (Abschnitt 1.3.2).

Eine Mutation im CD18-Gen führt beim Menschen zu einer erblichen Erkrankung, die als *Leukocyte Adhesion Deficiency Type 1* (LAD I) bezeichnet wird. Aufgrund einer unzureichenden Leukozyten-Rekrutierung kommt es bei den Patienten zu häufig wiederkehrenden bakteriellen Infektionen, die zusammen mit erhöhten Leukozyten-Konzentrationen im Blut auftreten (ANDERSON *et al.* 1985, HAWKINS *et al.* 1992, SLIGH *et al.* 1992, BACK *et al.* 1992, CORBI *et al.* 1992, BACK *et al.* 1993, GUNESER *et al.* 1996, MATHEW *et al.* 2000).

Die Blockierung des Integrins CD11/CD18 stellt in einer Vielzahl von experimentellen Inflamationsmodellen einen der effektivsten Ansätze dar, die Leukozyten-Rekrutierung zu reduzieren (ARFORS *et al.* 1987). Eine verminderte Leukozyten-Adhäsion und T-Lymphozyten-Aktivierung führte bei CD18-*knock-out* Mäusen zu erhöhten Granulozyten-Konzentrationen im Blut und einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* (SCHARFFETTER-KOCHANEK *et al.* 1998).

Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Immunglobulin Superfamilie, die als Integrin-Liganden fungieren. Sowohl CD11a/CD18 als auch CD11b/CD18 binden an endothelständiges *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) und *Intercellular Adhesion Molecule-2* (ICAM-2) (XIE *et al.* 1995, DIAMOND *et al.* 1990,

STAUNTON *et al.* 1989, DUSTIN UND SPRINGER 1988). Die Expression von ICAM-1 wird durch pro-inflammatorische Zytokine induziert, während ICAM-2 konstitutiv exprimiert wird (DE FOUGEROLLES *et al.* 1994).

Bei CD18-*knock-out* Mäusen ist die Leukozyten-Extravasation zwar eingeschränkt, findet aber dennoch in reduziertem Umfang statt (JUNG *et al.* 1998). Daraus kann geschlossen werden, dass CD11/CD18 zwar an der Leukozyten-Rekrutierung beteiligt ist, daneben aber auch andere Adhäsionsmechanismen existieren müssen. Leukozyten exprimieren neben den β_2 -Integrinen auch das β_1 -Integrin *Very Late Antigen-4* (VLA-4, CD49d/CD29) (HYNES 1992, KUBES *et al.* 1995). VLA-4 interagiert mit dem endothelständigen *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), einem weiteren Mitglied der Immunglobulin Superfamilie (LUSCINSKAS *et al.* 1995).

1.3.1.1.3 Transmigration

Der Durchtritt der Leukozyten durch das Endothel wird als Transmigration oder Diapedese bezeichnet. Aufgrund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde zunächst davon ausgegangen, dass Leukozyten das Endothel auf transzellulärem Weg durchqueren (MARCHESI 1966, FENG *et al.* 1998). Neuere Daten zeigen jedoch, dass die Leukozyten-Transmigration vor allem über die interzellulären Verbindungen zweier benachbarter Endothelzellen erfolgt (BURNS *et al.* 2000, JOHNSON-LEGER *et al.* 2000, AURRAND-LIONS *et al.* 2002). Über die molekularen Mechanismen der Leukozyten-Transmigration ist jedoch bislang wenig bekannt (AURRAND-LIONS *et al.* 2002).

Zwischen benachbarten Endothelzellen gibt es drei Arten von interzellulären Verbindungen: *Gap Junctions* (*Nexus*), *Adherent Junctions* (*Zonulae adhaerentes*) und *Tight Junctions* (*Zonulae occludentes*) (RUBIN 1992, ANDERSON *et al.* 1993, BEYER 1993, SCHMELZ UND FRANKE 1993, DEJANA *et al.* 1995). *Gap junctions* scheinen vor allem an der interzellulären Kommunikation beteiligt zu sein, sie spielen bei der Leukozyten-Transmigration offenbar aber keine Rolle (BEYER 1993, KWAK *et al.* 2001, AURRAND-LIONS *et al.* 2002). *Adherent Junctions* werden vor allem über die homophile Verbindung von VE-Cadherin vermittelt (LAMPUGNANI *et al.* 1992, KEMLER 1993). Es wird vermutet, dass transmigrierende Leukozyten eine Umorganisation von VE-Cadherin induzieren und so einen Durchtritt der Leukozyten ermöglichen. Die entsprechenden Signalwege sind jedoch derzeit nicht bekannt (AURRAND-LIONS *et al.* 2002).

In *Tight Junctions* sind bislang drei verschiedene Arten von Transmembran-Proteinen identifiziert worden: Occludine (FURUSE *et al.* 1993), Claudine (FURUSE *et al.* 1998) und *Junctional Adhesion Molecules* (JAM) (AURRAND-LIONS *et al.* 2000, AURRAND-LIONS *et al.* 2001a). JAM-1 wird von den meisten epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert und ist an der Transmigration von Monozyten beteiligt (MARTIN-PADURA *et al.* 1998). JAM-2 wird vor allem von HEV in lymphatischen Geweben exprimiert und spielt dort eine Rolle bei der Lymphozyten-Transmigration (AURRAND-LIONS *et al.* 2001b). JAM-3 konnte auf Gefäßendothelzellen identifiziert werden (AURRAND-LIONS *et al.* 2001b). Die genauen Mechanismen der JAM-Funktionen konnten bislang jedoch nicht aufgeklärt werden (AURRAND-LIONS *et al.* 2002). Einen schematischen Überblick über die postulierten Mechanismen der Leukozyten-Transmigration zeigt Abbildung 8.

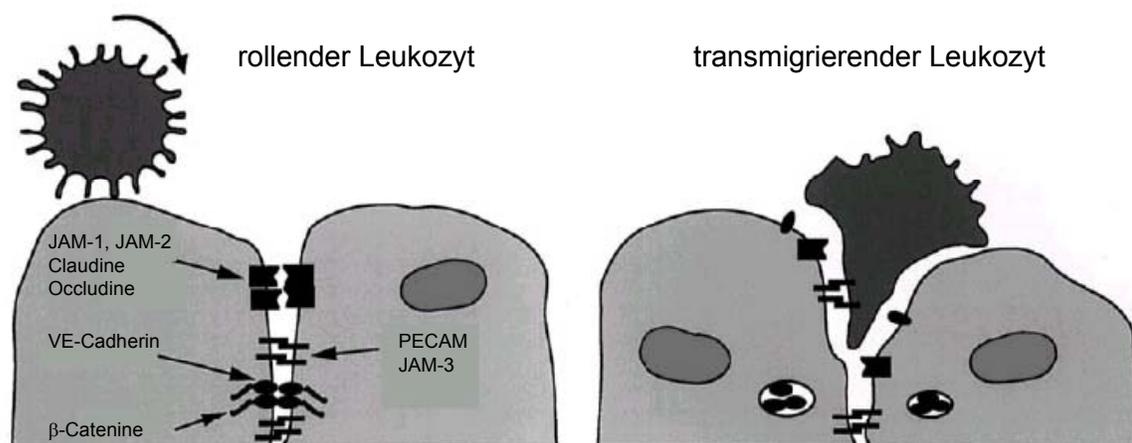


Abbildung 8. LEUKOZYTEN-TRANSMIGRATION

Im Ruhezustand sind die interzellulären Verbindungen zwischen benachbarten Endothelzellen verschlossen. Adhäsionsmoleküle aus der JAM-Familie, die Claudine und Occludine sowie VE-Cadherin garantieren die Integrität des Endothels. Bei der Transmigration interagieren die verschiedenen Adhäsionsmoleküle mit den Leukozyten und ermöglichen so den Durchtritt durch die interzellulären Verbindungen.

(modifiziert nach AURRAND-LIONS *et al.* 2002)

1.3.1.2 Modell-Systeme zur Untersuchung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen werden in der Regel mit Hilfe von drei verschiedenen Modell-Systemen untersucht: statische Modelle, *In-vitro*-Flussmodelle und *In-vivo*-Flussmodelle (JONES *et al.* 1995).

1.3.1.2.1 Statische Modelle

Bei den statischen Modellen wird eine Leukozyten-Suspension auf einen Gewebeschnitt, auf kultivierte Endothelzellen oder auf immobilisierte Liganden aufgebracht. Nach einer gewissen Zeit werden nicht-adhärenente Leukozyten durch Waschen entfernt und adhärenente oder transmigrierte Leukozyten können quantifiziert werden (STAMPER UND WOODRUFF 1976). Mittels Zentrifugation oder *Atomic Force Microscopy* können auch die Bindungsstärken der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen gemessen werden (CHARO *et al.* 1985, FRITZ *et al.* 1998, CHANG *et al.* 2000). Der Einfluss des Blutstroms auf den initialen Kontakt der Leukozyten mit den Endothelzellen sowie das Leukozyten-*Rolling* können mit einem statischen Modell jedoch nicht erfaßt werden (JONES *et al.* 1995).

1.3.1.2.2 *In-vitro*-Flussmodelle

Im Vergleich zu den statischen Modellen liefern die *In-vitro*-Flussmodelle realitätsnähere Informationen über die Prozesse der Leukozyten-Extravasation, da auch der initiale Kontakt und das Leukozyten-*Rolling* untersucht werden können. In der Regel werden parallele Durchflussskammern verwendet (LAWRENCE *et al.* 1987, GALLIK *et al.* 1989, HOCHMUTH *et al.* 1993, JONES *et al.* 1993, MAYER *et al.* 2002). Die Leukozyten-Suspension wird in der Kammer über Gewebeschnitte, kultivierte Endothelzellen oder immobilisierte Liganden geleitet. Ein physiologischer oder pathophysiologischer Fluss in Kapillaren oder großen Gefäßen kann anhand der folgenden Gleichung berechnet und simuliert werden (JONES *et al.* 1995):

$$\tau_w = \frac{6 \times Q \times \mu}{w \times h^2}$$

τ_w	<i>Shear Stress</i> an der Blutgefäßwand
Q	Flussvolumen pro Zeiteinheit
μ	Viskosität der Zellsuspension
w, h	Breite und Höhe des Kammerkanals

Die Durchfluskkammern sind in der Regel teilweise aus transparentem Material, so dass die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Kammer mit einem Lichtmikroskop beobachtet werden können. Die Verwendung von Videodokumentations-Systemen und digitaler Bildbearbeitung ermöglichen die Quantifizierung der Anzahl, der Geschwindigkeit und der Wegstrecke rollender Leukozyten, sowie die Anzahl adhärenter und transmigrierender Leukozyten. Die Zellen müssen bei den *In-vitro*-Modellen nicht markiert werden, was einen Vorteil gegenüber den *In-vivo*-Methoden darstellt (JONES *et al.* 1995).

1.3.1.2.3 *In-vivo*-Flussmodelle

Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurden *in vivo* an durchscheinenden Geweben untersucht, beispielsweise am Ohr von Nagetieren, am Wangenbeutel des Hamsters oder an nackter Mäusehaut (ATHERTON UND BORN 1972, MAYROVITZ 1992). Darüber hinaus wurden Mesenterialgefäße extrakorporal präpariert und mit verschiedenen Zytokinen stimuliert. Durch diese Gefäße wurden markierte und stimulierte Granulozyten geleitet und deren Adhäsion untersucht (YUAN UND FLEMING 1990, PERRY UND GRANGER 1991). In letzter Zeit wird zunehmend die Methode der Intravitalmikroskopie zur Untersuchung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen eingesetzt (ROSENBAUM *et al.* 2002, LAUDANNA UND CONSTANTIN 2003, LARBI *et al.* 2003).

1.3.2 Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Thrombus-Bildung nach Endothel-Verletzungen. Neben ihrer Funktion im Rahmen der Hämostase sind Thrombozyten auch an Prozessen im Inflammationsgeschehen beteiligt (KLINGER 1997). Sie sezernieren eine Reihe von inflammatorischen Mediatoren und interagieren direkt oder indirekt mit Leukozyten und Endothelzellen (DEUEL *et al.* 1981, BAZZONI *et al.* 1991, HAWRYLOWICZ *et al.* 1991, KAPLANSKI *et al.* 1993, KLINGER 1997). Die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten verlaufen auf drei verschiedenen Ebenen (KLINGER 1997):

- Austausch von stimulierenden und inhibierenden Mediatoren (NASH 1994)
- Austausch von Metaboliten, beispielsweise im transzellulären Metabolismus von Arachidonsäure und Leukotrienen (FIORE UND SERHAN 1990, PALMANTIER UND BORGEAT 1991)
- Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen (BAZZONI *et al.* 1992)

Die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen konnte sowohl *in vitro* (JUNGI *et al.* 1986, LARSEN *et al.* 1989) als auch *in vivo* bzw. *ex vivo* beobachtet werden (RINDER *et al.* 1991, LI *et al.* 1997, PETERS *et al.* 1997). Peters *et al.* konnten mit einer *Ex-vivo*-Methode zeigen, dass im unstimulierten Zustand etwa 25% der Granulozyten mit Thrombozyten assoziiert vorlagen. Die Aktivierung der Thrombozyten mit ADP führte zu einer Induktion der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung auf rund 68% (PETERS *et al.* 1997). Die mit Thrombozyten assoziierten Granulozyten wiesen eine erhöhte Expression des β_2 -Integrins CD11b/CD18 auf. Darüber hinaus zeigten diese Granulozyten eine vermehrte Phagozytose-Kapazität für *Neisseria meningitidis* und produzierten mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als freie Granulozyten (PETERS *et al.* 1999).

Der initiale Schritt der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wird durch P-Selektin und PSGL-1 vermittelt. Nach der Aktivierung durch verschiedene Stimuli, wie Histamin, Thrombin oder ADP wird P-Selektin vermehrt auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert und interagiert mit dem auf der Leukozyten-Oberfläche konstitutiv exprimierten Liganden PSGL-1. Die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung konnte mit monoklonalen Antikörpern gegen P-Selektin blockiert werden (GENG *et al.* 1990, PETERS *et al.* 1997, PETERS *et al.* 1999).

Als Folge der Bindung mit P-Selektin, kommt es zu einer Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domänen des PSGL-1-Homodimers, die eine Assoziation von Tyrosinkinase der *src*-Familie ermöglicht (EVANGELISTA *et al.* 1999, PICCARDONI *et al.* 2001), aber auch zu einer Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade führt (HIDARI *et al.* 1997). Daraufhin werden vermehrt β_2 -Integrine auf der Granulozyten-Oberfläche exprimiert (ALTIERI *et al.* 1993, DIACOVO *et al.* 1994, WEBER UND SPRINGER 1997). Die β_2 -Integrine (CD11b/CD18) binden wiederum an Liganden auf der Thrombozyten-Oberfläche und festigen somit die Komplexbindung. Als Thrombozyten-ständige Liganden für CD11b/CD18 wurden ICAM-2 und der Glykoprotein-IIb/IIIa-Fibrinogen-Komplex identifiziert (LOIKE *et al.* 1991, ALTIERI *et al.* 1993, SPANGENBERG *et al.* 1993, DIACOVO *et al.* 1994, WU *et al.* 1994, WEBER UND SPRINGER 1997). Die Interaktionen der Adhäsionsmoleküle bei der Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen ist in Abbildung 9 dargestellt.

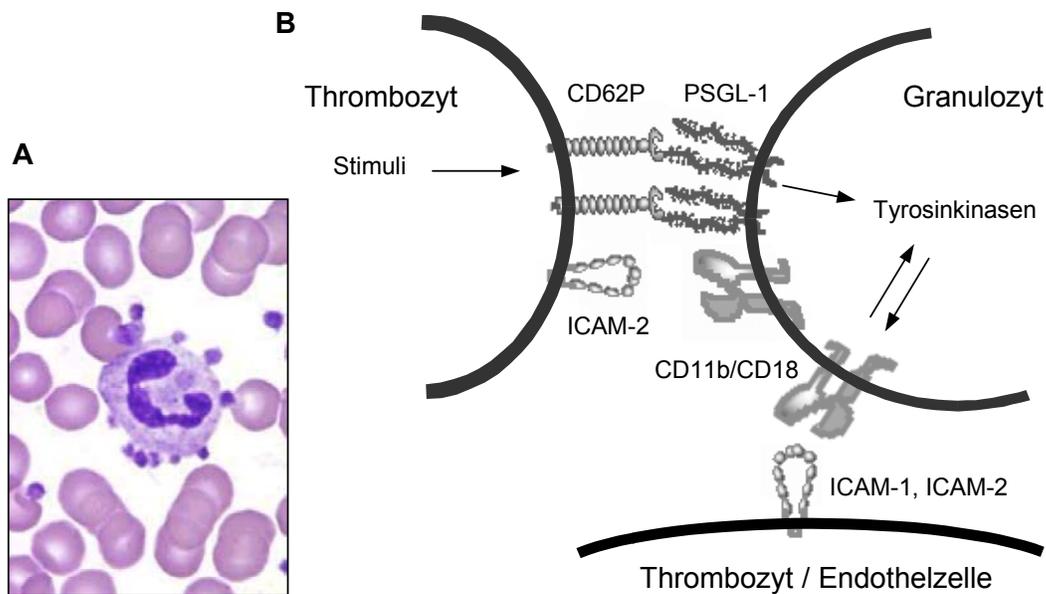


Abbildung 9. THROMBOZYTEN-GRANULOZYTEN-KOMPLEXE

A: Die Pappenheim-Färbung von Vollblut zeigt die Assoziation eines Granulozyten mit einer Reihe von Thrombozyten. Bei den übrigen Zellen handelt es sich um Erythrozyten (<http://www.wadsworth.org/chemheme/heme/microscope/pltsatellitosis.htm> - 31.01.2003).

B: Die Stimulation der Thrombozyten führt zu einer Induktion der P-Selektin-Expression (CD62P). CD62P interagiert mit PSGL-1 auf der Granulozyten-Oberfläche. Durch dieses Signal kommt es über die Aktivierung verschiedener Tyrosinkinase-Signalkaskaden zu einer vermehrten Expression des CD11b/CD18-Heterodimers. CD11b/CD18 kann mit ICAM-2 oder über Fibrinogen mit dem Glykoprotein IIb/IIIa auf der Thrombozyten-Oberfläche interagieren (nicht dargestellt), und festigt somit die Adhäsion der Thrombozyten mit den Granulozyten. Darüber hinaus ist CD11b/CD18 auch an der festen Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen beteiligt (modifiziert an CERLETTI *et al.* 1999).

Die physiologische Funktion und die pathophysiologische Relevanz von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen ist weitgehend unbekannt. Die Komplexe repräsentieren eine Subpopulation äußerst aktiver Granulozyten, deren Phagozytose-Kapazität signifikant erhöht ist (PETERS *et al.* 1999). Eine Thrombozytopenie bedeutet in der Regel eine schlechtere Prognose für Patienten mit einer Gram-negativen Sepsis (KORNELISSE *et al.* 1997). Die reduzierten Thrombozyten-Konzentrationen beeinträchtigen möglicherweise die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen und reduzieren damit deren Phagozytose-Kapazität (PETERS *et al.* 1999).

Granulozyten, die mit Thrombozyten assoziiert sind, zeigen eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen der Integrin-Familie (PETERS *et al.* 1999). Diese Moleküle spielen eine zentrale Rolle bei der Extravasation von Granulozyten an aktivierte

Endothelzellen im Rahmen einer Inflammation (Abschnitt 1.3.1.1). Gawaz *et al.* (1997) konnten zeigen, dass eine verminderte Zirkulation von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen mit einer schlechten Prognose für Multi-Organ-Versagen bei schwerer endothelialer Dysfunktion korreliert.

Die Aktivierung von Thrombozyten spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der instabilen Angina pectoris, besonders in post-ischämischen Phasen (FITZGERALD *et al.* 1986, GRANDE *et al.* 1990). Ott *et al.* konnten zeigen, dass es bei Patienten mit einer instabilen Angina pectoris im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen Angina pectoris vermehrt zur Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen kommt. Die CD11b-Expression der Granulozyten war bei diesen Patienten darüber hinaus signifikant erhöht (OTT *et al.* 1996). Ob und über welche Mechanismen Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe an der Pathogenese der instabilen Angina pectoris beteiligt sind ist derzeit unklar. Möglicherweise spielt dabei die vermehrte ROS-Produktion dieser Granulozyten-Subpopulation eine Rolle (PETERS *et al.* 1999).

1.3.3 Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Die Assoziation von Thrombozyten an Granulozyten und andere Leukozyten führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen der Integrin-Familie (PETERS *et al.* 1999). Diese Moleküle spielen eine zentrale Rolle bei der Extravasation von Granulozyten an aktivierte Endothelzellen im Rahmen einer Inflammation (Abschnitt 1.3.1.1). McEver und Cummings stellten ein multizelluläres Modell zur Leukozyten-Extravasation auf, an dem Thrombozyten, Leukozyten und aktivierte Endothelzellen beteiligt sind (MCEVER UND CUMMINGS 1997). Die Interaktion zwischen P- bzw. E-Selektin und PSGL-1 vermittelt zum einen das *Tethering* und *Rolling* von Leukozyten auf aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten, die sich nach einer Endothel-Läsion an das Subendothel angelagert haben. Die Bindung zwischen L-Selektin und PSGL-1 führt darüber hinaus zu einem Kontakt verschiedener Leukozyten untereinander, was die Leukozyten-Rekrutierung am Ort des Inflammationsgeschehens weiter verstärkt. Aktivierte Thrombozyten sind über die Interaktionen zwischen P-Selektin und PSGL-1 an der Aktivierung und Quervernetzung verschiedener Leukozyten beteiligt. Die Induktion der Integrin-Expression auf der Leukozyten-Oberfläche führt zu einer vermehrten festen Adhäsion an aktivierte Endothelzellen. Einen schematischen Überblick über die multizellulären Interaktionen bei der Leukozyten-Extravasation zeigt Abbildung 10.

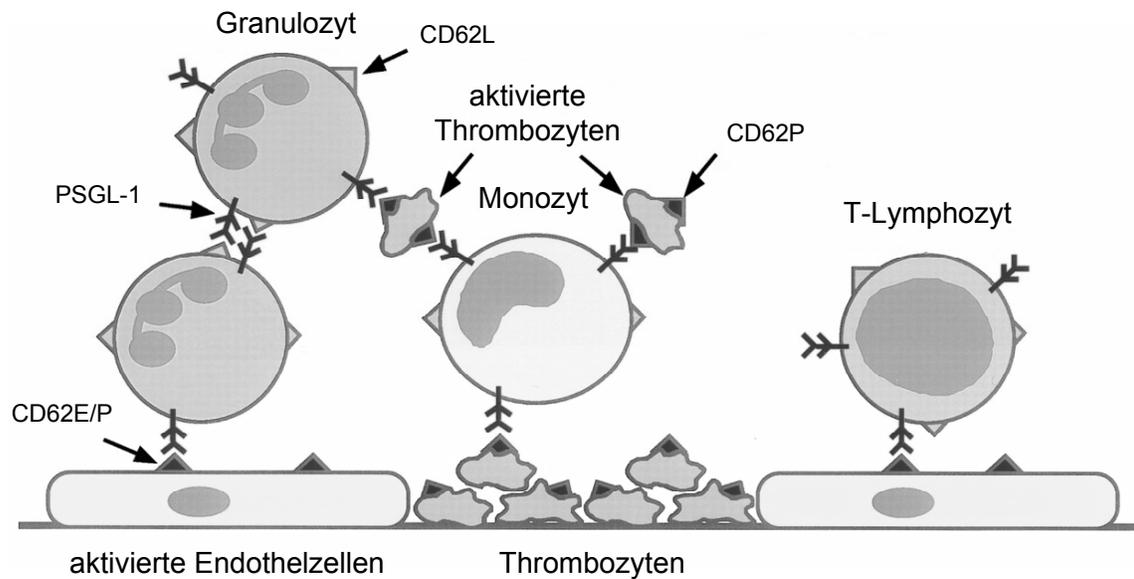


Abbildung 10. MULTIZELLULÄRE INTERAKTIONEN BEI DER LEUKOZYTEN-EXTRAVASATION

Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen spielen eine entscheidende Rolle bei der Leukozyten-Extravasation im Inflammationsgeschehen. Neben Leukozyten und aktivierten Endothelzellen sind an diesem Prozess auch aktivierte Thrombozyten beteiligt.

(modifiziert nach MCEVER UND CUMMINGS 1997)

1.4 Humanmilch-Oligosaccharide als Selektin-Liganden-Analoga

Das Tetrasaccharid sLe^x gilt als eine universale Grundstruktur der Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden (Abschnitt 1.2.3). Bei sLe^x handelt es sich um ein fucosyliertes und sialyliertes Lactosamin. HMO sind ebenfalls aus einem Lactosamin-Rückgrat aufgebaut, welches zusätzlich mit Fucose und Sialinsäure modifiziert sein kann (Abschnitt 1.1.1). Zwischen den Bindungsdeterminanten der Selektin-Liganden und Komponenten der HMO bestehen demnach strukturelle Ähnlichkeiten.

Anhand von monoklonalen Antikörpern gegen die Oligosaccharide sLe^x , sLe^a , Le^x und Le^y konnten Rudloff *et al.* zeigen, dass HMO Bindungsdeterminanten der Selektin-Liganden enthalten. Die aus verschiedenen Humanmilch-Proben von Frauen mit unterschiedlichem Sekretor- und Lewis-Status isolierten Oligosaccharide wurden mittels HPLC in eine neutrale und eine saure Fraktion getrennt und anschließend in Neoglycolipide überführt. Die Neoglycolipide wurden über HPTLC in verschiedene Unterfraktionen getrennt und auf der Dünnschichtplatte fixiert. Die mit den monoklonalen Antikörpern reagierenden Neoglycolipide wurden massenspektrometrisch charakterisiert (RUDLOFF *et al.* 2002).

Nach der Auftrennung der sauren HMO-Fraktion mittels HPTLC reagierten die Strukturen einer Bande aller sechs Humanmilch-Proben deutlich mit dem Antikörper gegen die sLe^x -Determinante. Diese Strukturen konnten massenspektrometrisch jedoch nicht charakterisiert werden. Eine schwächere Antikörper-Bindung konnte mit Strukturen einer weiteren Bande beobachtet werden. Diese Struktur wurde als NeuAc-Lac identifiziert. Da es sich bei der sLe^x -Determinante um eine fucosylierte Struktur handelt, wurde die fehlende Fucosylierung von NeuAc-Lac als möglicher Grund für eine nur schwache Bindung angegeben (RUDLOFF *et al.* 2002).

In der sauren HMO-Fraktion reagierte NeuAc-Fuc-LNH mit dem monoklonalen Antikörper gegen sLe^a . Darüber hinaus wurde auch das nicht-fucosylierte NeuAc-LNT mit dem Antikörper markiert, was darauf hindeutet, dass für die Antikörper-Bindung nicht die komplette sLe^a -Determinante erforderlich ist. Der Antikörper reagierte mit den Strukturen einer weiteren Bande der sauren HMO-Fraktion, die massenspektrometrisch aufgrund der zu geringen Menge nicht identifiziert werden konnten. Obwohl sialylierte Oligosaccharide

ausschließlich in der sauren Fraktion vorkommen sollten, wurden auch in der neutralen HMO-Fraktion aus zwei verschiedenen Humanmilch-Proben Strukturen gefunden, die mit dem Antikörper gegen sLe^a interagierten. Diese Ergebnisse wurden auf mögliche Kontaminationen der neutralen Fraktion mit sauren Oligosacchariden zurückgeführt, wie sie für die chromatographische Trennung mittels HPLC üblich sind. Die mit dem Antikörper detektierten Strukturen konnten massenspektrometrisch nicht näher charakterisiert werden (RUDLOFF *et al.* 2002).

In den meisten *In-vitro*-Experimenten wurde nachgewiesen, dass die sialylierten Oligosaccharide sLe^x und sLe^a eine wesentlich höhere Bindungsaffinität für Selektine aufweisen als nicht-sialylierte Strukturen (Abschnitt 1.2.3). Larson *et al.* konnten jedoch zeigen, dass die Le^x-Determinante bei der P-Selektin-vermittelten Interaktion zwischen Thrombozyten und Granulozyten eine wichtige Rolle spielt (LARSON *et al.* 1990). Der Antikörper gegen die Le^x-Determinante reagierte jeweils mit den Strukturen in zwei Banden der neutralen HMO-Fraktion aus zwei verschiedenen Humanmilch-Proben. In einer anderen Humanmilch-Probe interagierte der Le^x-Antikörper mit der Struktur einer weiteren Bande. Bei zwei Banden der sauren HMO-Fraktion konnte ebenfalls eine schwache Antikörper-Bindung beobachtet werden (RUDLOFF *et al.* 2002).

Der Antikörper gegen die Le^y-Determinante reagierte weder mit Strukturen der neutralen noch mit Komponenten der sauren HMO-Fraktion (RUDLOFF *et al.* 2002).

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse kamen Rudloff *et al.* zu dem Schluss, dass die universellen Bindungsdeterminanten der Selektin-Liganden als strukturelle Komponenten der Oligosaccharide in Humanmilch vorliegen. Darüber hinaus wurde die Hypothese aufgestellt, dass HMO möglicherweise als lösliche Liganden-Analoga die Selektin-vermittelten Zell-Zell-Interaktionen des Immunsystems beeinflussen (RUDLOFF *et al.* 2002).

2 Zielsetzung

Humanmilch enthält eine Vielzahl komplexer Oligosaccharide, die teilweise in die systemische Zirkulation des gestillten Säuglings gelangen. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten stellen einige dieser Oligosaccharide potentielle Analoga von Selektin-Liganden dar. Die Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine sind an verschiedenen Zell-Zell-Interaktionen des Immunsystems beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Oligosaccharide aus Humanmilch isoliert und ihr Einfluss auf Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen in *In-vitro*- bzw. *Ex-vivo*-Systemen untersucht. Dabei wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

- **Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen**
In einem *In-vitro*-Durchflussmodell wurde untersucht, inwieweit HMO das *Rolling* und die anschließende feste Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beeinflussen können. Dabei wurden mögliche Unterschiede der HMO-Wirkung auf verschiedene Leukozyten-Subpopulationen herausgearbeitet. Darüber hinaus wurde der Einfluss einzelner HMO als potentielle Liganden-Analoga untersucht.
- **Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen**
Der Einfluss der HMO auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wurde *ex vivo* in humanem, peripheren Blut mittels direkter Zweifarbenimmunofluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine mögliche Blockierung der Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 durch HMO zu einer verminderten CD11b-Expression führt.
- **Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen**
In einer Kombination des *Ex-Vivo*-Systems mit dem *In-vitro*-System wurde untersucht, ob die durch die HMO ausgelöste, verminderte CD11b-Expression in einer Reduktion der festen Leukozyten-Adhäsion an Endothelzellen resultiert.

3 Methoden

3.1 Oligosaccharide

3.1.1 Isolierung der Humanmilch-Oligosaccharid-Fractionen

Die verwendete Humanmilch stammte aus der Städtischen Kinderklinik Dortmund. Die Sammlung erfolgte unter klinischen Bedingungen. Das klinische Gestationsalter des Säuglings betrug 32 Wochen. Der Säugling hatte ein Geburtsgewicht von 1.160 g. Die Humanmilch wurde in der 3. Laktationswoche mit Hilfe einer elektrischen Pumpe in sterile Glasflaschen abgepumpt. Das Milchvolumen betrug ca. 1.000 ml. Nach Überprüfung des Keimgehalts ($<10^4$ Keime pro ml) wurde die Probe bis zur Isolierung der Oligosaccharide bei -20°C gelagert.

Die HMO wurden nach den von Egge *et al.* und Kunz *et al.* beschriebenen Methoden isoliert (EGGE *et al.* 1983, KUNZ *et al.* 1996). Die Humanmilch wurde zunächst durch Aufräumung entfettet, Proteine durch ethanolische Präzipitation entfernt (Abschnitt 3.1.1.1) und anschließend Lactose als Hauptkomponente der Kohlenhydrat-Fraktion mittels Gelfiltration weitgehend abgetrennt (Abschnitt 3.1.1.2). Die Gesamtoligosaccharid-Fraktion wurde über Anionenaustauschchromatographie in eine neutrale und eine saure Fraktion getrennt (Abschnitt 3.1.1.3). Wegen des dabei verwendeten Natriumchlorid-Gradienten wurde die saure Fraktion im Anschluss mittels Gelfiltration entsalzt (Abschnitt 3.1.1.4). Ein Ablaufschema zeigt Abbildung 11.

Die Bestimmung der Natrium-Konzentration erfolgte durch Atomabsorptionsspektrometrie (Abschnitt 3.1.1.5). Die Endotoxin-Konzentration der Oligosaccharid-Fractionen wurde mittels Affinitätschromatographie reduziert (Abschnitt 3.1.1.6) und anschließend quantifiziert (Abschnitt 3.1.1.7).

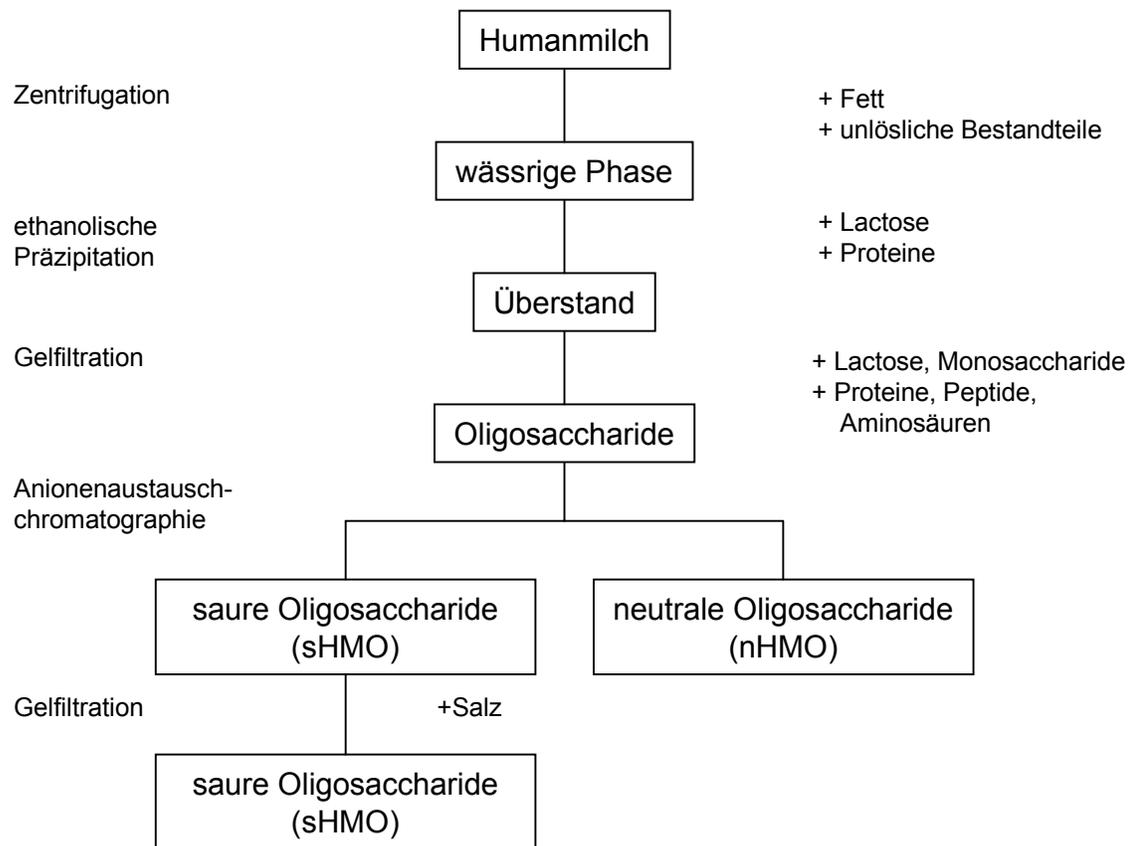


Abbildung 11. ABLAUSCHEMA ZUR ISOLIERUNG VON OLIGOSACCHARIDEN AUS HUMANMILCH

Die Humanmilch wurde zum Entfernen der Fette zentrifugiert und die Proteine der wässrigen Phase mit Ethanol präzipitiert. Die Lactose wurde mittels Gelfiltration von der Kohlenhydrat-Fraktion abgetrennt und die Oligosaccharide über Anionenaustauschchromatographie in eine saure (sHMO) und eine neutrale (nHMO) Fraktion getrennt. Die sHMO wurden schließlich mittels Gelfiltration entsalzt.

3.1.1.1 Entfettung und Enteiweißung

Zum Aufrahmen der Fette wurde von der Humanmilch ein 10 ml Aliquot bei 4°C für 20 min bei 5.000 x g zentrifugiert, über Quarzwolle in ein Becherglas filtriert und zweimal mit 1 ml kaltem, entionisiertem Wasser gewaschen. Der fettige Rückstand wurde verworfen, ebenso wie eine kleine Menge an Proteinen und Lactose, die bereits pelletiert wurden (KOBATA *et. al.* 1969).

Zum Präzipitieren der restlichen Proteine wurde das entfettete Filtrat mit dem zweifachen Volumen kalten Ethanol (100%) versetzt und 3 Stunden im Eisbad gerührt. Anschließend wurde der Ansatz in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit 1 ml kaltem, entionisiertem

Wasser gewaschen und bei 4°C für 60 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Der opaleszente Überstand wurde in einen Glasrundkolben dekantiert. Das Präzipitat wurde in 5 ml kaltem Ethanol (66%) gelöst und erneut bei 4°C für 60 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit jenem aus dem ersten Zentrifugationsschritt vereinigt und für mehrere Stunden bei 4°C gekühlt. Die kalte ethanolische Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 37°C eingeengt, anschließend lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

3.1.1.2 Abtrennung der Lactose

Zur Abtrennung von Lactose, Monosacchariden und restlichen Proteinen wurde die lyophilisierte Probe in sterilem Wasser (pyrogenfrei) gelöst, über eine Nylonmembran (0,2 µm) filtriert und unter folgenden Bedingungen mittels Gelfiltration fraktioniert:

Eluent	steriles Wasser (pyrogenfrei)
Flussrate	1,5 ml/min
Injektionsvolumen	6 ml
Probenkonzentration	60 mg/ml
Säule	2,6 x 100 cm, 520 ml
Füllmaterial	Sephadex G25 Fine
Detektion	Refraktometer
Fraktionenvolumen	3 ml
Fraktionensammlung	120 - 240 min

Fraktionen, die noch Proteine bzw. bereits überwiegend Lactose enthielten, wurden verworfen, während die übrigen Fraktionen gepoolt und lyophilisiert wurden.

3.1.1.3 Trennung in eine neutrale und eine saure Fraktion

Zur Trennung in eine neutrale und eine saure Fraktion wurden die nach der Gelfiltration lyophilisierten und gepoolten Fraktionen in sterilem Wasser (pyrogenfrei) gelöst, über eine Nylonmembran (0,2 µm) filtriert und mittels Anionenaustauschchromatographie (HPLC) fraktioniert.

Eluent A	steriles Wasser (pyrogenfrei)
Eluent B	0,6 M Natriumchlorid-Lösung

Gradient	0 - 7,5 min	100%	Eluent A
	7,5 - 50 min	0 - 55% (linear)	Eluent B
	50 - 52 min	55 - 100% (linear)	Eluent B
	52 - 60 min	100%	Eluent B
Flussrate	2 ml/min		
Injektionsvolumen	1 ml		
Säule	Resource Q 6 ml		
Detektion	UV-Detektor, Extinktion bei 214 nm		
Fraktionenvolumen	1 ml		
Fraktionensammlung	0 - 60 min		

Der Gehalt der Fraktionen an neutralen und sauren Oligosacchariden wurde mittels HPAEC-PAD analysiert (Abschnitt 3.1.2.1) und die entsprechend gepoolten Fraktionen lyophilisiert.

3.1.1.4 Entsalzung der Fraktionen

Zur Entfernung des in der sauren Fraktion nach der Anionenaustauschchromatographie enthaltenen Natriumchlorids wurde die lyophilisierte Fraktion in sterilem Wasser (pyrogenfrei) gelöst, über eine Nylonmembran (0,2 µm) filtriert und mittels Gelfiltration rechromatographiert (Bedingungen: siehe Abschnitt 3.1.1.2).

Die salzfreien Oligosaccharid-Fraktionen wurden gepoolt, lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

3.1.1.5 Quantifizierung der Natrium-Konzentration

Nach der Gelfiltration wurde die Natrium-Konzentration der gepoolten Oligosaccharid-Fraktion mittels Atomabsorptionsspektrometrie quantifiziert. Die lyophilisierte Oligosaccharid-Fraktion wurde in einer Konzentration von 125 µg/ml in entionisiertem Wasser gelöst und vor der Messung 1:25 in entionisiertem Wasser weiter verdünnt. Eichlösungen mit einer Natrium-Konzentration von 50, 100, 200, 300 und 500 µg/l wurden angesetzt. Zur Reduktion von Ionisierung-Interferenzen wurde den Eichlösungen und der zu messenden Probenlösung Caesiumchlorid in einer Endkonzentration von 0,2% zugesetzt. Die Lösungen wurden in einer Acetylen/Luft-Flamme zerstäubt und atomisiert

und die Extinktion bei 589 nm gemessen. Die Natrium-Konzentration der Probe wurde anhand der Eichkurve ermittelt (WELZ UND SPERLING 1997).

3.1.1.6 Endotoxinentfernung

Aufgrund der Ähnlichkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften werden Endotoxine (LPS) während der Isolierung zusammen mit den HMO aufkonzentriert. Die Endotoxin-Konzentrationen der Proben wurde mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Polymixin B reduziert (GNOTH *et al.* 2000b).

Eine Glassäule (6 ml, mit Filterelement) wurde mit 6 ml *Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel* (50% in Ethanol) gepackt. Nach dem Abfließen des Ethanols blieb ein Gelvolumen von 3 ml. Zum Entfernen des Ethanols wurde die Säule mit dem vierfachen Säulenvolumen (12 ml) sterilem Wasser (pyrogenfrei) gewaschen. Vor dem Aufgeben der Probe wurde die Säule mit dem vierfachen Säulenvolumen (12 ml) PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) equilibriert.

Die lyophilisierten Oligosaccharide wurden in PBS in einer Konzentration von 16 mg/ml gelöst. Davon wurden 250 µl (4 mg Oligosaccharide) langsam auf die Säule aufgegeben und mit 3,75 ml PBS eluiert. Die Endkonzentration der eluierten Oligosaccharid-Lösungen betrug demnach 1 mg/ml.

Die an Polymixin B gebundenen Endotoxine wurden mit 12 ml einer Natriumdesoxycholat-Lösung (1%) von der Säule eluiert. Zum Entfernen des Natriumdesoxycholats wurde die Säule mit 12 ml sterilem Wasser (pyrogenfrei) gewaschen.

Die Menge und Zusammensetzung der Oligosaccharide sowie die Endotoxin-Konzentration jeder Probe wurde vor dem Aufgeben auf die Säule und nach dem Eluieren bestimmt.

3.1.1.7 Quantifizierung der Endotoxin-Konzentration

Die Endotoxin-Konzentration der HMO-Fractionen und der Oligosaccharid-Standards wurde mit dem *Limulus Amebocyte Lysate Assay* (LAL-Assay) quantifiziert. Die Endotoxine gram-negativer Bakterien wirken dabei als Cofaktoren für ein aus *Limulus polyphemus* isoliertes Proenzym. Das Holoenzym katalysiert die Abspaltung des

Chromogens p-Nitroanilin (pNA) aus dem farblosen Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. Zwischen der photometrisch bestimmten Absorption des freien pNA und der Endotoxin-Konzentration besteht eine lineare Korrelation im Bereich zwischen 10 und 100 pg/ml.

Jeweils 50 µl der Endotoxin-Standards bzw. der Oligosaccharid-Proben (verdünnt auf 20 µg/ml) wurden für 5 min im Wärmeblock auf 37°C erwärmt und anschließend für 10 min mit 50 µl LAL (Proenzym) inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl LAL-Substrat wurde der Ansatz weitere 6 min inkubiert und die Reaktion mit 100 µl Essigsäure (25%) gestoppt. Jeweils 100 µl wurden auf Mikrotiterplatten überführt und die Absorption bei 405 nm mittels ELISA-Reader gemessen. Die Endotoxin-Konzentration in den Oligosaccharid-Fractionen bzw. -Standards wurde anhand einer Endotoxin-Eichkurve ermittelt.

3.1.2 Charakterisierung der Oligosaccharide

3.1.2.1 *High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD)*

Die Analyse der Oligosaccharid-Fractionen und -Standards erfolgte anhand der von Kunz *et al.* beschriebenen Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD, *High pH Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*).

Eluent A	100 mM Natriumhydroxid		
Eluent B	100 mM Natriumhydroxid + 250 mM Natriumazetat		
Gradient	0 - 3 min	100%	Eluent A
	3 - 33 min	0 - 100% (linear)	Eluent B
	33 - 40 min	100%	Eluent A
Flussrate	1 ml/min		
Injektionsvolumen	20 µl		
Vorsäule	CarboPac PA 1 Guard		
Säule	CarboPac PA 1 (4 x 250 mm)		
Elektrode	Gold		
Potenziale	$E_1 = +0,05 \text{ V}$	$E_2 = +0,6 \text{ V}$	$E_3 = -0,6 \text{ V}$
	$t_1 = 480 \text{ msec}$	$t_2 = 120 \text{ msec}$	$t_3 = 60 \text{ msec}$

Die Oligosaccharide wurden anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert. Die Retentionszeiten für neutrale Oligosaccharide liegen in der Regel unter 16 min, saure Oligosaccharide eluieren später (KUNZ *et al.* 1996).

3.1.2.2 Nano-Elektrospray Massenspektrometrie

Darüber hinaus wurden die HMO-Fractionen mit einem Quadrupol *Time-of-flight* Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisierung (ESI-Q-TOF-MS) analysiert. Die Ionisierung erfolgte mittels *Z-Spray Atmospheric Pressure Ionization* (API) bei einer Temperatur von 80°C. Als Desolvatisierungsgas wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 75 l/h verwendet. Die Oligosaccharid-Fractionen wurden in 0,2% Trifluoressigsäure/Methanol (1:1, vol:vol) in einer Endkonzentration von rund 100 pmol/µl gelöst, in Nanospray-Kapillaren eingebracht und eine Kapillarspannung von 1,1 kV angelegt. Die neutrale HMO-Fraktion wurde im positiven Ionenmodus (ESI(+)) gemessen, die saure HMO-Fraktion im negativen Ionenmodus (ESI(-)).

Die Erhebung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem MassLynx Windows NT System. Als Kalibrierungsstandard wurde NaI verwendet. Die Massenauflösung der Messungen lag innerhalb von 0,1 amu.

3.2 Humane Endothelzellen

3.2.1 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen

Humane Endothelzellen wurden anhand einer modifizierten Methode nach Jaffe *et al.* (JAFJE *et al.* 1973) aus Nabelschnurvenen isoliert (HUVEC). Die Nabelschnüre wurden vom Evangelischen Krankenhaus und dem St. Josefskrankenhaus in Giessen bzw. vom Middlesex Hospital in London zur Verfügung gestellt.

Die Nabelschnüre wurden direkt nach dem Abnabeln in sterile Becher überführt und für maximal vier Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Isolierung der Endothelzellen wurde jede Nabelschnur auf Verletzungen inspiziert und mit einer sterilen Kompresse gesäubert. An einem Ende der Nabelschnur wurde ein etwa 1 cm breites Stück mit einem Skalpell abgeschnitten, eine Knopfkanüle vorsichtig in die Vene eingeführt und mit einem Kabelbinder befestigt. Die Nabelschnurvenen wurde anschließend über die Knopfkanüle mit 100 ml HBS (*HEPES-Buffered Saline*) gespült. Am anderen Ende der Nabelschnur wurde ebenfalls ein etwa 1 cm breites Stück mit dem Skalpell entfernt, die Vene mit einem Nadeladapter kanüliert und mit einem Kabelbinder fixiert. Der Nadeladapter wurde mit einer Arterienklemme verschlossen. Über die Knopfkanüle wurde eine auf 37°C vorgewärmte Collagenase-Lösung (0,025%, Typ II) eingefüllt und die Knopfkanüle mit einem Drei-Wege-Hahn verschlossen.

Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Nabelschnur vorsichtig massiert, damit sich die Endothelzellen besser vom Subendothel ablösen. Die Collagenase-Endothelzell-Suspension wurde mit 30 ml HBS aus der Nabelschnur gespült und in ein mit 1 ml FCS (*Fetal Calf Serum*) vorgelegtes Röhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 250 x g (Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 15 ml HUVEC-Medium (inklusive 2 µg/ml Amphotericin B als Fungizid) resuspendiert und in eine mit Gelatine (0,2%) beschichtete Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät.

Die HUVEC wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5% in einem CO₂-Inkubator bis zur Konfluenz kultiviert.

Das FCS-haltige Zellmedium wurde aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen dreimal mit RPMI 1640 gewaschen. Durch 2-minütige Inkubation bei 37°C mit 8 ml Trypsin wurden die Zellen von der Unterlage abgelöst und die Zellsuspension anschließend in ein mit 1 ml FCS vorgelegtes Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturflasche wurde zweimal mit je 10 ml RPMI 1640 gewaschen, um noch lose anhaftende Zellen ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen zu überführen. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 250 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in HUVEC-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. HUVEC wurden ausschließlich nach der ersten Passage verwendet.

3.2.2 Charakterisierung der Endothelzellen

3.2.2.1 Nachweis der Zellart

Die HUVEC wurden auf einen 8 Well-Objektträger ausgesät. Nach dem Erreichen eines subkonfluenten Stadiums wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl Aceton:Methanol (1:1, vol:vol) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden die Zellen nicht nur auf dem Objektträger fixiert, sondern auch gleichzeitig permeabilisiert. Das Fixationsreagenz wurde durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl PBS entfernt und die freien Proteinbindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 200 µl FACS-Wash blockiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 200 µl PBS wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 30 min mit dem unkonjugierten Primärantikörper *mouse anti-human vW-factor* (1:10 in FACS-Wash) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden im Anschluss durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl PBS entfernt und die Zellen mit dem Sekundärantikörper *goat anti-mouse:FITC* (1:100 in FACS-Wash) bei Raumtemperatur für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden im Anschluss durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl PBS entfernt. Zur Verstärkung der Fluoreszenzintensität wurden nach dem Entfernen des Trenngitters einige Tropfen *Fluorescent Mounting Medium* auf die Zellen aufgebracht. Das Präparat wurde mit einem Objektgläschen bedeckt, mit handelsüblichem Nagellack versiegelt und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch mit den entsprechenden Filtern für das FITC-Fluorochrom dargestellt. Die Belichtungszeit der Aufnahmen betrug 2 min.

3.2.2.2 Bestimmung der Adhäsionsmolekül-Expression

Zur Bestimmung der Adhäsionsmolekül-Expression nach Inkubation mit TNF- α wurden die HUVEC in 24 Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Bestimmung der Zeit-Wirkungs-Beziehung wurde 24, 8, 6, 4, 3, 2 und 1 Stunde bzw. sofort ($t=0$) vor der weiteren Analyse das Zellkulturmedium aus jeweils sechs Wells entfernt und durch frisches Medium mit TNF- α in einer Endkonzentration von 10 ng/ml ersetzt. Darüber hinaus wurde das Zellkulturmedium aus sechs weiteren Wells entfernt und durch frisches Medium ohne TNF- α ersetzt (unstimulierte Kontrolle). Die Zellen aus fünf Wells eines gleichen Inkubationszeitpunktes bzw. der unstimulierten Kontrolle wurden wie folgt auf die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin (CD62E), P-Selektin (CD62P), ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) bzw. VCAM-1 (CD106) untersucht. Die Zellen des jeweils sechsten Wells dienten als Isotypen-Negativkontrollen.

Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml MCDB 131 und einem weiteren Waschschrift mit 0,5 ml Acutase, wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit weiteren 0,5 ml Acutase inkubiert. Anschließend wurden die HUVEC mit sterilen Einmal-Pasteur-Pipetten in FACS-Röhrchen überführt. Die Wells wurden mit 1 ml PBS (+ 5% FCS + 0,02% Natriumazid) gewaschen und die Suspension ebenfalls in die FACS-Röhrchen überführt. Die Zell-Suspensionen wurden bei Raumtemperatur für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Zell-Pellets wurden in 40 μ l *mouse anti-human* CD62E: CyChrome, 40 μ l *mouse anti-human* CD62P: PE, 20 μ l *mouse anti-human* CD54, 20 μ l *mouse anti-human* CD102 bzw. 20 μ l *mouse anti-human* CD106: PE resuspendiert. Nach Inkubation bei 4°C für 30 min wurden die Ansätze mit jeweils 2 ml PBS versetzt, bei Raumtemperatur für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Antikörpern verworfen. Die Pellets der mit unkonjugierten Antikörpern inkubierten Ansätze (CD54 und CD102) wurden jeweils in 20 μ l des Sekundäntikörpers *goat anti-mouse*: PE resuspendiert, erneut für 30 min inkubiert und anschließend gewaschen. Die Pellets aller Ansätze wurden schließlich in jeweils 500 μ l PBS (+ 0.02% Natriumazid) resuspendiert.

Für die Isotypen-Negativkontrollen wurden die Zellen des verbleibenden sechsten Wells eines gleichen Inkubationszeitpunktes bzw. der unstimulierten Kontrolle in zwei Aliquots aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit *anti-mouse* IgG1: PE markiert, die andere Hälfte mit *anti-mouse* IgG1: CyChrome.

Die Expression der Adhäsionsmoleküle wurde nach dem Prinzip der direkten bzw. indirekten Einfarbenimmunofluoreszenz am Durchflusszytometer mit den folgenden Einstellungen bestimmt (FSC: *Forward-Scatter*, SSC: *Side-Scatter*, FL-x: *Fluorescence signal-x*):

Parameter	Spannung [mV]	Amplifikation [-]	Modus
FSC	[Filter E02]	-	Log
SSC	404	-	Log
FL-2	708	-	Log
FL-3	730	-	Log

Es wurden keine Schwellenwerte definiert. Da FL-2 und FL-3 unabhängig voneinander gemessen wurden, musste keine Kompensation der Parameter durchgeführt werden. Die Zellen wurden bei mittlerer Fließgeschwindigkeit analysiert und die Daten für jeweils 5.000 Messereignisse gesammelt.

Zur Bestimmung der unspezifischen Antikörperbindung wurde bei der Messung der mit dem Isotypen-Negativkontrollantikörper *anti-mouse* IgG1:PE markierten Zellen das Signal für den Parameter FL-2 so amplifiziert, dass nahezu alle Zellen eine Fluoreszenzintensität von unter 10^1 aufwiesen. Gleiches wurde für den Parameter FL-3 mit den *anti-mouse* IgG1:CyChrome markierten Zellen durchgeführt. Eine gemessene Fluoreszenzintensität, die 98% der Intensität der jeweiligen Isotypen-Negativkontrollen überstieg, wurde als spezifische Antikörperbindung gewertet.

Zur Bestimmung der Veränderung der Adhäsionsmolekül-Expression nach Inkubation mit TNF- α wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der mit TNF- α -inkubierten Zellen ($MFI_{stim(t)}$) zur MFI der unstimulierten Kontrolle (MFI_{unstim}) in Relation gesetzt:

$$\frac{MFI_{stim(t)}}{MFI_{unstim}}$$

3.3 Humane Leukozyten und Thrombozyten

3.3.1 Isolierung und Charakterisierung von Monozyten und Lymphozyten

3.3.1.1 *Isolierung von Monozyten und Lymphozyten*

Monozyten und Lymphozyten wurden aus typisierten, ungepoolten *Buffy-coats* gesunder Spender isoliert. Die *Buffy-coats* wurden von der Blutbank des Universitätsklinikums Giessen zur Verfügung gestellt.

3.3.1.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

Die mononukleären Zellen wurden zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation aufkonzentriert. Vier *Buffy-coats* (je ca. 50 ml) wurden jeweils auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und mit Waschpuffer auf 50 ml aufgefüllt. Jeweils 30 ml der so verdünnten *Buffy-coats* wurden auf 15 ml Ficoll aufgeschichtet und anschließend bei Raumtemperatur für 35 min bei 700 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und der Monozyten/Lymphozytensaum mit einer Pipette aufgenommen. Die nach Spendern vereinten Fraktionen wurden anschließend mit Waschpuffer auf 50 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 10 min bei 350 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet erneut in 50 ml Waschpuffer resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 10 ml Elutriationspuffer suspendiert (MAYER *et al.* 2002).

3.3.1.1.2 Elutriation

Die Elutriation ermöglicht eine Trennung von Zellen aufgrund von Unterschieden in Größe und Dichte durch die Erzeugung zweier entgegengesetzt wirkender Kräfte in einer Separationskammer. Die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft wird durch die Rotation des Zentrifugenrotors generiert. Die nach innen gerichtete Zentripedalkraft wird durch einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom aufgebaut, der durch eine Pumpe erzeugt wird. Aufgrund der speziellen Geometrie der Separationskammer entsteht ein Fließgeschwindigkeitsgradient. Zellen mit unterschiedlichen Sedimentationsraten können so in verschiedenen Zonen in Suspension gehalten werden. Durch das Erhöhen der Fließgeschwindigkeit (Zentripedalkraft) oder die Verringerung der Rotordrehzahl (Zentrifugalkraft) ist es möglich, schrittweise homogene Zellpopulationen aus der Separationskammer auszuspülen. Die erste Fraktion enthält Zellen kleiner Größe und

geringer Dichte (FIGDOR *et al.* 1983, MASON UND WEINER 1985). Das Funktionsprinzip der Elutriation ist in Abbildung 12 dargestellt.

Vor der Inbetriebnahme des Elutriationssystems wurde die Separationskammer sowie alle Schläuche über Nacht mit Detergenz gereinigt und das System anschließend mit 2 l sterilem Wasser gespült. Für die Aufreinigung von Monozyten und Lymphozyten wurde eine konstante relative Zentrifugalkraft von $2.400 \times g$ gewählt. Vor dem Injizieren wurde die Zellsuspension durch einen Leukozytenfilter filtriert. Die Durchflussrate des Elutriationspuffers wurde durch die Pumpe sukzessive erhöht. Die ersten 200 ml wurden verworfen. Die folgenden 1.000 ml wurden zu 50 ml Fraktionen jeweils in einem mit $200 \mu\text{l}$ HSA (Humanes Serumalbumin) vorgelegten Röhrchen gesammelt.

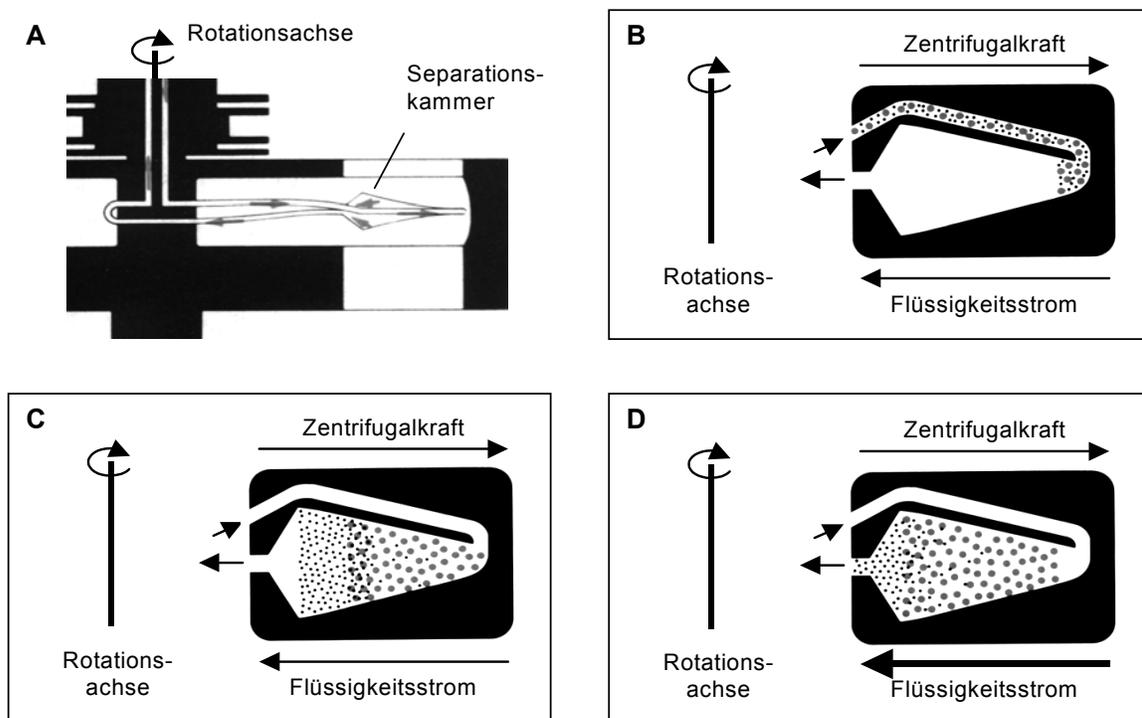


Abbildung 12. FUNKTIONSPRINZIP DER ELUTRIATION.

A: Die Separationskammer bewegt sich im Zentrifugenrotor um die Zentrifugenachse.

B: Durch die Rotation der Separationskammer um die Zentrifugenachse wird eine nach außen gerichtete Zentrifugalkraft erzeugt. Die Zellsuspension wird von der Zentrifugenachse aus in die Kammer eingebracht und so umgeleitet, dass der Flüssigkeitsstrom nach innen gerichtet ist.

C: Zellen mit unterschiedlichen Sedimentationsraten werden aufgrund der speziellen Geometrie der Separationskammer in verschiedenen Zonen in Suspension gehalten.

D: Durch die sukzessive Erhöhung der Fließgeschwindigkeit werden relativ homogene Zellpopulationen aus der Separationskammer ausgespült.

(modifiziert nach: Bedienungsanleitung des Beckman Coulter J6-MC Elutriators, 1990)

3.3.1.2 Bestimmung der relativen Monozyten- und Lymphozyten-Konzentration

Zur Bestimmung der relativen Monozyten- bzw. Lymphozyten-Konzentrationen wurden die Zellen jeder aus dem Elutriationssystem eluierten Fraktion durchflusszytometrisch analysiert. Die Anzahl der anhand ihrer Größe und Granularität charakterisierten Monozyten bzw. Lymphozyten wurde zur Gesamtzellzahl in Relation gesetzt. Fraktionen mit einer relativen Monozyten- bzw. Lymphozyten-Konzentration von über 90% wurden bei Raumtemperatur für 10 min bei 350 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in Leukozytenmedium in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen pro ml resuspendiert und zu einer Monozyten- bzw. Lymphozytenfraktion vereinigt. Die relative Monozyten- bzw. Lymphozyten-Konzentration der gepoolten Fraktionen wurde erneut durchflusszytometrisch bestimmt.

3.3.1.3 Charakterisierung der Lymphozyten

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Lymphozyten zunächst von den Monozyten abgegrenzt, und anschließend das Verhältnis von T- und B-Lymphozyten sowie das Verhältnis von T-Helfer- und T-Suppressorzellen bestimmt. Die dazu verwendeten Test-Kits beruhen auf dem Prinzip der direkten Zweifarbenimmunofluoreszenz. Die so markierten Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.1.3.1 Lymphozyteneingrenzung

Da Monozyten und Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden können und die Übergänge fließend sind, wurden die Lymphozyten mittels Simultest LeucoGATE (CD45/CD14) eingegrenzt. Mit diesem Test-Kit wird die Gesamtheit der Monozyten und Lymphozyten mit einem Leukozyten-spezifischen Antikörper (CD45:FITC) markiert. Darüber hinaus werden ausschließlich Monozyten mit einem weiteren Antikörper (CD14:PE) von den Lymphozyten abgegrenzt.

3.3.1.3.2 T/B-Lymphozytenverhältnis (CD3⁺/CD19⁺)

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten wurden die Lymphozyten mittels Simultest CD3/CD19 analysiert. Mit diesem Test-Kit werden T-Lymphozyten mit einem zellspezifischen Antikörper (CD3:FITC) markiert, während die B-Lymphozyten mit einem anderen zellspezifischen Antikörper (CD19:PE) unterschieden werden.

3.3.1.3.3 Helfer/Suppressor-Lymphozytenverhältnis (CD4⁺/CD8⁺)

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils von Helfer-/Inducer-Lymphozyten und Suppressor-/zytotoxischer Lymphozyten wurden die Lymphozyten mittels Simultest CD4/CD8 analysiert. Mit diesem Test-Kit werden Helfer-/Inducer-Lymphozyten mit einem zellspezifischen Antikörper markiert (CD4:FITC), während Suppressor- bzw. zytotoxische Lymphozyten mit einem anderen zellspezifischen Antikörper (CD8:PE) unterschieden werden.

3.3.1.3.4 Durchflusszytometrische Analyse

Die nach den Test-Protokollen markierten und fixierten Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zur Bestimmung unspezifischer Bindungen wurde das Simultest Control Reagenz mit *anti-mouse* IgG1:FITC und *anti-mouse* IgG2a:PE als Isotypen-Negativkontrolle verwendet.

3.3.2 Isolierung und Charakterisierung von Granulozyten

3.3.2.1 *Isolierung neutrophiler Granulozyten*

10 ml heparinisertes Blut (5 IU pro ml Blut) gesunder Freiwilliger wurde mit 1 ml einer 0,9%-igen Natriumchlorid-Lösung und 1 ml einer 10%-igen Dextran-Lösung versetzt und zum Agglutinieren der Erythrozyten für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgezogen und auf ein gleiches Volumen Lymphoprep (Dichte: 1,077 g/ml) geschichtet. Nach der Dichtegradientenzentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min bei 500 x g befanden sich die neutrophilen Granulozyten im Pellet. Der Überstand wurde verworfen. Um restliche Erythrozyten zu entfernen wurde das Pellet in 1 ml sterilem Wasser (pyrogenfrei) resuspendiert. Die für diese hypoosmolaren Bedingungen anfälligeren Erythrozyten wurden dadurch lysiert. Um eine Schädigung der neutrophilen Granulozyten zu verhindern, wurde die Lyse nach 15 Sekunden mit 12 ml einer 1,8%-igen Natriumchlorid-Lösung unterbrochen. Durch die anschließende Zentrifugation bei Raumtemperatur für 7 min bei 450 x g wurden die Erythrozytentrümmer mit dem Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Leukozytenmedium aufgenommen und die Suspension auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.3.2.2 **Bestimmung der relativen Granulozyten-Konzentration und der Granulozyten-Aktivität**

Zur Bestimmung der relativen Granulozyten-Konzentration und der Granulozyten-Aktivität wurden 50 µl der Zellsuspension bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 10 min mit 5 µl *mouse anti-human* CD11b:FITC (1:1 in FACS-Wash), mit 5 µl *mouse anti-human* CD15s:FITC (1:1 in FACS-Wash) oder mit dem Isotypen-Negativkontrollantikörper *anti-mouse* IgG1:FITC inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit je 250 µl PBS und 250 µl FACS-Fix versetzt und somit fixiert.

Die Zellsuspension wurde nach dem Prinzip der direkten Einfarbenimmunofluoreszenz am Durchflusssytometer mit den folgenden Einstellungen analysiert:

Parameter	Spannung [mV]	Amplifikation [-]	Modus
FSC	[Filter E-1]	5,5	Lin
SSC	377	1,0	Lin
FL-1	505	-	Log

Es wurden keine Schwellenwerte definiert. Die Zellsuspension wurde bei mittlerer Fließgeschwindigkeit analysiert und die Daten für jeweils 5.000 Messereignisse gesammelt.

Zur Bestimmung der relativen Granulozyten-Konzentration wurde die Anzahl der anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) charakterisierten Granulozyten zur Gesamtzellzahl in Relation gesetzt. Zur Bestimmung der Granulozyten-Aktivität wurde die Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten CD11b- bzw. CD15s-Antikörpers mit der Intensität des Isotypen-Negativkontrollantikörpers verglichen. Eine gemessene Fluoreszenzintensität, die 98% der Intensität der Isotypen-Negativkontrolle überstieg, wurde als spezifische Antikörperbindung gewertet.

3.3.3 Isolierung und Charakterisierung von Thrombozyten

3.3.3.1 *Isolierung humaner Thrombozyten*

Gesunden Freiwilligen wurden etwa 10 ml Blut entnommen. Die ersten 2 ml Blut wurden verworfen, um bei der Entnahme aktivierte Thrombozyten zu vermeiden. Als Antikoagulanzen wurde Natriumcitrat in einer Endkonzentration von 0,38% zugesetzt. Das Blut wurde bei Raumtemperatur für 10 min bei 150 x g zentrifugiert und anschließend das Thrombozyten-reiche Plasma abgenommen. Um eine Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten zu reduzieren, wurde Prostacyclin in einer Endkonzentration von 30 ng/ml zugesetzt. Das Thrombozyten-reiche Plasma wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 800 x g zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Pellet in HBSS (-/-) (*Hank's Balanced Salt Solution*) resuspendiert. Es wurde erneut Prostacyclin in einer Endkonzentration von 30 ng/ml zugesetzt. Um die Zahl kontaminierender Zellen zu reduzieren, wurde eine weitere Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min bei 150 x g angeschlossen. Kontaminierende Zellen wurden mit dem Pellet verworfen. Der Thrombozyten-reiche Überstand wurde ein zweites Mal bei 800 x g zentrifugiert, das Pellet in HBSS (-/-) mit Prostacyclin-Zusatz resuspendiert und bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal bei 800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in HBSS (+/+) ohne Prostacyclin resuspendiert und auf eine Konzentration von 300×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.3.3.2 *Bestimmung der Thrombozyten-Aktivität*

Zur Bestimmung der Thrombozyten-Aktivität wurden 50 µl der Zellsuspension bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 10 min mit 5 µl *mouse anti-human CD62P: CyChrome* (1:1 in FACS-Wash) oder mit dem Isotypen-Negativkontrollantikörper *anti-mouse IgG1: CyChrome* inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit je 250 µl PBS und 250 µl FACS-Fix versetzt und somit fixiert.

Die Zellsuspension wurde nach dem Prinzip der direkten Einfarbenimmunofluoreszenz am Durchflusszytometer mit den folgenden Einstellungen analysiert:

Parameter	Spannung [mV]	Amplifikation [-]	Modus
FSC	[Filter E-1]	5,5	Log
SSC	377	1,0	Log
FL-3	407	-	Log

Es wurden keine Schwellenwerte definiert. Die Zellsuspension wurde bei mittlerer Fließgeschwindigkeit analysiert und die Daten für jeweils 5.000 Messereignisse gesammelt.

Zur Bestimmung der Thrombozyten-Aktivität wurde die Fluoreszenzintensität des CyChrome-konjugierten CD62P-Antikörpers mit der Intensität des Isotypen-Negativkontrollantikörpers verglichen. Eine gemessene Fluoreszenzintensität, die 98% der Intensität der Isotypen-Negativkontrolle überstieg, wurde als spezifische Antikörperbindung gewertet.

3.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Bei der Selektin-vermittelten Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen handelt es sich um einen dynamischen Prozess, bei dem die Geschwindigkeit von sich bewegenden Zellen vermindert wird. Aus diesem Grund wurden die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und der Einfluss der Oligosaccharide auf diesen Prozess anhand eines *In-vitro*-Flussmodells untersucht (MAYER *et al.* 2002).

3.4.1 Kultivierung und Inkubation der Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden für die Flow-Versuche auf Plastik-Coverslips kultiviert. Je ein Coverslip wurde mit einer sterilen Pinzette in die Wells einer 4 Well-Platte (rechteckig) gelegt. Zum Beschichten mit einer extrazellulären Matrix wurden die Coverslips mit 2 ml Fibronectin (0,002%) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Fibronectin-Lösung entfernt. Pro Well wurden 5×10^5 Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

Zur maximalen Expression von E-Selektin auf den Endothelzellen wurde vier Stunden vor dem eigentlichen Durchflussversuch das Zellmedium in der 4 Well-Platte entfernt und durch frisches HUVEC-Medium mit TNF- α in einer Endkonzentration von 10 ng/ml ersetzt. Für Versuche mit nicht aktivierten Endothelzellen wurde HUVEC-Medium ohne TNF- α verwendet.

Eine Stunde vor dem eigentlichen Durchflussversuch wurden das Zellkulturmedium mit Oligosacchariden (in PBS) oder einem äquivalenten Volumen PBS supplementiert.

3.4.2 *In-vitro*-Flussmodell

Die auf dem Plastik-Coverslip kultivierten Endothelzellen wurden mit einer Pinzette auf einen Objektträger in das Stahlgestell der Durchflusskammer gelegt. Das Gefäßvolumen über der Endothelzellschicht wurde durch einen Abstandshalter (Teflonmaske 0,1 mm) simuliert. Die anschließend aufgelegte Polyacrylat-Kammer verfügt auf beiden Seiten über Luer-Adapter an die über Drei-Wege-Hähne und Infusionsleitungen eine 50 ml Infusionsspritze mit Flussmedium von 37°C angeschlossen wurde. Das Prinzip des Durchflusskammersystems ist in Abbildung 13 dargestellt.

0,5 ml der jeweiligen Leukozyten-Suspension (4×10^6 Leukozyten pro ml) wurden mit einer 1 ml Infusionspritze über den kammernahen Drei-Wege-Hahn in die vorgeschaltete Infusionsleitung injiziert. Die Leukozyten wurden gleichmäßig und pulslos durch den von einer Mikroperfusionspumpe generierten hydrostatischen Druck mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 6,7 ml/h über die Endothelzellen geleitet. Die Kammergeometrie gewährleistet einen planar-laminaren Flüssigkeitsstrom, der mit dem radial-laminaren Blutstrom vergleichbar ist. Die verwendete Flussgeschwindigkeit entsprach einer physiologischen *shear*-Kraft von 1 dyne/cm^2 (MAYER *et al.* 2002).

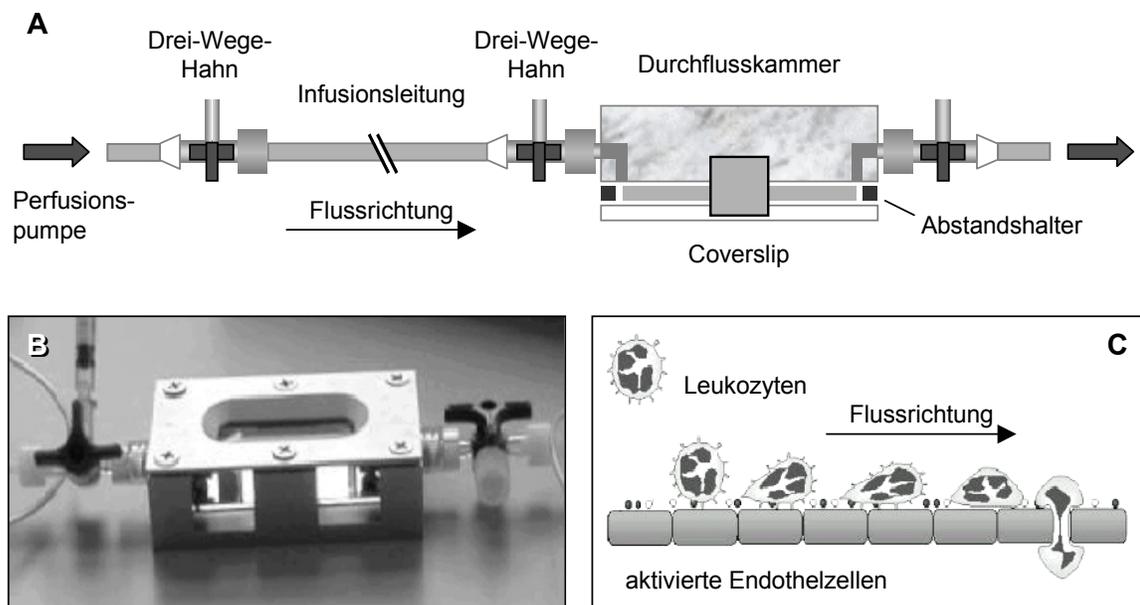


Abbildung 13. FUNKTIONSPRINZIP DER DURCHFLUSSKAMMER

A: Schematische Darstellung der Durchflusskammer. Der durch die Perfusionspumpe generierte Fluss leitet die zuvor über den kammernahen Drei-Wege-Hahn in die Infusionsleitung injizierten Leukozyten über die auf dem Coverslip kultivierten Endothelzellen. Der Abstandshalter über den Endothelzellen simuliert das Gefäßvolumen. Nicht-adhärenente Zellen verlassen die Durchflusskammer auf der gegenüberliegenden Seite.

B: Foto der Durchflusskammer. Die Aussparungen im Stahlgehäuse ermöglichen die Beobachtung unter dem Mikroskop. Auf dem Drei-Wege-Hahn auf der linken Kammerseite steckt die Infusionspritze, mit der die Leukozyten injiziert werden.

C: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Durchflusskammer.

3.4.3 Auswertung

Mit Hilfe eines Video-Mikroskopie-Systems wurde bei 100-facher optischer Vergrößerung sowohl das *Rolling* der Leukozyten während der Passage über die Endothelzellen als auch die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel dokumentiert und ausgewertet.

Während der 10-minütigen Passage wurden Leukozyten als rollend gewertet, die sich im Vergleich zum normalen Leukozyten-Strom deutlich langsamer über die Endothelzellen bewegten. Nach der 10-minütigen Passage wurden fünf repräsentative Videostandbilder von verschiedenen Arealen der Endothelzell-Oberfläche aufgenommen. Die in den phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen deutlich helleren Leukozyten wurden jeweils gezählt und der Mittelwert der fünf Einzelwerte berechnet.

Zur Bestimmung der Effekte der verschiedenen Oligosaccharide auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurde die Anzahl der rollenden bzw. adhärenen Leukozyten nach Inkubation der Endothelzellen mit Oligosacchariden ($Zellen_{\text{Oligosaccharide}}$) zur Anzahl der Leukozyten in Relation gesetzt, die über Endothelzellen rollen bzw. daran adhären, ohne dass die Endothelzellen zuvor mit Oligosacchariden inkubiert wurden ($Zellen_{\text{PBS}}$).

$$\frac{Zellen_{\text{Oligosaccharide}}}{Zellen_{\text{PBS}}} \times 100\%$$

Für jede Variable wurden jeweils mindestens sieben unabhängige Experimente durchgeführt. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mittels gepaartem, zweiseitigen *t*-test berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der Oligosaccharid-Standards oder -Fraktionen wurden bei gleicher Anzahl an Messwerten mittels gepaartem sonst mit ungepaartem, zweiseitigen *t*-test berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde jeweils als signifikant betrachtet.

3.5 Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen

Gesunden Freiwilligen wurden etwa 5 ml Blut entnommen. Die ersten 2 ml Blut wurden verworfen, um bei der Entnahme aktivierte Thrombozyten zu vermeiden. Als Antikoagulanz wurde Natriumcitrat in einer Endkonzentration von 0,38% zugesetzt. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurde das Blut bei 37°C für 5 min mit ADP in einer Endkonzentration von 10 μ M inkubiert und anschließend mit HMO oder Oligosaccharid-Standards versetzt und weiter inkubiert. Sowohl die Expression relevanter Granulozyten-Adhäsionsmoleküle als auch die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wurden konfokalmikroskopisch dargestellt. Der Einfluss der Oligosaccharide auf die Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Granulozyten wurde durchflusszytometrisch untersucht.

3.5.1 Konfokalmikroskopische Charakterisierung

3.5.1.1 Markierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern

Zur Lyse der Erythrozyten wurden 50 μ l des ADP-stimulierten Blutes für 2 min mit 250 μ l FACS-Lyse inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 250 μ l FACS-Fix wurde die Zelllyse gestoppt und die Zellen fixiert. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut bei Raumtemperatur für 5 min bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entweder zur Darstellung der Granulozyten-Adhäsionsmoleküle oder zur Darstellung der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

3.5.1.1.1 Granulozyten-Adhäsionsmoleküle

Das Pellet wurde in 10 μ l *mouse anti-human* CD11b:FITC oder *mouse anti-human* CD15s:FITC (1:1 in FACS-Wash) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde der Ansatz mit 1 ml PBS versetzt, für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Antikörpern verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, erneut für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Kernfärbung wurde das Pellet anschließend in 2 μ l TO-PRO-3 Iodid (1:10 in FACS-Wash) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurde der Ansatz mit 1 ml PBS versetzt und für 5 min bei 150 x g

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 µl PBS resuspendiert und anschließend ein Mikroskopie-Präparat erstellt.

3.5.1.1.2 Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung

Das Pellet wurde in 10 µl *mouse anti-human CD62P* (1:1 in FACS-Wash) resuspendiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min wurde der Ansatz mit 1 ml PBS versetzt, für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Antikörpern verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 µl des Sekundärantikörpers *goat anti-mouse: Cy5* (1:10 in FACS-Wash) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurde der Ansatz mit 1 ml PBS versetzt, für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Antikörpern verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 150 x g zentrifugiert. Zum Blockieren freier Bindungsstellen des Sekundärantikörpers wurde das Pellet in 50 µl Mausserum (5% in PBS; inaktiviert) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurde der Ansatz mit 1 ml PBS versetzt, für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Serumproteinen verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 µl *mouse anti-human CD11b: FITC* (1:1 in FACS-Wash) resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurde der Ansatz mit 1 ml PBS versetzt, für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Antikörpern verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 µl PBS resuspendiert und anschließend ein Mikroskopie-Präparat erstellt.

3.5.1.2 Erstellung der Mikroskopie-Präparate

Jeweils 20 µl der mit Antikörpern markierten Zellsuspensionen wurden auf einen mit Poly-Lysin beschichteten Objektträger aufgebracht, im Inkubator bei 37°C getrocknet und somit fixiert. Zur Verstärkung der Fluoreszenzintensität wurden etwa drei Tropfen *Citifluor* auf den Objektträger aufgebracht, das Präparat mit einem Objektgläschen bedeckt und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Die Objekte wurden bis zur mikroskopischen Betrachtung bei -20°C gelagert.

3.5.1.3 Konfokalmikroskopische Darstellung

Die Präparate wurden mit einem Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop bei 400-facher optischer Vergrößerung mit den entsprechenden Filtern dargestellt. FITC wurde bei einer Wellenlänge von 433 nm mit einer relativen Laserintensität von 50% angeregt und die emittierte Strahlung in einem Wellenlängenbereich zwischen 450 und 550 nm gefiltert und als Signal gebündelt. Cy5 und TO-PRO-3 Iodid wurden bei einer Wellenlänge von 633 nm mit einer relativen Laserintensität von 15% bzw. 6% angeregt und die emittierte Strahlung in einem Wellenbereich zwischen 650 und 750 nm gefiltert und als Signal gebündelt. Pro optischem Schnitt wurde das Signal von 16 Aufnahmen gemittelt. Drei optische Schnitte (0,5 µm) wurden aufgenommen und mit der *Leica Confocal Imaging*-Software überlagert.

3.5.2 Durchflusszytometrische Bestimmung

50 µl des mit ADP-stimulierten und teilweise mit Oligosacchariden inkubierten Vollblutes wurden bei 37°C unter Lichtausschluss für 10 min mit 5 µl des Granulozyten-Aktivitätsmarkers *mouse anti-human* CD11b:FITC (1:1 in FACS-Wash) und 10 µl des Thrombozyten-Markers *mouse anti-human* CD42a:PerCP (1:1 in FACS-Wash) inkubiert. Anstelle dieser Antikörper wurde zur Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen ein weiterer Ansatz mit den Isotypen-Negativkontrollantikörpern *anti-mouse* IgG1:FITC und *anti-mouse* IgG2a:PerCP inkubiert. Danach wurde das Blut zur Lyse der Erythrozyten für 2 min mit 250 µl FACS-Lyse versetzt. Durch die anschließende Zugabe von 250 µl FACS-Fix wurde die Zelllyse gestoppt und die Zellen fixiert. Die Zellsuspension wurde nach dem Prinzip der direkten Zweifarbenimmunofluoreszenz am Durchflusszytometer mit den folgenden Einstellungen analysiert (PETERS *et al.* 1997):

Parameter	Spannung [mV]	Amplifikation [-]	Modus
FSC	[Filter E-1]	5,5	Lin
SSC	377	1,0	Lin
FL-1	505	-	Log
FL-3	560	-	Log

Um die Detektion von Zelltrümmern zu minimieren wurde für FSC ein Schwellenwert von 135 definiert. Wegen der gleichzeitigen Messung von FL-1 und FL-3 wurde eine Kompensation der Parameter vorgenommen (FL-1/FL-2 -0,9%; FL-2/FL-1 -24%; FL-2/FL-3 0%; FL-3/FL-2 15%).

Die Zellen wurden bei höchster Fließgeschwindigkeit analysiert. Granulozyten wurden anhand ihrer Größe und Granularität eingegrenzt. Die Daten für jeweils 5.000 dieser so eingegrenzten Messereignisse wurden gesammelt.

Zur Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen wurde bei der Messung der mit dem Isotypen-Negativkontrollantikörper *anti-mouse* IgG1:FITC markierten Zellen das Signal für den Parameter FL-1 so amplifiziert, dass nahezu alle Zellen eine Fluoreszenzintensität von unter 10^1 aufwiesen. Gleiches wurde für den Parameter FL-3 mit den *anti-mouse* IgG2a:PerCP markierten Zellen durchgeführt. Eine gemessene Fluoreszenzintensität, die 98% der Intensität der jeweiligen Isotypen-Negativkontrollen überstieg, wurde als spezifische Antikörperbindung gewertet.

Messereignisse, die sowohl mit dem Granulozyten-Marker CD11b als auch mit dem Thrombozyten-Marker CD42a markiert waren, wurden als Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe gewertet. Zur Bestimmung der Effekte der verschiedenen Oligosaccharide auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) für CD42a der ADP-stimulierten Probe mit Inkubation von Oligosacchariden ($\text{MFI (CD42a)}_{\text{ADP+Oligosaccharide}}$) mit der MFI der ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden ($\text{MFI (CD42a)}_{\text{ADP}}$) in Relation gesetzt:

$$\frac{\text{MFI (42a)}_{\text{ADP+Oligosaccharide}}}{\text{MFI (42a)}_{\text{ADP}}} \times 100\%$$

Zur Quantifizierung der Granulozyten-Aktivität wurde die MFI für CD11b der ADP-stimulierten Probe mit Inkubation von Oligosacchariden ($\text{MFI (CD11b)}_{\text{ADP+Oligosaccharide}}$) mit der MFI der ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden ($\text{MFI (CD11b)}_{\text{ADP}}$) in Relation gesetzt:

$$\frac{\text{MFI (11b)}_{\text{ADP+Oligosaccharide}}}{\text{MFI (11b)}_{\text{ADP}}} \times 100\%$$

3.6 Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

3.6.1 Untersuchungen mit isolierten Thrombozyten und Granulozyten

Gesunden Freiwilligen wurden etwa 32 ml Blut entnommen. Die ersten 2 ml Blut wurden verworfen, um bei der Entnahme aktivierte Thrombozyten zu vermeiden. Aus 20 ml Vollblut wurden Granulozyten nach der in Abschnitt 3.3.2.1 beschriebenen Methode isoliert. Als Antikoagulanzen wurde zuvor Heparin zugesetzt (5 IU pro ml Blut). Die Konzentration der isolierten Zell-Suspension wurde auf 8×10^6 Granulozyten pro ml Leukozyten-Medium eingestellt. Aus den restlichen 10 ml Vollblut wurden Thrombozyten nach der Methode in Abschnitt 3.3.3.1 isoliert. Als Antikoagulanzen wurde zuvor Natriumcitrat in einer Endkonzentration von 0,38% zugesetzt. Die Konzentration der isolierten Zell-Suspension wurde auf $0,6 \times 10^6$ Thrombozyten pro ml HBSS(+/-) eingestellt.

Um die physiologischen Konzentrationsverteilungen des Vollbluts zu simulieren (GAEHTGENS 1994), wurden 0,5 ml der Granulozyten-Suspension (4×10^6 Zellen) und 0,5 ml der Thrombozyten-Suspension ($0,3 \times 10^6$ Zellen) vereinigt. Die unstimulierte bzw. die für 5 min mit $10 \mu\text{M}$ ADP stimulierte Granulozyten-Thrombozyten-Suspension wurde durchflusszytometrisch nach der in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Methode analysiert und die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung sowie die CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche bestimmt.

3.6.2 Untersuchungen mit verdünntem Vollblut

Gesunden Freiwilligen wurden etwa 5 ml Blut entnommen. Die ersten 2 ml Blut wurden verworfen, um bei der Entnahme aktivierte Thrombozyten zu vermeiden. Als Antikoagulanzen wurde Natriumcitrat in einer Endkonzentration von 0,38% zugesetzt. Das Vollblut wurde entweder unstimuliert verwendet, oder für 5 min mit $10 \mu\text{M}$ ADP, $1 \mu\text{M}$ TRA oder $1 \mu\text{M}$ fMLP inkubiert. Anschließend wurde das Vollblut 1:5 in Leukozyten-Medium verdünnt und sofort in die Durchflussskammer injiziert.

Zur Bestimmung der Effekte der verschiedenen Inkubationsbedingungen auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurde die Anzahl adhärenter Leukozyten jeweils in Relation zur Anzahl adhärenter Leukozyten aus unstimuliertem Vollblut gesetzt.

Ein Teil des unstimulierten bzw. des stimulierten Blutes wurde durchflusszytometrisch nach der in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Methode analysiert und die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung sowie die CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Charakterisierung der Humanmilch-Oligosaccharide

Die Oligosaccharide in Humanmilch zeigen teilweise strukturelle Ähnlichkeiten mit den Bindungsdeterminanten der Selektin-Liganden (Abschnitt 1.4). Um zu untersuchen, ob HMO als lösliche Liganden-Analoga einen Einfluss auf Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen haben, wurden die Oligosaccharide zunächst aus einer Humanmilchprobe isoliert.

Nach dem Entfernen der Fette und Proteine wurde die Lactose mittels Gelfiltration entfernt. Ein typisches Chromatogramm der Gelfiltration ist in Abbildung 14 A dargestellt. Die Fraktionen im Übergang zwischen den überwiegend Oligosaccharid-haltigen Fraktionen und den überwiegend Lactose-haltigen Fraktionen wurden mittels HPAEC-PAD analysiert. Fraktionen mit mehr als 10% Lactose wurden verworfen, die übrigen Fraktionen gepoolt.

Sialinsäure ist ein essentieller Bestandteil der Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden (Abschnitt 1.2.3). Potentielle Liganden-Analoga sollten deshalb ebenfalls Sialinsäure enthalten. Sialinsäure-haltige Oligosaccharide tragen eine negative Ladung und sollten deshalb mittels Anionenaustauschchromatographie (HPLC) von den neutralen Oligosacchariden getrennt werden, die keine Sialinsäure enthalten. Abbildung 14 B zeigt ein typisches Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie. Die bereits nach wenigen Minuten eluierenden Substanzen wurden in einer ersten Fraktion gepoolt und später mittels HPAEC-PAD (Abschnitt 4.1.1) und Nanospray-MS (Abschnitt 4.1.2) als neutrale Oligosaccharide identifiziert. Die nach dem Einsetzen des Natriumchlorid-Gradienten eluierenden Substanzen wurden in einer zweiten Fraktion gepoolt und als saure Oligosaccharide identifiziert.

Um das Natriumchlorid aus den Fraktionen wieder zu entfernen, wurden die gepoolten Fraktionen mittels Gelfiltration entsalzt. Ein typisches Chromatogramm der Gelfiltration zeigt Abbildung 14 C. Die wesentlich kleineren Salz-Moleküle eluierten später als die Oligosaccharide und konnten dadurch abgetrennt werden.

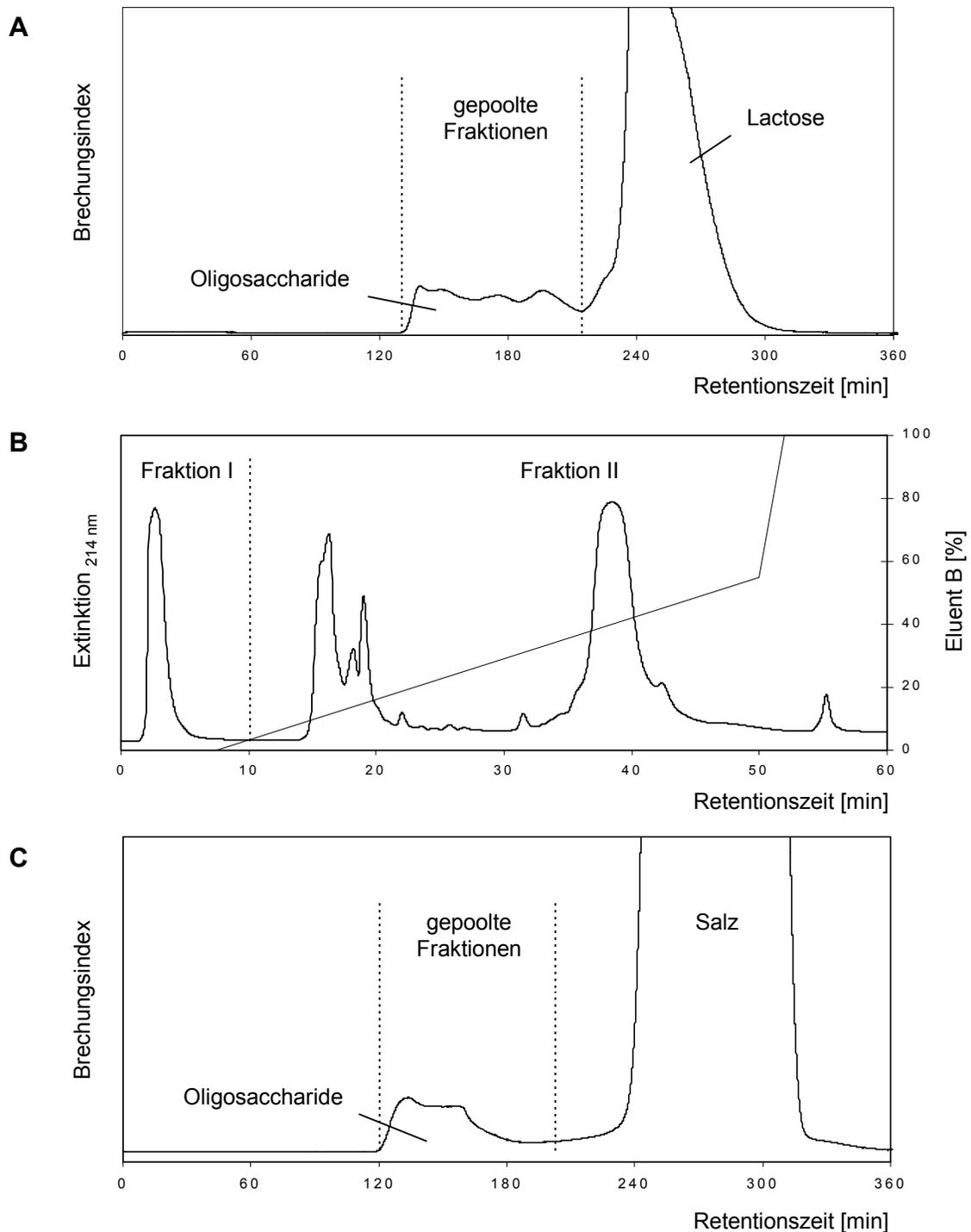


Abbildung 14. CHROMATOGRAPHISCHE ISOLIERUNG VON HMO

A: Chromatogramm der Gelfiltration nach Entfettung und Enteiweißung der Humanmilchprobe. Die Oligosaccharid-Fractionen wurden gepoolt, während Fraktionen mit einem überwiegenden Anteil an Lactose verworfen wurden.

B: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (HPLC) der Gesamt-HMO-Fraktion. Die neutralen (Fraktion I) bzw. sauren HMO (Fraktion II) wurden jeweils gepoolt. Der NaCl-Gradient ist in %-Eluent B angegeben.

C: Chromatogramm der Gelfiltration der sauren HMO-Fraktion nach HPLC. Oligosaccharid-Fractionen wurden gepoolt, während die Salz-Fractionen verworfen wurden.

4.1.1 Charakterisierung mittels HPAEC-PAD

Die Zusammensetzung der neutralen und sauren HMO-Fraktion wurde mittels HPAEC-PAD untersucht. Die Zuordnung der Peaks erfolgte anhand der Retentionszeiten, die für neutrale Oligosaccharide unter 16 min liegen, während saure Oligosaccharide später eluieren. Die HPAEC-PAD-Chromatogramme der nHMO- und sHMO-Fraktion sind in Abbildung 15 dargestellt.

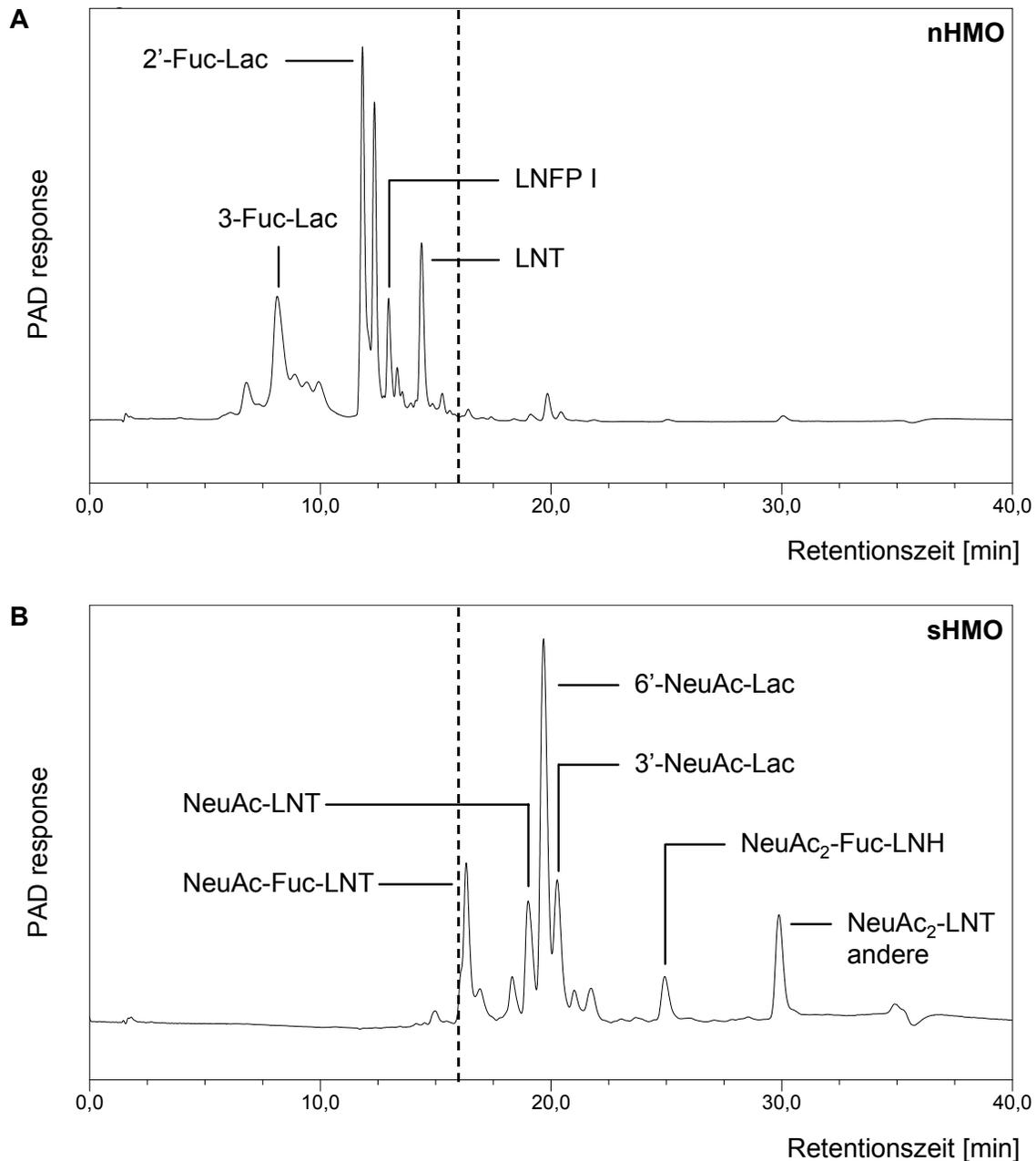


Abbildung 15. HPAEC-PAD DER NEUTRALEN UND SAUREN HMO-FRAKTION

Die neutralen Oligosaccharide (**A**) eluieren mit Retentionszeiten von weniger als 16 min (gestrichelte Linie), während die sauren Oligosaccharide (**B**) später eluieren.

Die nHMO-Fraktion enthielt nur einen geringen Anteil saurer Oligosaccharide. Anhand der Retentionszeiten konnten 2'-Fucosyllactose, 3-Fucosyllactose, LNT und LNFP I identifiziert werden. Die sHMO-Fraktion ist nahezu frei von neutralen Oligosacchariden. Die sialylierten Oligosaccharide 6'-Sialyllactose, 3'-Sialyllactose, Sialyl-fucosyl-LNT, Sialyl-LNT, Disialyl-fucosyl-LNH sowie Disialyl-LNT konnten anhand der Retentionszeiten in der Fraktion identifiziert werden.

4.1.2 Charakterisierung mittels Nanoelektrospray-MS

Zur genaueren Charakterisierung wurden die HMO-Fraktionen mittels Nanoelektrospray-MS untersucht. Die Hauptkomponenten der neutralen HMO-Fraktion konnten als LNT, Fucosyl-LNT, Fucosyllactose und Difucosyllactose identifiziert werden. Darüber hinaus fand sich eine Vielzahl an Minorkomponenten wie Difucosyl-LNT, Mono-, Di- und Trifucosyl-LNH sowie Di-, Tri- und Tetrafucosyl-LNO. Das Massenspektrum der nHMO-Fraktion ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Zuordnung der gemessenen Massen-Ladungsverhältnisse zu den entsprechenden Oligosacchariden und die jeweilige relative Intensität ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Das Massenspektrum der sauren HMO-Fraktion zeigt Abbildung 17. Über die gemessenen Massen-Ladungsverhältnisse konnten Sialyl-LNT, Sialyllactose sowie Sialyl-fucosyl-LNH als die dominierenden Komponenten identifiziert werden. Geordnet nach der relativen Intensität der gemessenen Signale folgten Sialyl-LNH, Disialyl-LNT, Sialyl-difucosyl-LNH, Sialyl-fucosyl-LNT, Sialyl-fucosyllactose sowie Disialyl-LNH. Darüber hinaus konnten in der sHMO-Fraktion eine Vielzahl von Minorkomponenten detektiert werden, die an ihrem Lactosamin-Rückgrat bis zu drei Sialyl- und bis zu vier Fucosyl-Reste trugen. Eine Zuordnung der entsprechenden Oligosaccharide zu den gemessenen Massen-Ladungsverhältnissen und die relative Intensität der entsprechenden Signale sind in Tabelle 5 aufgelistet.

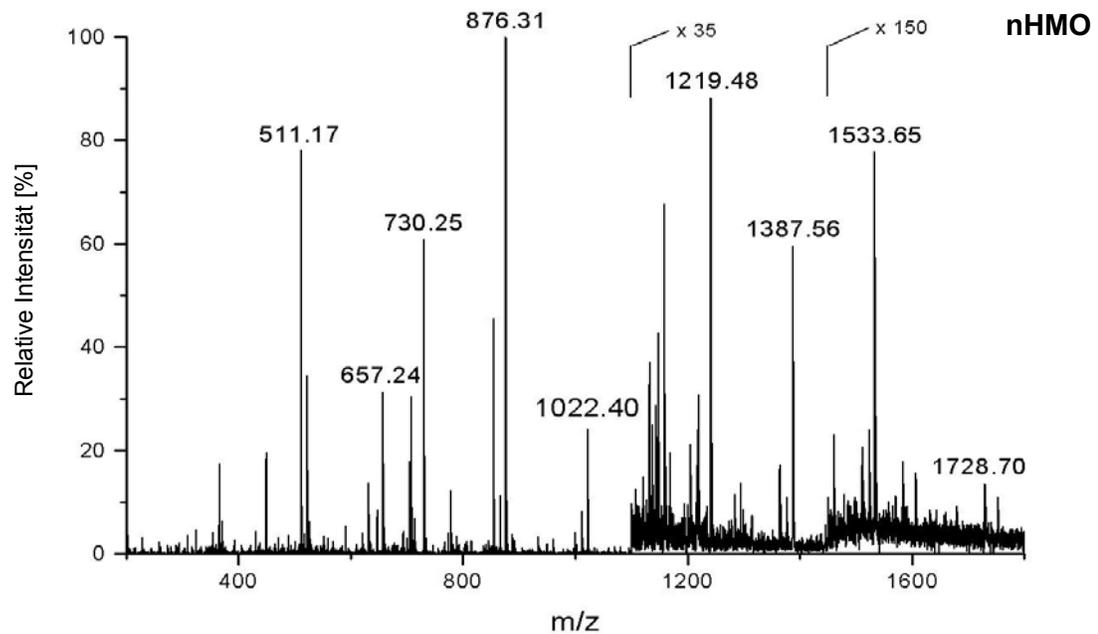


Abbildung 16. MASSENSPEKTRUM DER NEUTRALEN HMO-FRAKTION

Angegeben als relative Intensität bezogen auf das Signal mit der höchsten Intensität (100%). Die relativen Intensitäten wurden im Massen-Ladungsbereich (m/z) zwischen 1.100 und 1.450 um den Faktor 35 und danach um den Faktor 150 vergrößert dargestellt.

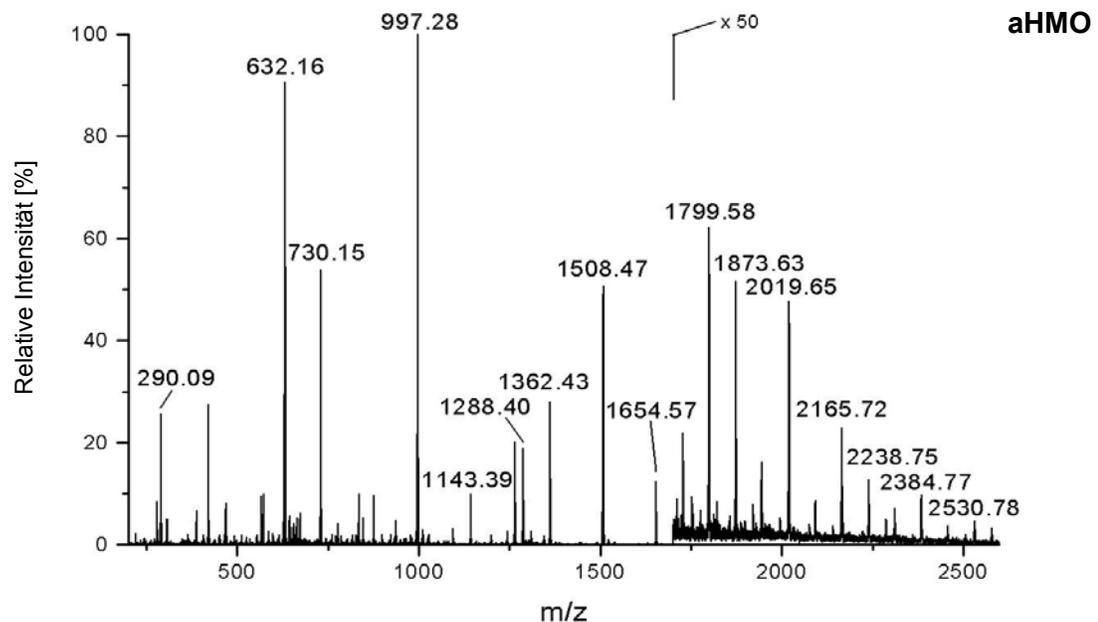


Abbildung 17. MASSENSPEKTRUM DER SAUREN HMO-FRAKTION

Angegeben als relative Intensität bezogen auf das Signal mit der höchsten Intensität (100%). Die relativen Intensitäten wurden im Massen-Ladungsbereich (m/z) ab 1.700 um den Faktor 50 vergrößert dargestellt.

Tabelle 4. STRUKTUR-MASSEN-ZUORDNUNG FÜR DIE OLIGOSACCHARIDE DER NEUTRALEN HMO-FRAKTION

Oligosaccharid	Ion ¹	Massen-Ladungsverhältnis (m/z)		rel. Intensität ² [%]
		gemessen	theoretisch	
Fuc-Lac	(M+Na) ⁺	511,17	511,16	78
Fuc ₂ -Lac	(M+Na) ⁺	657,24	657,22	32
LNT	(M+H) ⁺	708,26	708,26	31
Fuc-LNT	(M+Na) ⁺	730,25	730,24	61
	(M+H) ⁺	854,34	854,30	46
Fuc ₂ -LNT	(M+Na) ⁺	876,31	876,30	100
	(M+H) ⁺	1.000,40	1.000,37	5
LNH	(M+Na) ⁺	1.022,40	1.022,35	24
	(M+Na) ⁺	1.095,40	1.095,37	≤1
Fuc-LNH	(M+H) ⁺	1.219,48	1.219,45	1
	(M+Na) ⁺	1.241,47	1.241,43	3
Fuc ₂ -LNH	(M+H) ⁺	1.365,56	1.365,50	≤1
	(M+Na) ⁺	1.387,56	1.387,49	≤1
Fuc ₃ -LNH	(M+2Na) ²⁺	705,26 ²⁺	705,24	18
	(M+H) ⁺	1.511,61	1.511,56	≤1
	(M+Na) ⁺	1.533,65	1.533,54	≤1
Fuc ₂ -LNO	(M+2Na) ²⁺	778,29 ²⁺	778,27	13
	(M+2Na) ²⁺	887,84 ²⁺	887,80	5
Fuc ₃ -LNO	(M+2Na) ²⁺	960,87 ²⁺	960,83	3
Fuc ₄ -LNO	(M+2Na) ²⁺	1.033,91 ²⁺	1.033,86	2
Fuc ₂ -LND	(M+2Na) ²⁺	1.070,35 ²⁺	1.070,37	≤1

¹ Die neutrale HMO-Fraktion wurde im positiven Ionenmodus (ESI(+)) gemessen, so dass die Oligosaccharid-Ionen entweder in protonierter Form oder als Addukte mit einem oder mehreren Natriumionen vorlagen.

² Die relative Intensität wurde jeweils auf das Signal mit der höchsten Intensität bezogen, in diesem Fall auf das Signal des einfachen Natriumaddukts (M+Na)⁺ von Fucosyl-LNT.

Tabelle 5. STRUKTUR-MASSEN-ZUORDNUNG FÜR DIE OLIGOSACCHARIDE DER SAUREN HMO-FRAKTION

Oligosaccharid	Ion ¹	Massen-Ladungsverhältnis (m/z)		rel. Intensität ² [%]
		gemessen	theoretisch	
NeuAc-Lac	(M-H) ⁻	632.16	632.20	91
NeuAc-FucLac	(M-H) ⁻	778.27	778.26	4
NeuAc-LNT	(M-H) ⁻	997.28	997.34	100
NeuAcFuc-LNT	(M-H) ⁻	1143.39	1143.39	10
NeuAc ₂ -LNT	(M-H) ⁻	1288.40	1288.43	19
NeuAc-LNH	(M-H) ⁻	1362.43	1362.47	28
NeuAc-Fuc-LNH	(M-H) ⁻	1508.47	1508.53	51
NeuAc ₂ -LNH	(M-H) ⁻	1653.52	1653.56	4
NeuAc-Fuc ₂ -LNH	(M-H) ⁻	1654.57	1654.58	13
	(M-2H) ²⁻	826.27 ²	826.28	≤1
NeuAc-LNO	(M-H) ⁻	1727.56	1727.60	≤1
NeuAc ₂ -Fuc-LNH	(M-H) ⁻	1799.58	1799.62	≤1
NeuAc-Fuc-LNO	(M-H) ⁻	1873.63	1873.66	≤1
NeuAc ₃ -LNH	(M-H) ⁻	1944.61	1944.66	≤1
NeuAc-Fuc ₂ -LNO	(M-H) ⁻	2019.63	2019.72	≤1
NeuAc-LND	(M-H) ⁻	2092.67	2092.73	≤1
NeuAc ₂ -Fuc-LNO	(M-H) ⁻	2164.68	2164.75	≤1
NeuAc-Fuc ₃ -LNO	(M-H) ⁻	2165.72	2165.77	≤1
NeuAc-Fuc-LND	(M-H) ⁻	2238.75	2238.79	≤1
NeuAc ₂ -Fuc ₂ -LNO	(M-H) ⁻	2310.79	2310.81	≤1
NeuAc-Fuc ₄ -LNO	(M-H) ⁻	2311.75	2311.83	≤1
NeuAc-Fuc ₂ -LND	(M-H) ⁻	2384.77	2384.85	≤1
NeuAc ₂ -Fuc ₃ -LNO	(M-H) ⁻	2456.82	2456.87	≤1
NeuAc-Fuc ₄ -LNO	(M-H) ⁻	2457.81	2457.89	≤1
NeuAc-Fuc ₃ -LND	(M-H) ⁻	2530.78	2530.91	≤1

¹ Die neutrale HMO-Fraktion wurde im negativen Ionenmodus (ESI(-)) gemessen, so dass die Oligosaccharid-Ionen in deprotonierter Form vorlagen.

² Die relative Intensität wurde jeweils auf das Signal mit der höchsten Intensität bezogen, in diesem Fall auf das Signal der einfach deprotonierten Form (M-H)⁻ von Sialyl-LNT.

4.1.3 Bestimmung der Natrium-Konzentration

Bei der Trennung der HMO-Gesamtfraction in eine neutrale und eine saure Fraktion wurde zum Eluieren der sauren Oligosaccharide von der HPLC-Anionenaustauschersäule ein Natriumchlorid-Gradient verwendet. Ein hoher Salzgehalt würde mit den im Folgenden durchzuführenden Assays zur Untersuchung der Wirkung der isolierten Fraktionen auf Zell-Zell-Interaktionen interferieren. Aus diesem Grund wurde das in der sHMO-Fraktion befindliche Natriumchlorid mittels Gelfiltration wieder abgetrennt. Anhand von Atomabsorptionsspektrometrie wurde in der sHMO-Fraktion nach der Gelfiltration eine Natrium-Konzentration von 2,848 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ gemessen. Da die sHMO-Fraktion in den folgenden Assays mit einer maximalen Konzentration von 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt wurde, betrug die über die sHMO-Fraktion eingebrachte Natrium-Konzentration maximal 0,356 mmol/l .

4.1.4 Bestimmung der Endotoxin-Konzentration

Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften werden Endotoxine in den Oligosaccharid-Fractionen aufkonzentriert. Wie Tabelle 6 zeigt konnte die Endotoxin-Konzentration der isolierten HMO-Fractionen durch die anschließende Affinitätschromatographie reduziert werden.

Für die Untersuchung der Wirkung von Oligosacchariden auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurden die in der Tabelle mit nHMO₁ und sHMO₁ gekennzeichneten Fraktionen verwendet.

Zur Untersuchung des Einflusses von Oligosacchariden auf Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen wurde erneut eine neutrale und eine saure Fraktion aus der Humanmilchprobe isoliert (in der Tabelle mit nHMO₂ bzw. sHMO₂ gekennzeichnete Fraktionen). Nach der Affinitätschromatographie war die Endotoxin-Konzentration dieser Fraktionen geringer als die Endotoxin-Konzentration der zuerst isolierten Fraktionen der gleichen Humanmilchprobe.

Die Endotoxin-Konzentrationen der verwendeten, kommerziellen Oligosaccharid-Standards lagen bereits vor der Detoxifikation unterhalb des Messbereichs.

Tabelle 6. ENDOTOXIN-KONZENTRATION DER HMO-FRAKTIONEN VOR UND NACH DETOXIFIKATION

Fraktion ¹	Endotoxin-Konzentration ²			
	pg/mg Oligosaccharide		pg/ml Medium bzw. Blut ³	
	vor Detoxifikation	nach Detoxifikation	vor Detoxifikation	nach Detoxifikation
nHMO ₁	- ⁴	1.477,5	- ⁴	184,7
sHMO ₁	- ⁴	1.862,6 ± 244,6	- ⁴	232,8 ± 30,5
nHMO ₂	3.594,0 ± 328,1	815,5 ± 2,1	449,3 ± 41,0	102,0 ± 0,2
sHMO ₂	4.476,0 ± 332,6	790,9 ± 121,4	559,5 ± 41,6	98,9 ± 15,2

¹ ₁ und ₂ kennzeichnen aus der Humanmilchprobe zu verschiedenen Zeitpunkten isolierte Oligosaccharid-Fractionen.

² Berechnet als Mittelwert ± Standardabweichung verschiedener Aliquots. Bei Angaben ohne Standardabweichung wurde nur ein Aliquot verwendet.

³ Berechnet für eine Oligosaccharid-Konzentration von 125 mg/ml.

⁴ Die Endotoxin-Konzentrationen vor der Detoxifikation lagen teilweise außerhalb des Messbereichs.

Um sicherzustellen, dass nach der Affinitätschromatographie die Oligosaccharide sowohl quantitativ als auch qualitativ wieder von der Säule eluieren, wurden die Oligosaccharide vor dem Aufgeben auf die Endotoxin-Säule sowie nach dem Eluieren mittels HPAEC-PAD analysiert. Wie Abbildung 18 am Beispiel der sHMO-Fraktion zeigt, waren die Chromatogramme vor und nach der Affinitätschromatographie nahezu identisch. Auch bei der nHMO-Fraktion und den verschiedenen Oligosaccharid-Standards konnten keine Verluste durch die Affinitätschromatographie festgestellt werden.

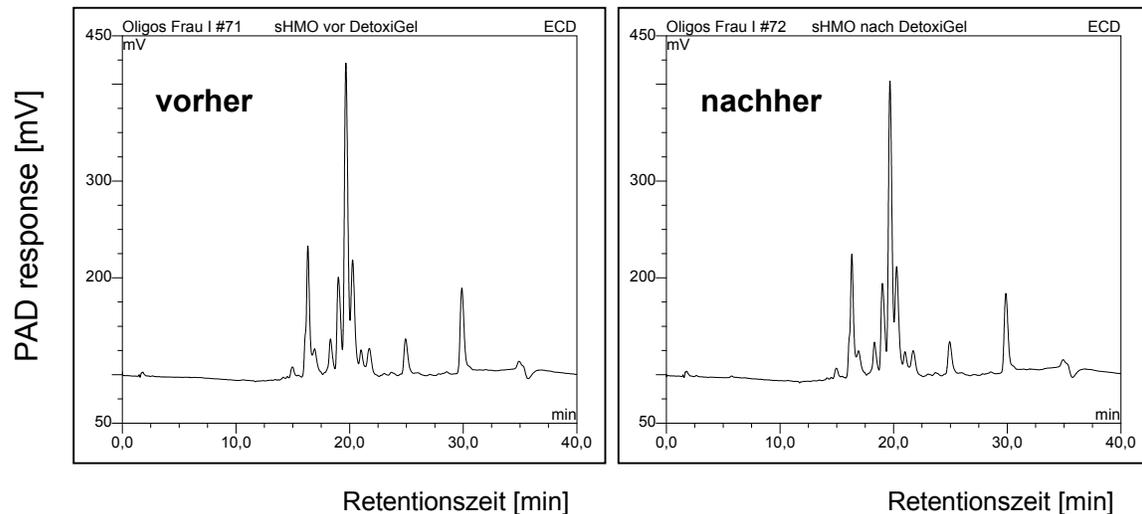


Abbildung 18. HPAEC-PAD-CHROMATOGRAMME DER SAUREN HMO-FRAKTION VOR UND NACH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Um das quantitative und qualitative Eluieren von der Säule zu überprüfen, wurden die Oligosaccharide vor und nach der Affinitätschromatographie mittels HPAEC-PAD analysiert. Am Beispiel der sHMO-Fraktion ist dargestellt, dass sich das Chromatogramm der Fraktion vor der Affinitätschromatographie kaum von dem Chromatogramm der Probe nach dem Eluieren von der Säule unterscheidet.

4.1.5 Berechnung der HMO-Konzentration im Blut des Säuglings

Die HMO-Konzentration im Blut des Säuglings konnte bisher nur indirekt bestimmt werden (Abschnitt 1.1.2). Aufgrund der im Folgenden dargelegten Annahmen kann die HMO-Konzentration aber näherungsweise berechnet werden.

Bei einer Oligosaccharid-Konzentration von 10 g/l Humanmilch (KUNZ *et al.* 1999), nimmt ein rund 4 Wochen alter Säugling mit einer täglichen Trinkmenge von 800 ml etwa 8 g Oligosaccharide zu sich. Bei einer Absorptionsrate von mindestens 1% gelangen davon folglich 80 mg in die systemische Zirkulation. Die Blutmenge eines Säuglings beträgt zwischen 80 und 90 ml pro kg Körpergewicht, so dass sich bei einem 4 kg schweren Säugling mit einem Blutvolumen von 320 ml eine HMO-Konzentration von 250 µg/ml berechnet. Unter der Annahme, dass die Hälfte dieser Oligosaccharide Sialinsäure enthält, kann von einer sHMO-Konzentration im Bereich von 125 µg/ml ausgegangen werden.

4.2 Untersuchung der Wirkung von Oligosacchariden auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Der initiale Schritt der Interaktionen von Leukozyten und Endothelzellen im Prozess der Leukozyten-Extravasation, das *Rolling*, wird durch Selektine auf der Endothelzelloberfläche und ihren Liganden auf den Leukozyten vermittelt. Die Selektin-Bindungsdomäne interagiert dabei mit Oligosacchariden der entsprechenden Glykoprotein-Liganden (Abschnitt 1.3.1). Im Folgenden wurde die Hypothese überprüft, ob die in der systemischen Zirkulation des gestillten Säuglings vorkommenden HMO als lösliche Selektin-Liganden-Analoga einen Einfluss auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen ausüben, indem sie mit den zellulären Liganden um die Selektin-Bindungsstelle konkurrieren.

Da es sich beim *Rolling*, der Verlangsamung der Leukozyten aus dem Blutstrom, um einen dynamischen Prozess handelt, wurde der Effekt der Oligosaccharide anhand eines *In-vitro*-Durchflussmodells untersucht. Hierbei wurden Leukozyten mit einer konstanten Flussrate über Endothelzellen geleitet und das Leukozyten-*Rolling* und die Leukozyten-Adhäsion quantifiziert. Als Positiv-Kontrolle wurden aktivierte Endothelzellen mit dem Tetrasaccharid sLe^x inkubiert, welches als eine physiologische Oligosaccharid-Bindungsdeterminante der Selektin-Liganden identifiziert werden konnte (Abschnitt 1.2.3). Als Negativ-Kontrolle wurden die Endothelzellen mit einem Trigalactosid (TriGal, Gal α 1-3Gal β 1-4Gal) inkubiert, welches nur wenig strukturelle Ähnlichkeit mit den Oligosaccharid-Bindungsdeterminanten der Selektin-Liganden aufweist. In der Folge wurde untersucht, ob die zuvor aus Humanmilch isolierten Oligosaccharid-Fractionen einen Einfluss auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen zeigen.

Zunächst wurden sowohl die kultivierten Endothelzellen als auch die isolierten Leukozyten charakterisiert.

4.2.1 Charakterisierung der Endothelzellen

4.2.1.1 Nachweis der Zellart

Die bis zur Konfluenz kultivierten Zellen wiesen das für Endothelzellen charakteristische Pflastersteinrelief eines einschichtigen Plattenepithels auf (Abbildung 19 A). Neben der rein morphologischen Charakterisierung der Endothelzellen wurde auch ein immunochemischer Nachweis durchgeführt. Außer Megakaryozyten, den Vorläufern der Thrombozyten, sind lediglich Endothelzellen in der Lage ein spezielles, multimeres Glycoprotein zu synthetisieren, welches als von Willebrand-Faktor (vWf) bezeichnet wird. vWf wird in intrazellulären Weibel-Palade Vesikeln gespeichert, ins Plasma sezerniert und dient der Adhäsion von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix (WEIBEL UND PALADE 1964, WEISS 1991). Da Endothelzellen rein morphologisch deutlich von Megakaryozyten unterschieden werden können, dient der immunochemische Nachweis von intrazellulärem vWf als eindeutige Abgrenzung der Endothelzellen zu anderen Zellarten, wie beispielsweise den Fibroblasten (JAFFE *et al.* 1973). Die Inkubation der kultivierten und permeabilisierten Zellen mit FITC-markierten vWf-Antikörpern zeigte das Vorkommen von vWf in intrazellulären Vesikeln (Abbildung 19 B). Bei den isolierten und kultivierten Zellen handelte es sich demnach um Endothelzellen.

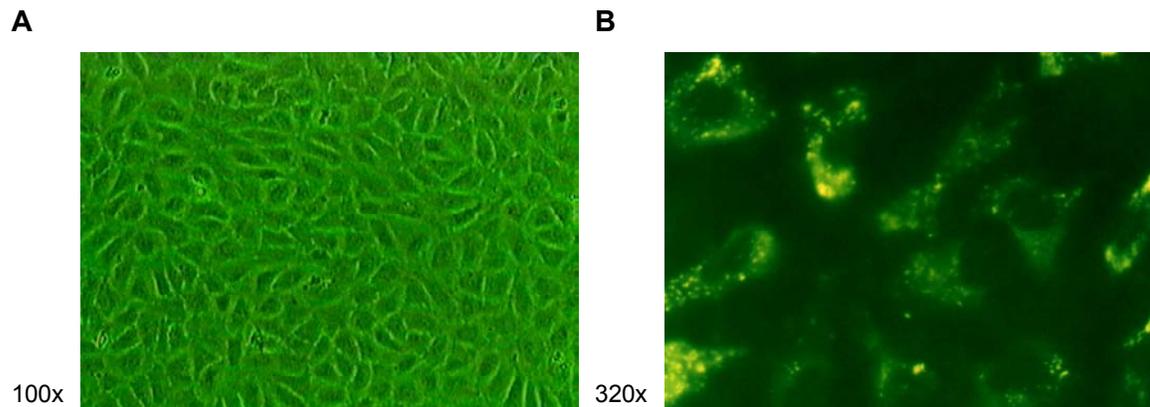


Abbildung 19. CHARAKTERISIERUNG DER ENDOTHELZELLEN

A: Mikroskopische Aufnahme des einschichtigen Plattenepithels (100-fache optische Vergrößerung, Grünfilter).

B: Immunochemischer Nachweis des endothelspezifischen von Willebrand Faktors (vWf). Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt, dass vWf in den isolierten Zellen synthetisiert und in intrazellulären Vesikeln gespeichert wird (320-fache optische Vergrößerung).

4.2.1.2 Adhäsionsmoleküle

An den beiden initialen Schritten der Leukozyten-Extravasation sind zwei verschiedene Gruppen von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen beteiligt. Das einleitende *Rolling* wird durch Selektine vermittelt, die mit den Oligosaccharid-Bindungsdeterminanten der entsprechenden Liganden auf der Leukozyten-Oberfläche interagieren. Die sich anschließende feste Adhäsion wird durch Moleküle aus der Immunglobulin Superfamilie vermittelt, die an Leukozyten-Integrine binden (Abschnitt 1.3.1.1). Da ein Einfluss der HMO auf die Selektin-vermittelten Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen untersucht werden sollte, wurde die optimale Inkubationszeit mit TNF- α ermittelt, bei der die Selektine auf der Endothelzell-Oberfläche maximal exprimiert werden.

4.2.1.2.1 Selektine

Die Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α in einer Konzentration von 10 ng/ml induzierte die E-Selektin-Expression (CD62E) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Abbildung 20 A). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Bestimmung eine im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle um den Faktor 1,5 erhöhte mediane Fluoreszenzintensität (MFI). Die MFI stieg nach 2 bzw. 3 Stunden um den Faktor 4,8 bzw. 5,6 und erreichte nach 4 Stunden eine maximale Induktion um den Faktor 5,9. Nach 6, 8 bzw. 24 Stunden wurde die E-Selektin-Expression der Endothelzellen langsam wieder reduziert. Die MFI war im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle noch um den Faktor 5,3, 4,7 bzw. 3,0 erhöht (Abbildung 20 B).

Durch die Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α wurde die P-Selektin-Expression (CD62P) kaum beeinflusst. Nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 3, 4, 6, 8 bzw. 24 Stunden war die mediane Fluoreszenzintensität um den Faktor 1,1, 1,1, 1,2, 1,1, 1,1, 1,1 bzw. 0,9 verändert (Abbildung 20).

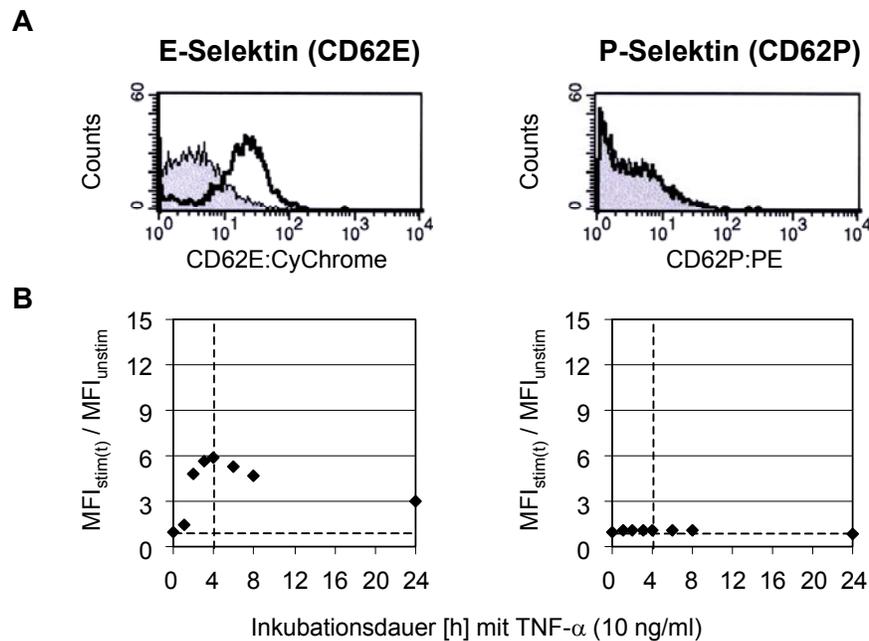


Abbildung 20. SELEKTIN-EXPRESSION NACH INKUBATION MIT $TNF-\alpha$

Durchflusszytometrische Bestimmung der E-Selektin-Expression (CD62E) und P-Selektin-Expression (CD62P) auf der Endothelzell-Oberfläche in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit $TNF-\alpha$ (10 ng/ml).

A: Die Histogramme zeigen jeweils die Fluoreszenzintensitätsverteilung für CD62E bzw. CD62P nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit $TNF-\alpha$ (schwarze Linie) im Vergleich zur Intensitätsverteilung bei unstimulierten Endothelzellen (grauschraffierte Fläche).

B: In den Koordinatensystemen ist das Verhältnis der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) der mit $TNF-\alpha$ -stimulierten Endothelzellen zur MFI der unstimulierten Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer t dargestellt. Eine Inkubationsdauer von 4 Stunden führte zu einer maximalen E-Selektin-Expression (senkrechte, gestrichelte Linie). Die waagerechte, gestrichelte Linie markiert die relative MFI der unstimulierten Kontrolle.

4.2.1.2.2 Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie

Im unstimulierten Zustand zeigten die Endothelzellen bereits eine deutliche Expression von ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) und VCAM-1 (CD106). Die Expression von ICAM-1 wurde nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ in einer Konzentration von 10 ng/ml in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer weiter induziert. Nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 3, 4, 6, 8 bzw. 24 Stunden erhöhte sich die mediane Fluoreszenzintensität um den Faktor 0,9, 1,3, 2,1, 3,5, 5,6, 8,2 bzw. 13,7. Die Expression von ICAM-2 und VCAM-1 wurde durch die Inkubation mit $TNF-\alpha$ kaum beeinflusst (Abbildung 21).

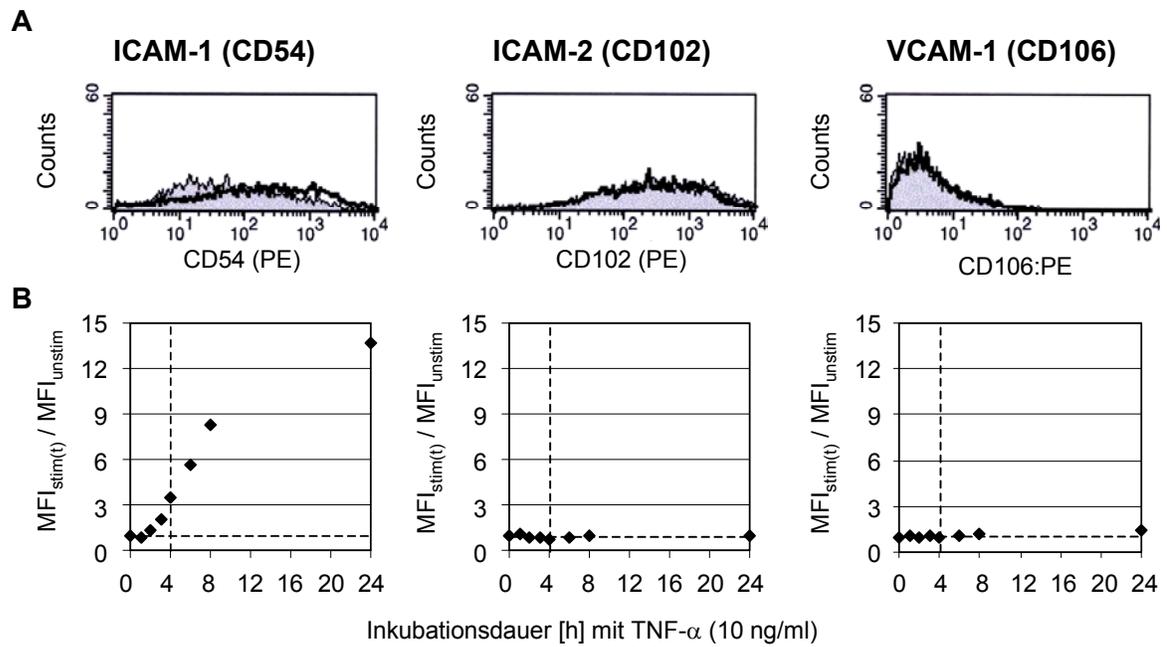


Abbildung 21. EXPRESSION DER ADHÄSIONSMOLEKÜLE DER IMMUNGLOBULIN SUPERFAMILIE NACH INKUBATION MIT TNF- α

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) und VCAM-1 (CD106) auf der Endothelzell-Oberfläche in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit TNF- α (10 ng/ml).

A: Die Histogramme zeigen jeweils die Fluoreszenzintensitätsverteilung für CD54, CD102 bzw. CD106 nach 4-stündiger Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α (schwarze Linie) im Vergleich zur Intensitätsverteilung bei unstimulierten Endothelzellen (grauschraffierte Fläche).

B: In den Koordinatensystemen ist das Verhältnis der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) der mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen zur MFI der unstimulierten Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer t dargestellt. Die optimale Inkubationsdauer für maximale E-Selektin-Expression ist mit einer senkrechten, gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die waagerechte, gestrichelte Linie markiert die relative MFI der unstimulierten Kontrolle.

Alle nachfolgenden Experimente zur Untersuchung der Wirkung von HMO auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurden mit einer Inkubationszeit von 4 Stunden durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Selektine maximal exprimiert und auch die an der festen Adhäsion beteiligten Moleküle der Immunglobulin Superfamilie sind auf der Endothelzell-Oberfläche vorhanden.

4.2.2 Charakterisierung der Monozyten

In der aus *Buffy-coats* isolierten Fraktion wurden $92,9 \pm 0,6\%$ ($n=5$) der Zellen durchflusszytometrisch anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) als Monozyten identifiziert (Abbildung 22).

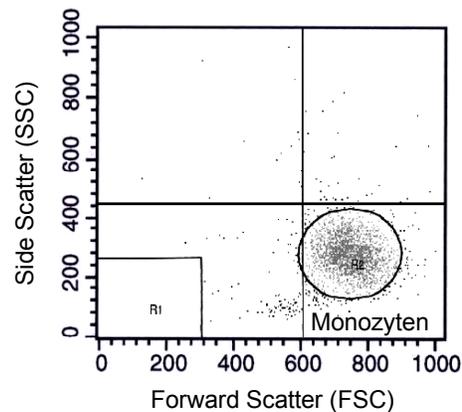


Abbildung 22. CHARAKTERISIERUNG DER MONOZYTEN

Von der Gesamtzellzahl wurden die Monozyten anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) eingegrenzt (Oval im rechten, unteren Quadranten). Zelltrümmer wurden bei der Bestimmung der relativen Monozyten-Konzentration nicht berücksichtigt und zuvor ausgeschlossen (Rechteck in der linken, unteren Ecke).

4.2.3 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Um den Einfluss von Oligosacchariden auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen zu untersuchen, wurden die Endothelzellen 4 Stunden vor dem Experiment mit $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) aktiviert und 1 Stunde vor dem Experiment mit Oligosacchariden in einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Die zuvor isolierten Monozyten wurden in einer parallelen Durchflusskammer mit einer physiologischen, konstanten Flussrate über die Endothelzellen geleitet. Die Anzahl der während der Passage rollenden Monozyten sowie die Anzahl der nach der Passage noch adhärennten Monozyten wurde anhand eines Video-Mikroskopie-Systems bestimmt.

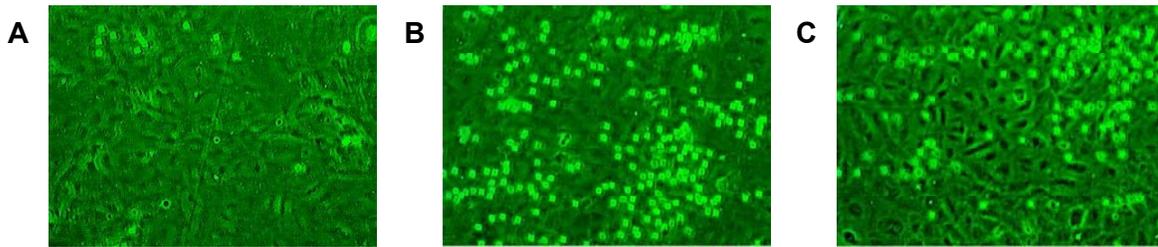


Abbildung 23. MONOZYTEN-ENDOTHELZELL-ADHÄSION

Mikroskopische Darstellung der nach den jeweiligen Durchflussversuchen adhärenen Monozyten. Durch den verwendeten optischen Grünfilter konnten die hellgrün erscheinenden Monozyten deutlich von den dunkelgrünen Endothelzellen unterschieden werden.

A: Unstimulierte Endothelzellen.

B: Endothelzellen nach Inkubation mit TNF- α .

C: Endothelzellen nach Inkubation mit TNF- α und sLe^x.

Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abbildung 23 A) stieg die Zahl adhärenter Monozyten nach Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α deutlich an (Abbildung 23 B). Die zusätzliche Inkubation mit sLe^x führte zu einer Reduktion der Monozyten-Adhäsion (Abbildung 23 C).

Nach der Isolierung aus *Buffy-coats* wurde die Monozyten-Suspension (4×10^6 Zellen/ml) im CO₂-Inkubator bei 37°C aufbewahrt. Für die Durchflussversuche wurden jeweils 0,5 ml Aliquots aus dieser Suspension entnommen und direkt in das Durchflusssystem injiziert. Da mehrere Durchflussversuche mit Monozyten-Aliquots der gleichen Suspension durchgeführt wurden und der zeitliche Abstand der Versuche etwa 30 min betrug, verlängerte sich die Lagerungszeit der noch in Suspension gehaltenen Monozyten von Versuch zu Versuch um jeweils 30 min. Trotz gleicher Inkubationsbedingungen der Endothelzellen konnte beobachtet werden, dass sich die Anzahl adhärenter Monozyten in Abhängigkeit von ihrer Lagerdauer reduzierte. Um den Effekt der Oligosaccharide durch diesen Nebeneffekt nicht zu verfälschen, wurden die Versuche mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit und ohne Inkubation mit Oligosacchariden alternierend durchgeführt. Zur Berechnung des Effekts der Oligosaccharide auf die Monozyten-Adhäsion wurde die Anzahl adhärenter Monozyten auf den Mittelwert der adhärenen Monozyten des jeweils vorangegangenen und nachfolgenden Versuchs ohne Inkubation mit Oligosacchariden bezogen (Abbildung 24). Ähnliches wurde auch für das Rolling beobachtet und der Effekt der Oligosaccharide entsprechend berechnet.

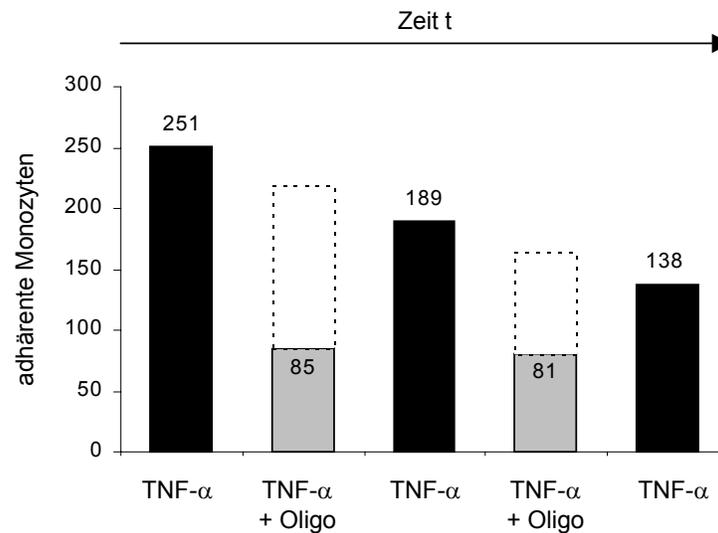


Abbildung 24. EINFLUSS DER MONOZYTEN-LAGERDAUER AUF DIE ADHÄSION

Anzahl adhärenter Monozyten in einer Abfolge von fünf Einzelversuchen mit alternierenden Inkubationsbedingungen. Trotz gleicher Inkubationsbedingungen der Endothelzellen im 1., 3. und 5. Versuch (TNF- α), reduzierte sich die Anzahl adhärenter Monozyten (schwarze Balken) in Abhängigkeit von der Lagerdauer der Monozyten. Um diesen Nebeneffekt auszuschließen wurde der Effekt der Oligosaccharide berechnet, indem die Anzahl adhärenter Monozyten (grauer Balken) auf den Mittelwert der adhärenter Monozyten des vorangegangenen und nachfolgenden Versuchs (gestrichelter Balken) bezogen wurde.

4.2.3.1 Rolling

Im Vergleich zu Versuchen mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen rollten auf unstimulierten Endothelzellen $61,6 \pm 21,5\%$ ($P < 0,001$) weniger Monozyten. Die Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit sLe^x zeigte keine signifikante Reduktion der Anzahl rollender Monozyten ($P > 0,136$, $n=7$). TriGal hatte ebenfalls keinen Einfluss ($P > 0,631$, $n=8$). Die Inkubation der Endothelzellen mit der sHMO-Fraktion führte zu einer Reduktion des Monozyten-Rollings um 24,0% auf $76,0 \pm 17,6\%$ ($P < 0,001$, $n=13$). Die nHMO-Fraktion zeigte hingegen keinen Effekt ($P > 0,930$, $n=11$) (Abbildung 25 A).

4.2.3.2 Adhäsion

Auf unstimulierten Endothelzellen fand sich im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen eine um $90,8 \pm 3,3\%$ ($P < 0,001$) geringere Monozytenadhäsion. Die Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit sLe^x führte zu einer Reduktion der Monozyten-Adhäsion um 36,7% auf $63,3 \pm 8,0\%$ ($P < 0,001$, $n=7$), während das als Negativ-Kontrolle verwendete TriGal keinen Effekt zeigte ($P > 0,883$, $n=8$). Die Inkubation der Endothelzellen mit der sHMO-Fraktion reduzierte die Anzahl der adhärenen Monozyten um 52,8% auf $47,2 \pm 9,7\%$ ($P < 0,001$, $n=13$). Dieser Effekt war signifikant größer als der Effekt nach Inkubation mit sLe^x ($P < 0,01$). Die nHMO-Fraktion hatte keinen Einfluss auf die Monozyten-Adhäsion ($P > 0,237$, $n=11$) (Abbildung 25 B).

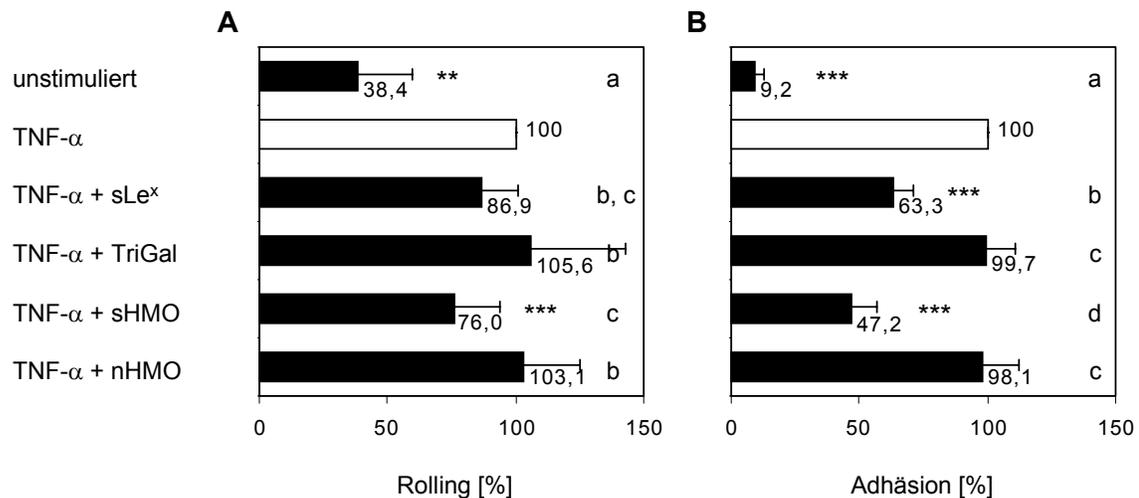


Abbildung 25. STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNG

Effekte verschiedener Oligosaccharid-Standards bzw. -Fraktionen auf Monozyten-Endothelzell-Interaktionen. Die zur Inkubation verwendeten Oligosaccharid-Konzentrationen im Zellkulturmedium betragen $125 \mu\text{g/ml}$. Die Anzahl der rollenden (A) bzw. adhärenen (B) Monozyten nach Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit den verschiedenen Oligosacchariden wurde ins Verhältnis zur jeweiligen Anzahl rollender bzw. adhärenen Monozyten der TNF- α -stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden gesetzt (100%, weißer Balken).

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede durch die Inkubation mit Oligosacchariden im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen ohne Inkubation mit Oligosacchariden wurden gekennzeichnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der einzelnen Oligosaccharid-Standards bzw. -Fraktionen wurden mit Kleinbuchstaben markiert. Effekte mit gleichen Buchstaben waren nicht signifikant verschieden ($P < 0,05$).

4.2.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde die Konzentration der sHMO-Fraktion im Zellkulturmedium sukzessive vermindert. Die mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen wurden für 1 Stunde mit der sHMO-Fraktion in einer Konzentration von 125, 87,5, 50, 25 bzw. 12,5 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Anschließend wurden Monozyten in der parallelen Durchflusskammer über die Endothelzellen geleitet und das *Rolling* und die Monozyten-Adhäsion quantifiziert.

4.2.4.1 *Rolling*

Das Monozyten-*Rolling* auf TNF- α -stimulierten Endothelzellen wurde nach Inkubation mit der sHMO-Fraktion in einer Konzentration von 125 bzw. 87,5 $\mu\text{g/ml}$ auf $76,0 \pm 17,6\%$ ($P < 0,001$, $n=13$) bzw. $80,4 \pm 21,2\%$ ($P < 0,05$, $n=8$) reduziert. Die Reduktionseffekte waren untereinander nicht signifikant verschieden ($P > 0,610$). Die Inkubation der Endothelzellen mit der sHMO-Fraktion in einer Konzentration von 50, 25 bzw. 12,5 $\mu\text{g/ml}$ hatte keinen Einfluss auf die Anzahl rollender Monozyten ($P > 0,940$, $n=9$; $P > 0,296$, $n=9$; bzw. $P > 0,830$, $n=10$) (Abbildung 26 A).

4.2.4.2 *Adhäsion*

Die Monozyten-Adhäsion auf TNF- α -stimulierten Endothelzellen wurde nach Inkubation mit der sHMO-Fraktion in einer Konzentration von 125, 87,5, 50 bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ auf $47,2 \pm 9,7\%$ ($P < 0,001$, $n=13$), $52,3 \pm 8,3\%$ ($P < 0,001$, $n=8$), $71,7 \pm 9,8\%$ ($P < 0,001$, $n=9$) bzw. $76,3 \pm 9,2\%$ ($P < 0,001$, $n=9$) reduziert. Die Reduktionseffekte bei einer Konzentration von 125 und 87,5 $\mu\text{g/ml}$ waren nicht signifikant verschieden ($P > 0,228$). Gleiches galt für die Effekte bei einer Konzentration von 50 und 25 $\mu\text{g/ml}$ ($P > 0,314$). Bei einer Konzentration von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ hatte die sHMO-Fraktion keinen Einfluss auf die Monozyten-Adhäsion ($P > 0,874$, $n=10$) (Abbildung 26 B).

Die Berechnung der Regressionskurve für die sHMO-Effekte auf die Monozyten-Adhäsion lieferte einen logarithmischen Funktionsverlauf (Abbildung 26 D). Bei zunehmender sHMO-Konzentration nimmt der Grenzeffekt stetig ab, d.h. pro zusätzlicher Konzentrationseinheit wird der Effekt auf die Monozyten-Adhäsion geringer.

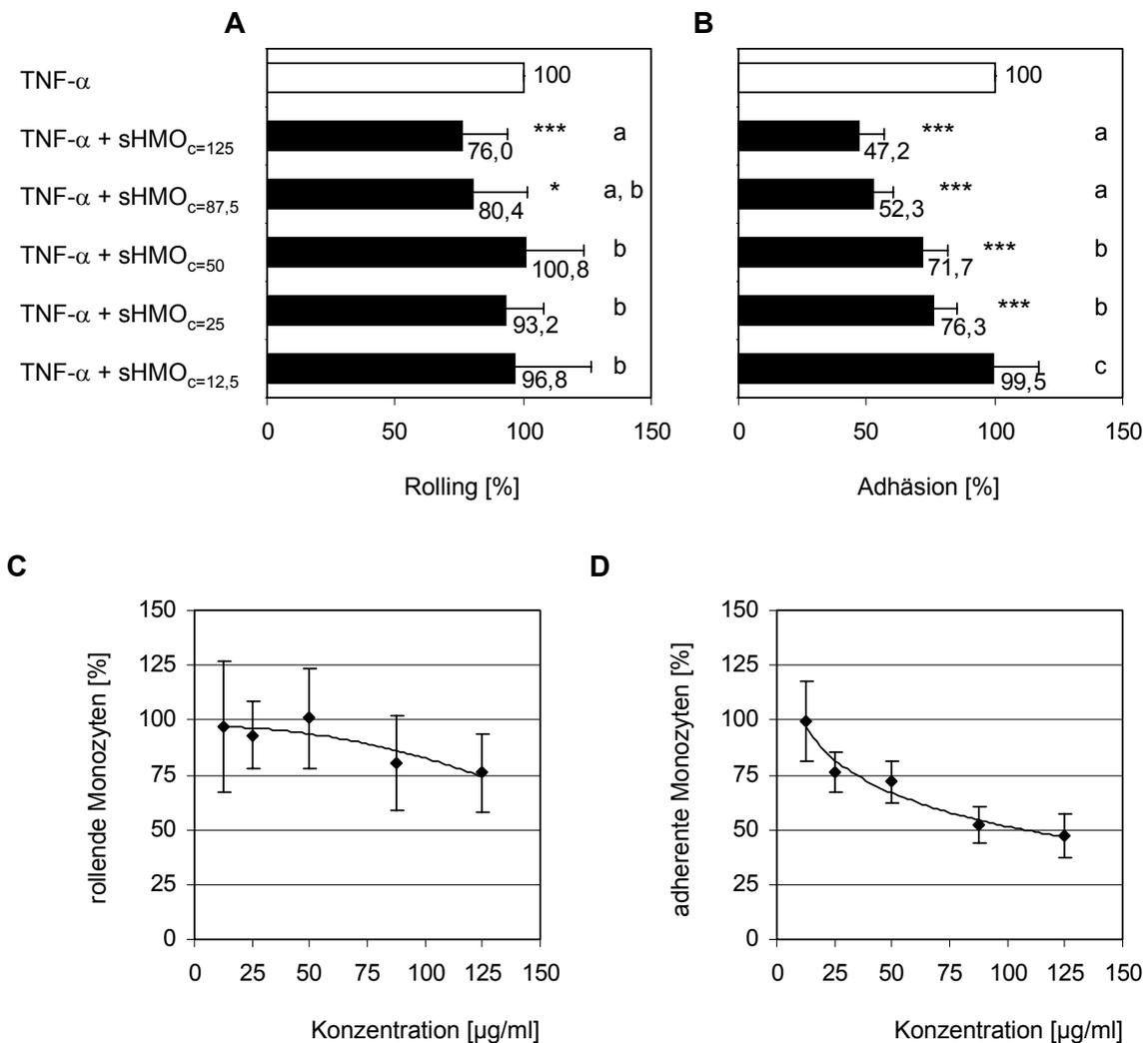


Abbildung 26. DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG

Effekte verschiedener sHMO-Konzentrationen auf Monozyten-Endothelzell-Interaktionen. Die Anzahl der rollenden (**A**, **C**) bzw. adhärenen (**B**, **D**) Monozyten nach Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit der sHMO-Fraktion in verschiedenen Konzentrationen wurde ins Verhältnis zur jeweiligen Anzahl rollender bzw. adhärenen Monozyten bei der TNF- α -stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden gesetzt (100%).

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede durch die Inkubation mit der sHMO-Fraktion im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen ohne Inkubation mit Oligosacchariden wurden gekennzeichnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der einzelnen sHMO-Konzentrationen wurden mit Kleinbuchstaben markiert. Effekte mit gleichen Buchstaben waren nicht signifikant verschieden ($P > 0,05$). Für die Reduktionseffekte der sHMO-Fraktion wurde jeweils eine Regressionskurve angegeben (**C**, **D**).

4.2.5 Potentielle Liganden-Analoga der sHMO-Fraktion

Durch die massenspektrometrische Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die sHMO-Fraktion aus mehr als 20 verschiedenen Oligosacchariden besteht (Abschnitt 4.1.2). Anhand kommerzieller Oligosaccharid-Standards wurde im Folgenden untersucht, welche dieser einzelnen Oligosaccharide zu den Effekten auf die Monozyten-Endothelzell-Interaktionen beitragen.

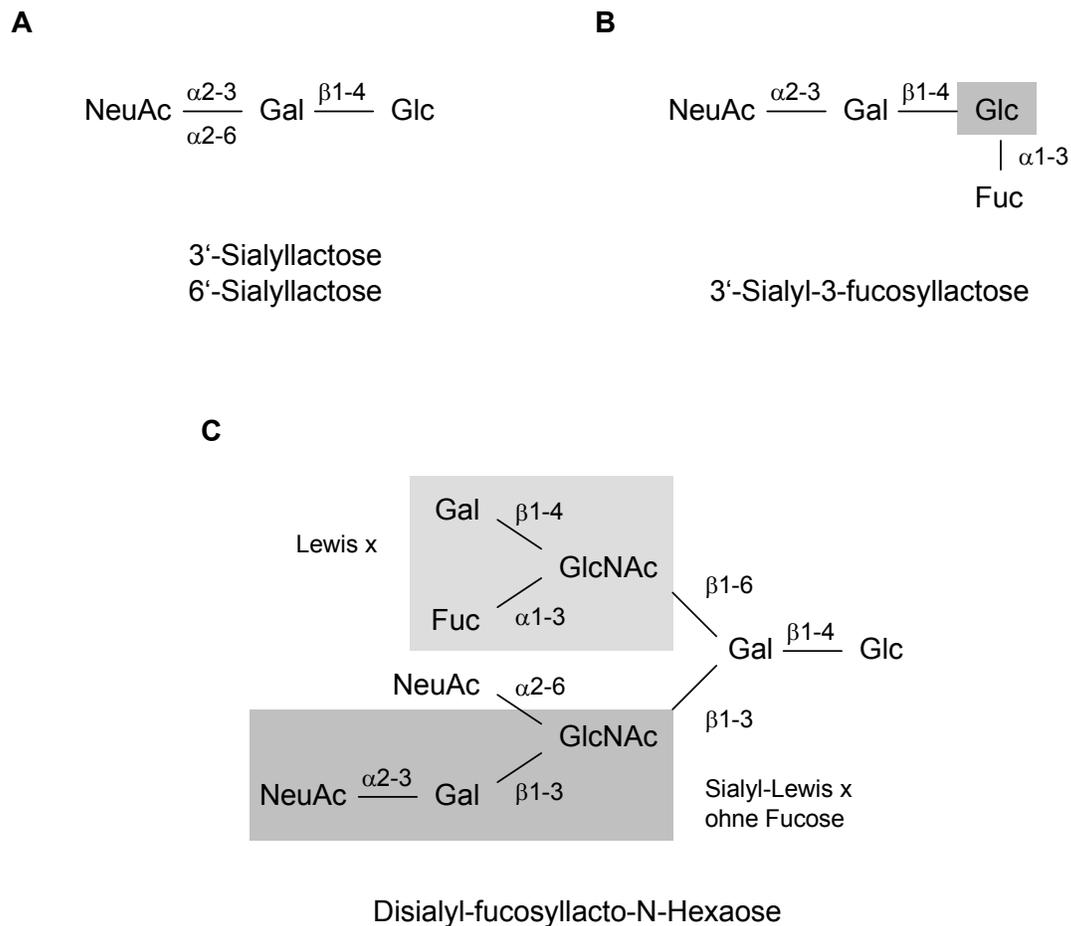


Abbildung 27. STRUKTUREN DER UNTERSUCHTEN OLIGOSACCHARID-STANDARDS

A: Die beiden Hauptkomponenten der sHMO-Fraktion, 3'-Sialyllactose und 6'-Sialyllactose, unterscheiden sich lediglich in der glykosidischen Bindung zwischen Galactose und N-Acetyl-Neuraminsäure.

B: 3'-Sialyl-3-fucosyllactose unterscheidet sich von sLe^x lediglich durch die Glucose am reduzierenden Ende (grau hinterlegt). An dieser Stelle trägt sLe^x ein N-Acetyl-Glucosamin.

C: Das Nonasaccharid Disialyl-fucosyl-LNH trägt sowohl eine Lewis x- als auch eine defucosylierte Sialyl-Lewis x-Determinante (jeweils grau hinterlegt).

Zunächst wurde mit 6'-Sialyllactose und 3'-Sialyllactose (Abbildung 27 A) der Einfluss zweier Hauptkomponenten der sHMO-Fraktion bestimmt. Als weiteres wurde der Effekt der ebenfalls in der sHMO-Fraktion vorkommenden 3'-Sialyl-3-fucosyllactose untersucht. Der einzige Unterschied dieses Tetrasaccharids zu sLe^x besteht in der am reduzierenden Ende vorkommenden Glucose, an dessen Stelle beim sLe^x ein N-Acetyl-Glucosamin steht (Abbildung 27 B). Des Weiteren wurde das Nonasaccharid Disialyl-fucosyl-LNH verwendet. Diese Struktur enthält sowohl eine Lewis x-Determinante als auch eine defucosylierte Sialyl-Lewis x-Determinante (Abbildung 27 C). 3'-Sialyl-3-fucosyllactose als auch Disialyl-fucosyl-LNH weisen damit strukturelle Ähnlichkeiten mit den physiologischen Bindungsdeterminanten der Selektin-Liganden auf. Die TNF- α -stimulierten Endothelzellen wurden mit den einzelnen Oligosaccharid-Standards in einer Konzentration von 125 μ g/ml inkubiert und die jeweiligen Effekte auf das *Rolling* und die Adhäsion der Monozyten bestimmt.

4.2.5.1 *Rolling*

Die Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit 3'-Sialyllactose bzw. 6'-Sialyllactose hatte keinen Einfluss auf das Monozyten-*Rolling* ($P > 0,203$, $n=9$ bzw. $P > 0,407$, $n=10$). Nach Inkubation der Endothelzellen mit 3'-Sialyl-3-fucosyllactose zeigte sich eine um 23,6% auf $76,4 \pm 20,1\%$ ($P < 0,01$, $n=9$) reduzierte Anzahl rollender Monozyten. Die Inkubation mit Disialyl-fucosyl-LNH führte zu einer Reduktion des Monozyten-*Rollings* um 16,9% auf $83,1 \pm 20,7\%$ ($P < 0,05$, $n=9$). Die Effekte nach Inkubation mit sLe^x, 3'-Sialyl-3-fucosyllactose, Disialyl-fucosyl-LNH oder der gesamten sHMO-Fraktion waren nicht signifikant verschieden (Abbildung 28 A).

4.2.5.2 *Adhäsion*

Die Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit 3'-Sialyllactose führte zu einer Reduktion adhärenter Monozyten um 7,7% auf $92,3 \pm 6,4\%$ ($P < 0,01$, $n=9$). Durch die Inkubation mit 6'-Sialyllactose wurde die Monozyten-Adhäsion nicht beeinflusst ($P > 0,698$, $n=10$). Der Einfluss von 3'-Sialyllactose und 6'-Sialyllactose auf die Monozyten-Adhäsion war signifikant verschieden. Nach Inkubation der Endothelzellen mit 3'-Sialyl-3-fucosyllactose zeigte sich eine um 35,7% auf $64,3 \pm 9,8\%$ ($P < 0,001$, $n=9$) reduzierte Anzahl adhärenter Monozyten. Die Inkubation mit Disialyl-fucosyl-LNH führte zu einer Reduktion der Monozyten-Adhäsion um 34,6% auf $65,4 \pm 6,6\%$ ($P < 0,001$, $n=9$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Effekten nach Inkubation mit sLe^x, 3'-Sialyl-3-

fucosyllactose bzw. Disialyl-fucosyl-LNH festgestellt werden. Der Reduktionseffekt dieser drei Oligosaccharide war signifikant größer als der Effekt nach Inkubation mit 3'-Sialyllactose. Der Effekt der gesamten sHMO-Fraktion war signifikant größer als die einzelnen Effekte aller verwendeten Oligosaccharid-Standards (Abbildung 28 B).

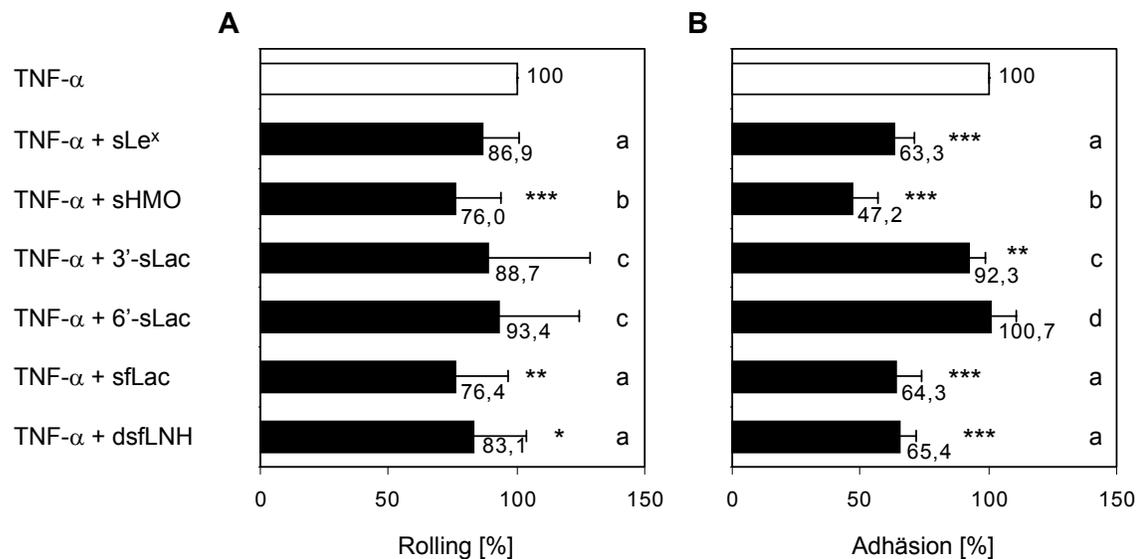


Abbildung 28. EINFLUSS VON OLIGOSACCHARID-STANDARDS DER sHMO-FRAKTION

Effekte verschiedener Oligosaccharid-Standards der sHMO-Fraktion auf Monozyten-Endothelzell-Interaktionen. Zum Vergleich wurden auch die Effekte von sLe^x und die Effekte der sHMO-Gesamtfraktion dargestellt. Die zur Inkubation verwendeten Oligosaccharid-Konzentrationen im Zellkulturmedium betragen 125 $\mu\text{g/ml}$. Die Anzahl der rollenden (A) bzw. adhärenen (B) Monozyten nach Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit den verschiedenen Oligosacchariden wurde ins Verhältnis zur jeweiligen Anzahl rollender bzw. adhärenen Monozyten bei der TNF- α -stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden gesetzt (100%, weißer Balken). Abkürzungen: 3'-sLac: 3'-Sialyllactose, 6'-sLac: 6'-Sialyllactose, sfLac: 3'-Sialyl-3-fucosyllactose, dsfLNH: Disialyl-fucosyl-LNH

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede durch die Inkubation mit Oligosacchariden im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen ohne Inkubation mit Oligosacchariden wurden gekennzeichnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der einzelnen Oligosaccharid-Standards wurden mit Kleinbuchstaben markiert. Effekte mit gleichen Buchstaben waren nicht signifikant verschieden ($P > 0,05$).

4.2.6 Einfluss auf Lymphozyten-Endothelzell-Interaktionen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl das Tetrasaccharid sLe^x als auch Oligosaccharide der sauren HMO-Fraktion das *Rolling* und die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen reduzieren. Ob es sich dabei um Monozyten-spezifische Effekte handelt oder diese Oligosaccharide auch die Interaktionen anderer Leukozyten mit Endothelzellen beeinflussen können, wurde im Folgenden untersucht.

4.2.6.1 Charakterisierung

In der aus *Buffy-coats* isolierten Fraktion wurden 95% der Zellen durchflusszytometrisch anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) als Lymphozyten identifiziert (Abbildung 29 A). Der Anteil der aufgrund dieser Charakterisierung nicht eindeutig von

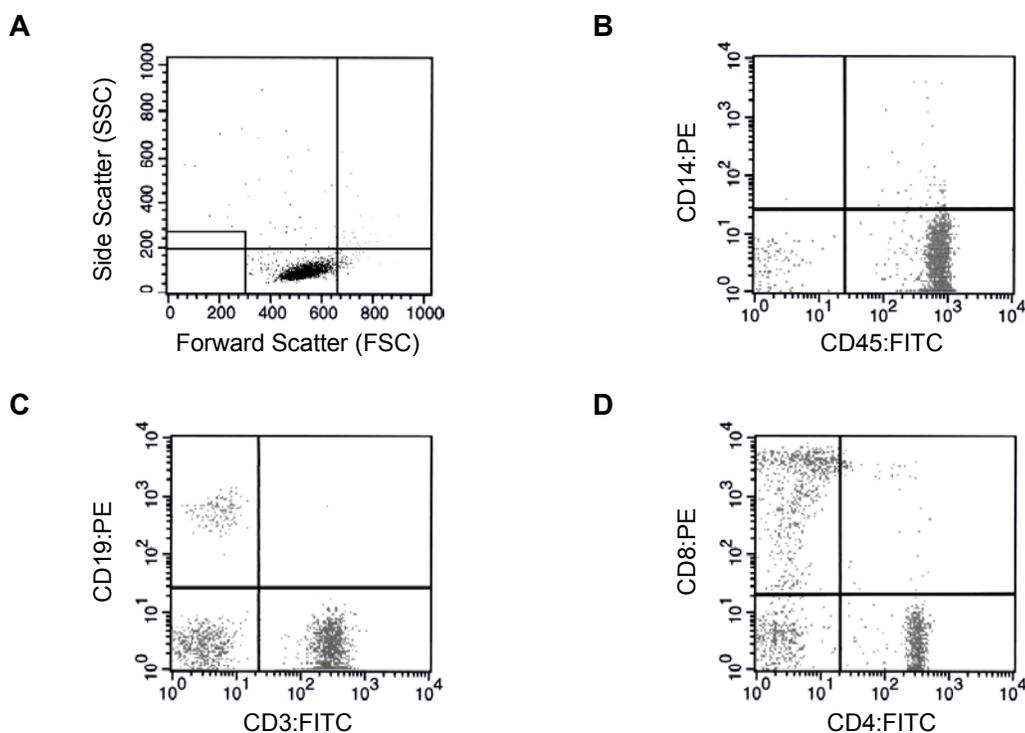


Abbildung 29. CHARAKTERISIERUNG DER LYMPHOZYTEN

A: Von der Gesamtzellzahl wurden die Lymphozyten anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) eingegrenzt (linker, unterer Quadrant). Zelltrümmer wurden bei der Bestimmung der relativen Lymphozyten-Konzentration nicht berücksichtigt und zuvor ausgeschlossen (Rechteck in der linken, unteren Ecke).

B-D: Nach dem Prinzip der direkten Zweifarbenimmunofluoreszenz wurden zunächst CD14-positive Monozyten von den Lymphozyten ausgegrenzt (**B**). Der Anteil der T-Lymphozyten (CD3⁺) und B-Lymphozyten (CD19⁺) wurde bestimmt (**C**) und die T-Lymphozyten weiter in CD4- und CD8-positive Zellen unterteilt (**D**).

den Lymphozyten abzugrenzenden Monozyten, wurde anhand des Monozyten-spezifischen-Antigens CD14 mit einem Anteil von 0,5% ermittelt (Abbildung 29 B). Die korrigierte relative Lymphozyten-Konzentration betrug damit 94,5%.

Da es sich bei den Lymphozyten um eine relativ heterogene Zellpopulation handelt, wurden die isolierten Lymphozyten nach dem Prinzip der direkten Zweifarbenimmunofluoreszenz durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 29 B-D).

Der relative Anteil der T-Lymphozyten (CD3⁺) betrug 65%, der Anteil der B-Lymphozyten (CD19⁺) lag bei 7%. 28% der Lymphozyten exprimierten weder CD3 noch CD19 (Abbildung 29 C). Unter den T-Lymphozyten waren 43% Helfer-/Inducer-Lymphozyten (CD4⁺) und 34% Suppressor-/zytotoxische Lymphozyten (CD8⁺). 23% der T-Lymphozyten exprimierten weder CD4 noch CD8. (Abbildung 29 D).

4.2.6.2 Rolling

Im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen rollten auf unstimulierten Endothelzellen $91,5 \pm 1,8\%$ ($P < 0,001$) weniger Lymphozyten. Die Inkubation von TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit der sHMO-Fraktion bewirkte eine Reduktion des Lymphozyten-Rollings um 14,2% auf $85,8 \pm 14,0\%$ ($P < 0,01$). Die Inkubation der Endothelzellen mit sLe^x hatte hingegen keinen Effekt ($P > 0,316$). Zwischen den Effekten der sHMO-Fraktion und sLe^x bestand kein signifikanter Unterschied ($P > 0,452$) (Abbildung 30 A).

4.2.6.3 Adhäsion

Auf unstimulierten Endothelzellen fand sich im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen eine um $91,5 \pm 1,8\%$ ($P < 0,001$) geringere Lymphozyten-Adhäsion. Die Inkubation von TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit sLe^x bewirkte eine Reduktion adhärenter Lymphozyten um 36,2% auf $63,8 \pm 9,5\%$ ($P < 0,001$). Die Inkubation der Endothelzellen mit der sHMO-Fraktion führte zu einer Reduktion der Lymphozyten-Adhäsion um 43,2% auf $56,8 \pm 11,6\%$ ($P < 0,001$). Die Reduktionseffekte nach Inkubation mit sLe^x oder mit der sHMO-Fraktion waren nicht signifikant verschieden ($P > 0,157$) (Abbildung 30 B).

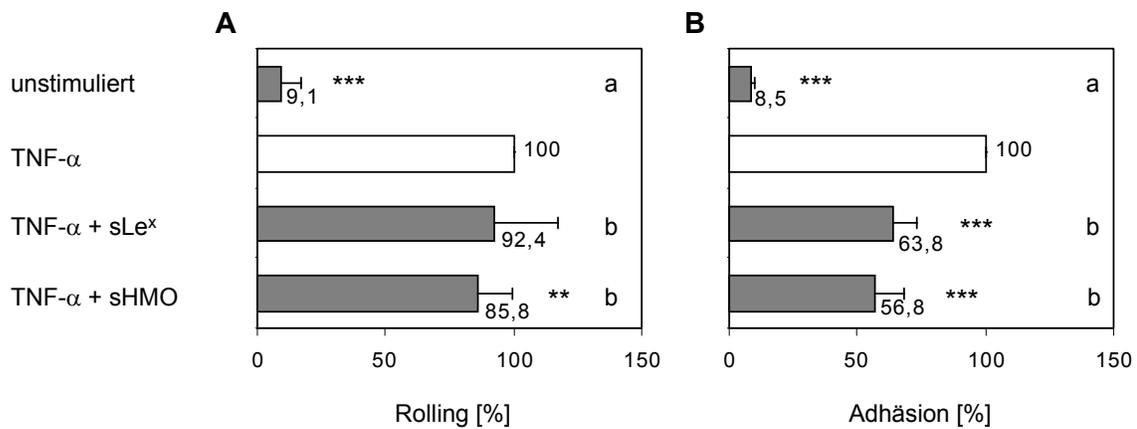


Abbildung 30. EINFLUSS AUF LYMPHOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTIONEN

Effekte von sLe^x und der sHMO-Fraktion auf Lymphozyten-Endothelzell-Interaktionen. Die zur Inkubation verwendeten Oligosaccharid-Konzentrationen im Zellkulturmedium betragen 125 $\mu\text{g/ml}$. Die Anzahl der rollenden (A) bzw. adhärenen (B) Lymphozyten nach Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit den verschiedenen Oligosacchariden wurde ins Verhältnis zur jeweiligen Anzahl rollender bzw. adhärenen Lymphozyten bei der TNF- α -stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden gesetzt (100%, weißer Balken).

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede durch die Inkubation mit Oligosacchariden im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen ohne Inkubation mit Oligosacchariden wurden gekennzeichnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten wurden mit Kleinbuchstaben markiert. Effekte mit gleichen Buchstaben waren nicht signifikant verschieden ($P > 0,05$).

4.2.7 Einfluss auf Granulozyten-Endothelzell-Interaktionen

4.2.7.1 Charakterisierung

In der aus humanem, peripheren Blut isolierten Fraktion wurden 97,5% der Zellen durchflusszytometrisch anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) als Granulozyten identifiziert (Abbildung 31 A). Die isolierten Granulozyten exprimierten sowohl CD15s (sLe^x), die am *Rolling* beteiligte Oligosaccharid-Bindungs determinante der Selektin-Liganden, als auch das an der festen Adhäsion beteiligte $\beta 2$ -Integrin CD11b (Abbildung 31 B).

4.2.7.2 Rolling

Aufgrund der technischen Gegebenheiten konnte das *Rolling* der Granulozyten nicht quantifiziert werden.

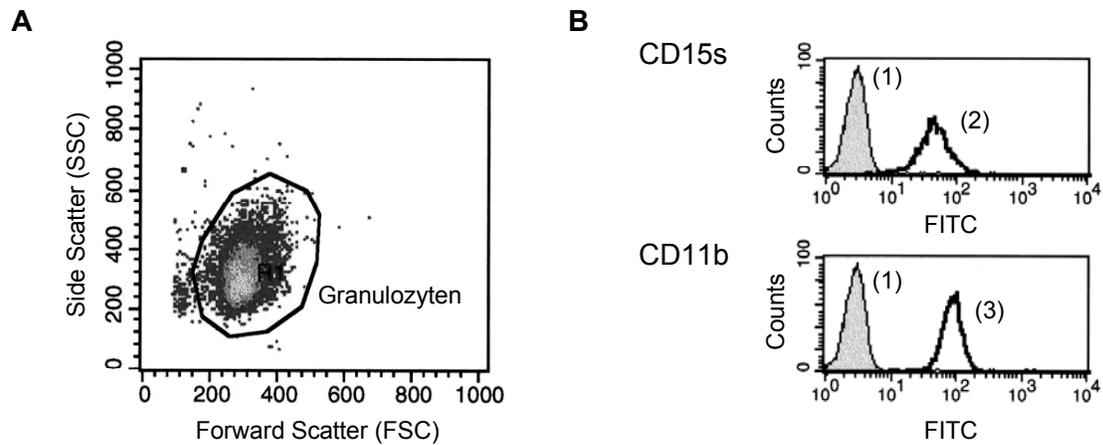


Abbildung 31. CHARAKTERISIERUNG DER GRANULOZYTEN

A: Von der Gesamtzellzahl wurden die Granulozyten anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) eingegrenzt (Oval) und so die relative Granulozyten-Konzentration bestimmt.

B: Der Vergleich der Fluoreszenzverteilungen mit den Isotypen-Negativkontrollen (1) zeigte, dass die isolierten Granulozyten sowohl CD15s (sLe^x, 2) als auch das β 2-Integrin CD11b (3) exprimieren.

4.2.7.3 Adhäsion

Auf unstimulierten Endothelzellen fand sich im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen eine um $82,3 \pm 4,4\%$ ($P < 0,001$) geringere Granulozyten-Adhäsion. Die Inkubation von TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit sLe^x bewirkte eine Reduktion adhärenter Granulozyten um 35,9% auf $64,1 \pm 6,5\%$ ($P < 0,001$). Die Inkubation der Endothelzellen mit der sHMO-Fraktion führte zu einer Reduktion der Granulozyten-Adhäsion um 46,1% auf $53,9 \pm 12,5\%$ ($P < 0,001$). Der Reduktionseffekt der sHMO-Fraktion war damit größer als der Effekt nach Inkubation mit sLe^x ($P < 0,05$) (Abbildung 32).

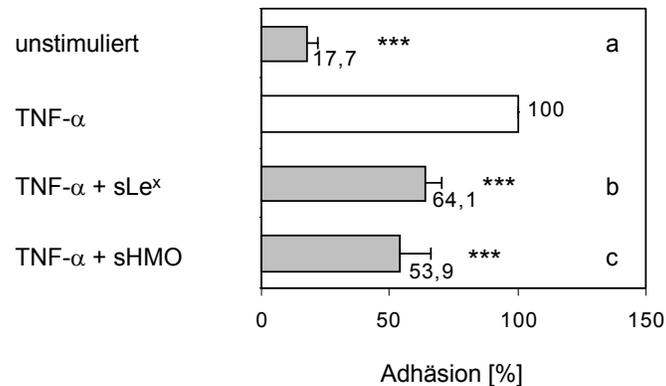


Abbildung 32. EINFLUSS AUF GRANULOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTIONEN

Effekte von sLe^x und der sHMO-Fraktion auf Granulozyten-Endothelzell-Interaktionen. Die zur Inkubation verwendeten Oligosaccharid-Konzentrationen im Zellkulturmedium betragen 125 $\mu\text{g/ml}$. Die Anzahl der adhärenen Granulozyten nach Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit den verschiedenen Oligosacchariden wurde ins Verhältnis zur Anzahl adhärenen Granulozyten bei der TNF- α -stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden gesetzt (100%, weißer Balken).

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede durch die Inkubation mit den Oligosacchariden im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen ohne Inkubation mit Oligosacchariden wurden gekennzeichnet (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten wurden mit Kleinbuchstaben markiert. Effekte mit gleichen Buchstaben waren nicht signifikant verschieden ($P > 0,05$).

4.2.8 Vergleich der Effekte auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Die Effekte, die sLe^x bzw. die saure HMO-Fraktion auf das *Rolling* und die Adhäsion der verschiedenen Leukozyten-Populationen hatten, wurden im Folgenden miteinander verglichen.

4.2.8.1 *Rolling*

Es konnte gezeigt werden, dass das *Rolling* auf unstimulierten Endothelzellen im Vergleich zu TNF- α -stimulierten Endothelzellen bei Lymphozyten stärker reduziert war als bei Monozyten ($P < 0,05$). Zwischen Monozyten und Lymphozyten konnte kein Unterschied der Effekte nach Inkubation mit sLe^x ($P > 0,612$) oder nach Inkubation mit der sauren HMO-Fraktion ($P > 0,137$) festgestellt werden (Abbildung 33 A).

4.2.8.2 Adhäsion

Die Reduktion der Adhäsion an unstimulierten Endothelzellen war bei Monozyten und Lymphozyten nicht signifikant verschieden ($P>0,675$). Die Granulozyten-Adhäsion an unstimulierten Endothelzellen war jedoch weniger stark reduziert als die Monozyten- ($P<0,05$) bzw. Lymphozyten-Adhäsion ($P<0,01$). Die Effekte von sLe^x auf die Adhäsion von Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten waren nicht signifikant verschieden. Die saure HMO-Fraktion hatte einen stärkeren Reduktionseffekt auf die Monozyten-Adhäsion als auf die Lymphozyten-Adhäsion ($P<0,05$). Sowohl zwischen den Effekten der sHMO auf die Monozyten- und Granulozyten-Adhäsion ($P>0,241$) als auch zwischen den Effekten der sHMO auf die Lymphozyten- und Granulozyten-Adhäsion ($P>0,465$) gab es keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 33 B).

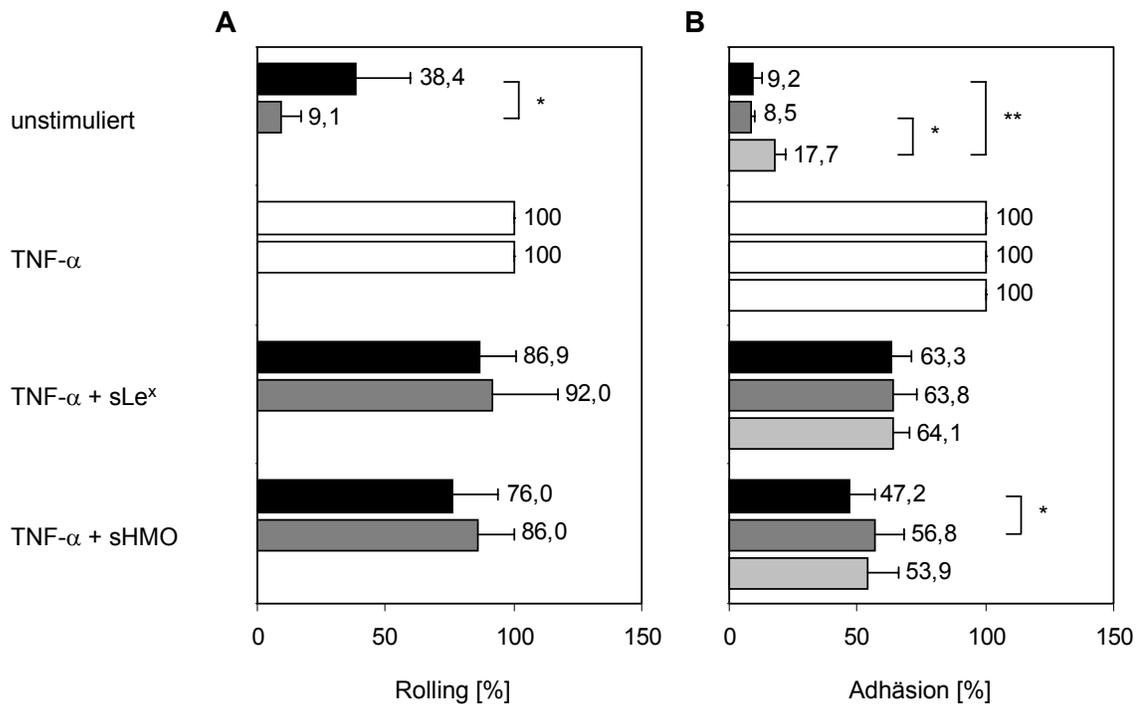


Abbildung 33. VERGLEICH DER EFFEKTE AUF LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTIONEN

Vergleich der Effekte von sLe^x bzw. der sHMO-Fraktion auf das *Rolling* (A) und die Adhäsion (B) zwischen Monozyten (schwarze Balken), Lymphozyten (dunkelgraue Balken) und Granulozyten (hellgraue Balken). Als Bezugspunkt diente jeweils das *Rolling* bzw. die Adhäsion an TNF- α -stimulierten Endothelzellen ohne Inkubation mit Oligosacchariden (100%, weißer Balken).

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten auf verschiedene Leukozyten wurden gekennzeichnet (* $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).

4.2.9 Einfluss der Endotoxin-Konzentration

Die in den vorangegangenen Versuchen verwendeten neutralen und sauren Oligosaccharid-Fractionen aus Humanmilch wiesen nach Detoxifikation mittels Affinitätschromatographie eine Endotoxin-Konzentration von 1.477,5 bzw. 1.862,6±244,6 pg/mg auf. Durch die Inkubation der Endothelzellen mit diesen Oligosaccharid-Fractionen in einer maximalen Konzentration von 125 µg/ml ergab sich daraus im Zellkulturmedium eine Endotoxin-Konzentration von 184,7 pg/ml für die neutrale bzw. 232,8±30,5 pg/ml für die saure HMO-Fraktion. Der Einfluss dieser Endotoxin-Konzentrationen auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurde im Folgenden untersucht. TNF- α -stimulierte Endothelzellen wurden für 1 Stunde mit einem Endotoxin-Standard (*E. coli* Serotyp O111:B4) in einer Konzentration von 1.000 pg/ml inkubiert. Anschließend wurden Monozyten in der parallelen Durchflussskammer über die Endothelzellen geleitet und das *Rolling* und die Monozyten-Adhäsion quantifiziert (Abbildung 34). Selbst bei einer weit höheren als der durch die Oligosaccharid-Fractionen eingebrachten Endotoxin-Konzentration führte die Inkubation der TNF- α -stimulierte Endothelzellen mit dem Endotoxin-Standard weder zu einer Veränderung des Monozyten-*Rollings* ($P>0,814$) noch zu einer Veränderung der Anzahl adhärenter Monozyten ($P>0,382$).

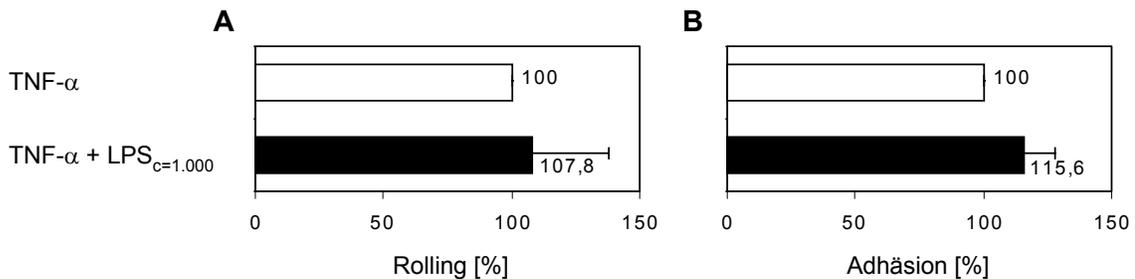


Abbildung 34. EINFLUSS DER ENDOTOXIN-KONZENTRATION AUF MONOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTIONEN

Die zur Inkubation verwendete Endotoxin-Konzentration c im Zellkulturmedium betrug 1.000 pg/ml. Die Anzahl der rollenden (**A**) bzw. adhären (**B**) Monozyten nach Inkubation der TNF- α -stimulierten Endothelzellen mit den Endotoxinen wurde ins Verhältnis zur jeweiligen Anzahl rollender bzw. adhärenter Monozyten bei der TNF- α -stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Endotoxinen gesetzt (100%, weisser Balken).

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

4.3 Untersuchung der Wirkung von Oligosacchariden auf Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl sLe^x als auch Oligosaccharide der sHMO-Fraktion in löslicher Form die Selektin-vermittelte Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen zu inhibieren vermögen. Im Folgenden wurde der Einfluss dieser Oligosaccharide auf die ebenfalls Selektin-vermittelte Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung untersucht. Die physiologische Bindungsdeterminante für Selektin-Liganden, sLe^x, diente als Positivkontrolle, während TriGal als Negativkontrolle fungierte. Die Effekte der neutralen und der sauren HMO-Fraktion wurden untersucht.

Peters *et al.* konnten zeigen, dass als Folge der P-Selektin-vermittelten Thrombozyten-Granulozyten-Bindung das β 2-Integrin CD11b vermehrt auf der Granulozyten-Oberfläche exprimiert wird (PETERS *et al.* 1997). Ob HMO die Expression dieses Granulozyten-Aktivitätsmarkers durch eine mögliche Blockierung der P-Selektin-Bindung beeinflussen können, wurde im Folgenden ebenfalls untersucht.

Zuvor wurde sowohl die Expression relevanter Thrombozyten- und Granulozyten-Adhäsionsmoleküle als auch die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung in Vollblut konfokalmikroskopisch dargestellt.

4.3.1 Konfokalmikroskopische Charakterisierung

Vollblut wurde zunächst zur Aktivierung der Thrombozyten mit 10 μ M ADP stimuliert. Die Oligosaccharid-Bindungsdeterminante CD15s (sLe^x) des Selektin-Liganden PSGL-1 bzw. das als Folge der Thrombozyten-Aktivierung vermehrt exprimierte CD11b wurden mit FITC-konjugierten Antikörpern markiert. Die doppelsträngige DNA des Zellkerns wurde mit dem Fluorochrom TO-PRO-3-Iodid markiert (Abbildung 35). Granulozyten konnten anhand ihres polymorphen Zellkerns identifiziert werden (rot) und wiesen eine ungleichmäßige CD15s-Verteilung auf der Zelloberfläche auf. Diese Clusterung konnte bei stärkerer Vergrößerung noch deutlicher gezeigt werden (Abbildung 35 A und B, grün). Das β 2-Integrin CD11b wurde ebenfalls auf der Granulozyten-Oberfläche exprimiert. Die Verteilung war hingegen gleichmäßiger als bei CD15s (Abbildung 35 B, grün).

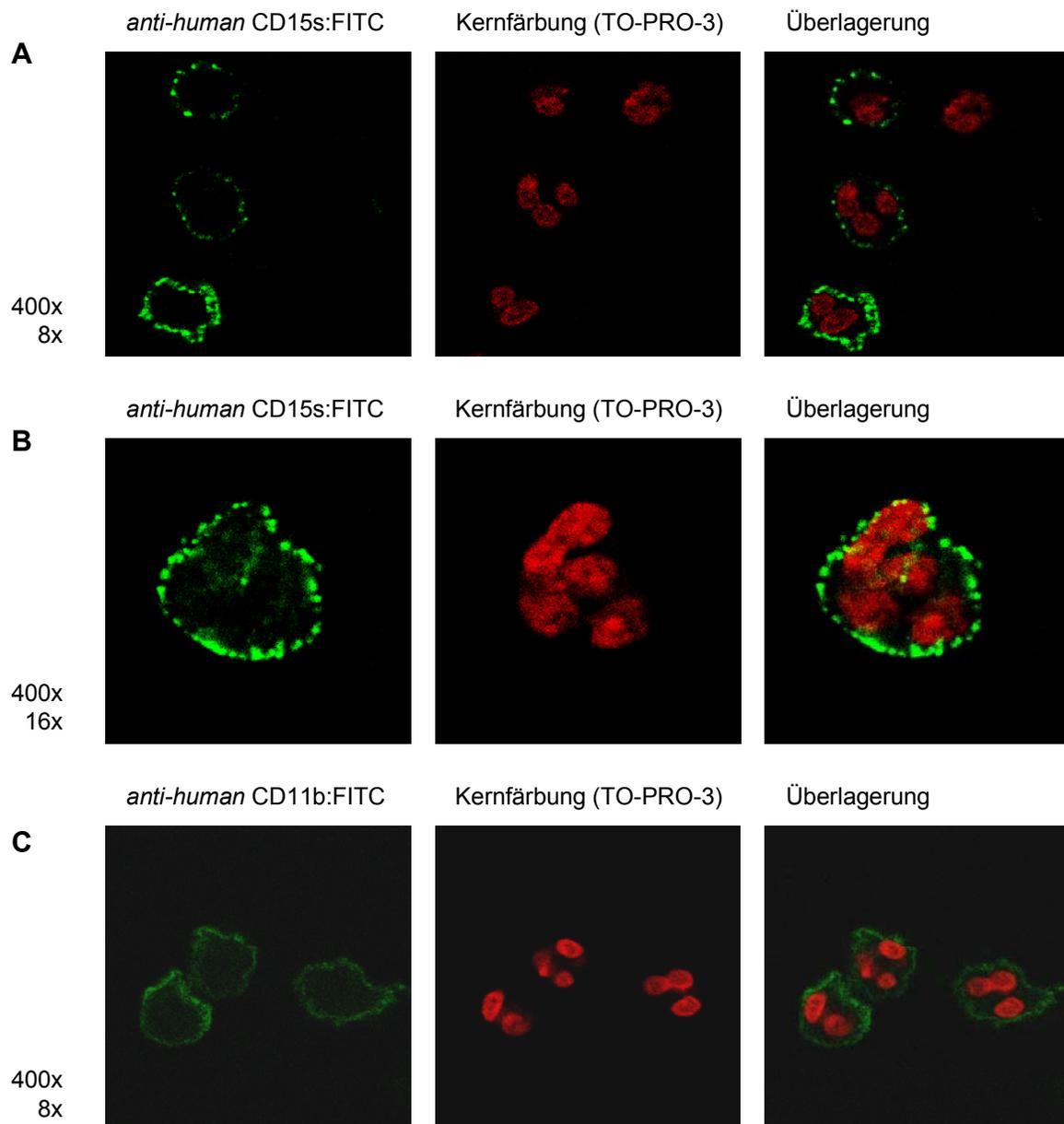


Abbildung 35. KONFOKALMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER EXPRESSION DER GRANULOZYTEN-ADHÄSIONSMOLEKÜLE CD15S UND CD11B

Zweifarbennimmunofluoreszenzdarstellung der Expression der Adhäsionsmoleküle CD15s (sLe^x, **A, B**) und CD11b (**C**) auf polymorphkernigen Granulozyten aus ADP-stimuliertem Vollblut mit 400-fach optischer und 8-fach digitaler Vergrößerung (**A, C**) bzw. 16-fach digitaler Vergrößerung (**B**). Jedes Einzelbild stellt die Überlagerung von jeweils drei konfokalen Schnitten (0,5 µm Abstand) dar. Die Adhäsionsmoleküle sind jeweils in grün dargestellt (links), während die doppelsträngige DNA des Zellkerns rot gefärbt wurde (Mitte). Das rechte Bild zeigt jeweils die Überlagerung der beiden Färbungen.

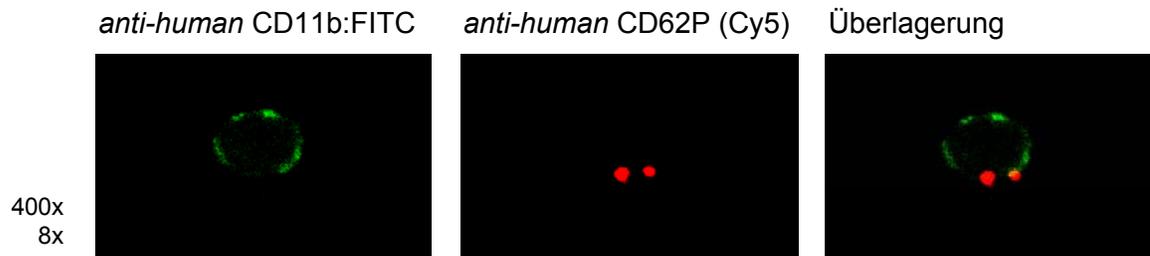


Abbildung 36. KONFOKALMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER BILDUNG VON THROMBOZYTEN-GRANULOZYTEN-KOMPLEXEN

Zweifarbimmunofluoreszenzdarstellung der Expression des Granulozytenmarkes CD11b (grün) und des Thrombozytenmarkers CD62P (rot) aus ADP-stimuliertem Vollblut mit 400-fach optischer und 8-fach digitaler Vergrößerung. Jedes Einzelbild stellt die Überlagerung von jeweils drei konfokalen Schnitten (0,5 µm Abstand) dar. Die Überlagerung (rechts) zeigte die Assoziation von Thrombozyten und Granulozyten.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Thrombozyten P-Selektin (CD62P) exprimieren, welches den initialen Schritt der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung vermittelt (Abbildung 36, rot). Die Überlagerung mit den CD11b-markierten Granulozyten (Abbildung 36, grün) zeigte, dass die Thrombozyten mit den Granulozyten assoziiert auftreten, d.h. eine Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen stattfindet.

4.3.2 Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe in ADP-stimuliertem Vollblut

Die Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen wurden zunächst an unstimuliertem Vollblut untersucht. Im Durchflusszytometer wurden die Granulozyten anhand ihrer Größe und Granularität eingegrenzt (Abbildung 37 A) und anschließend sowohl die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung als auch die CD11b-Expression der Granulozyten mittels direkter Zweifarbimmunofluoreszenz bestimmt.

Da es sich bei CD11b um einen Granulozyten-Marker handelt, CD42a aber ausschließlich von Thrombozyten exprimiert wird, stellen eingegrenzte Messereignisse, die sowohl eine spezifische Antikörperbindung für CD11b als auch für CD42a zeigen, Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe dar (rechter, oberer Quadrant im CD11b/CD42a-Punktdiagramm, Abbildung 37 B). Im unstimulierten Blut waren rund 14,5% der Granulozyten mit Thrombozyten assoziiert. 93,3% der Zellen exprimierten CD11b.

Zur Aktivierung der Thrombozyten wurde das Vollblut mit 10 μ M ADP stimuliert (PETERS *et al.* 1997). Die Fluoreszenzintensitätsverteilung für CD11b und CD42a der eingegrenzten Granulozyten ist im Punktdiagramm in Abbildung 37 C dargestellt. Der Anteil der mit Thrombozyten assoziierten Granulozyten (rechter oberer Quadrant) war deutlich gestiegen. Im ADP-stimulierten Vollblut waren 30,7% der Granulozyten mit Thrombozyten assoziiert.

98,8% der Zellen exprimierten das β 2-Integrin CD11b. Die Fluoreszenzintensitätsverteilung für CD11b (Abbildung 37 C2) zeigt im Vergleich zum unstimulierten Blut (Abbildung 37 B2) einen deutlichen Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität, d.h. die einzelnen Granulozyten exprimieren nach Aktivierung der Thrombozyten mit ADP im Durchschnitt mehr CD11b.

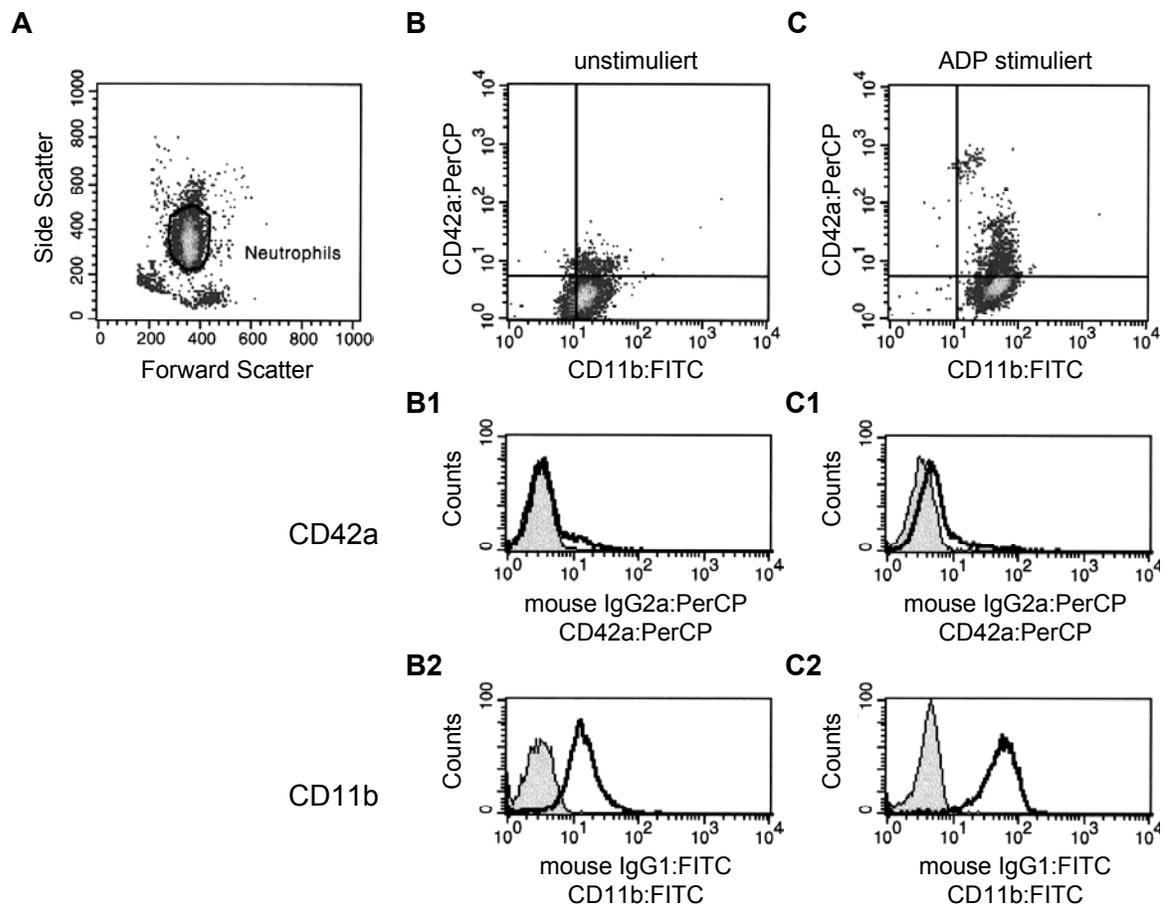


Abbildung 37. THROMBOZYTEN-GRANULOZYTEN-KOMPLEXE IN VOLLBLUT

A: Granulozyten wurden anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) eingegrenzt.

B: Die Anzahl der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe wurde nach dem Prinzip der direkten Zweifarbenimmunofluoreszenz bestimmt. Die Abtrennung der Quadranten erfolgte aufgrund der Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen (**B1**, **B2**). Die Trennlinien repräsentieren jeweils die 98%-Schwelle der Fluoreszenzintensität der Isotypen-Negativkontrollen. Messereignisse, die sowohl eine positive Antikörperbindung für CD11b als auch für CD42a zeigen, wurden als Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe gewertet (rechter, oberer Quadrant).

C: Nach Aktivierung der Thrombozyten mit ADP erhöhte sich der Anteil der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe (**C1**). Darüber hinaus kam es zu einer deutlichen Verschiebung der CD11b-Fluoreszenzintensitätsverteilung (**C2**), d.h. die Granulozyten exprimierten vermehrt den Aktivitätsmarker CD11b.

B1, **B2**, **C1**, **C2:** Fluoreszenzintensitätshistogramme. Die schwarzen Linien stellen die Fluoreszenzverteilungen für CD42a bzw. CD11b dar. Die grauschraffierten Flächen repräsentieren die entsprechenden Verteilungen der Isotypen-Negativkontrollen.

4.3.3 Qualitative Struktur-Wirkungs-Beziehung

Um den Einfluss von Oligosacchariden auf die Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen zu untersuchen, wurde Vollblut zunächst zur Aktivierung der Thrombozyten mit 10 μM ADP stimuliert und anschließend in einer Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ für 30 min mit sLe^x, TriGal oder der neutralen bzw. sauren HMO-Fraktion inkubiert (Abbildung 38).

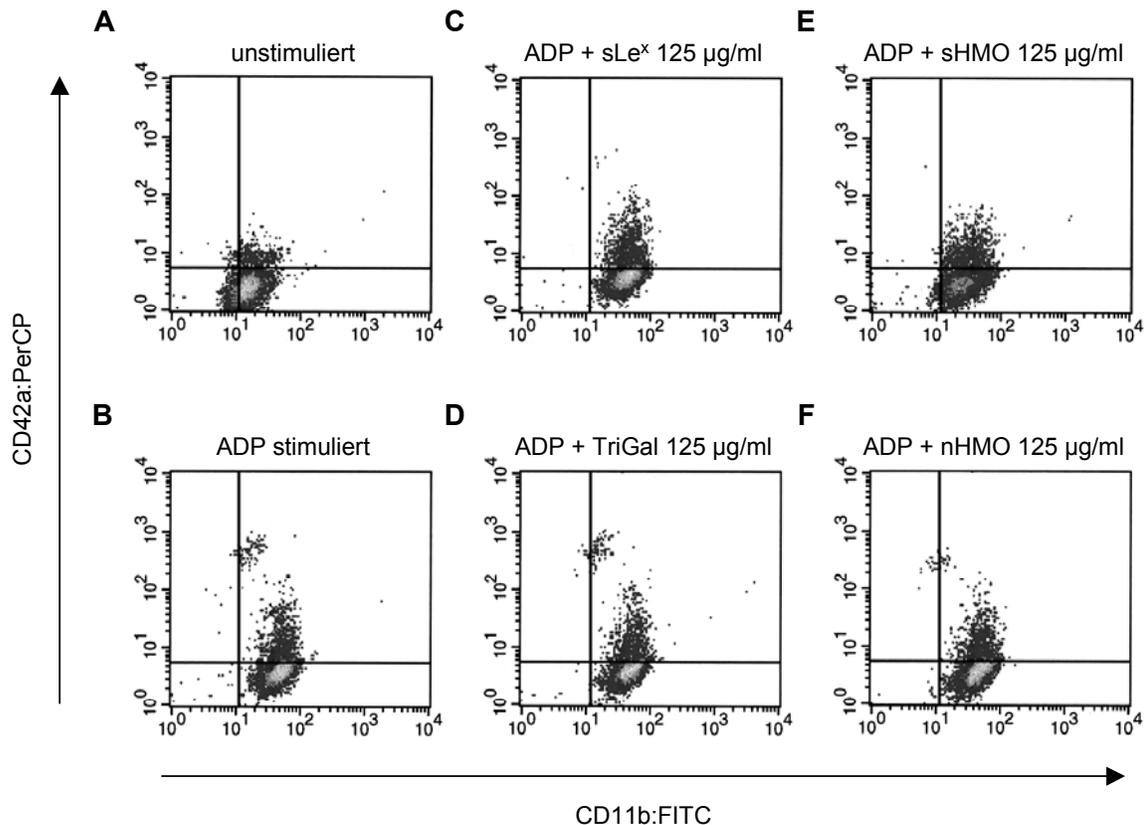


Abbildung 38. QUALITATIVE STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNG

Durchflusszytometrische Untersuchung der Effekte verschiedener Oligosaccharide auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung. Die Konzentration der Oligosaccharid-Standards bzw. -Fraktionen im Vollblut betrug jeweils 125 $\mu\text{g/ml}$. Die Abtrennung der Quadranten erfolgte aufgrund der Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen. Die Trennlinien repräsentieren jeweils die 98%-Schwelle der Fluoreszenzintensität der Isotypen-Negativkontrollen.

Im Vergleich zum unstimulierten Blut (**A**) war der Anteil an Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen (rechter, oberer Quadrant) nach Stimulation mit ADP deutlich erhöht (**B**). Die zusätzliche Inkubation mit sLe^x (**C**) oder der sHMO-Fraktion (**E**) zeigte eine Reduktion der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe im Vergleich zum ADP-stimulierten Blut ohne Inkubation mit Oligosacchariden (**B**). Sowohl TriGal (**D**) als auch die nHMO-Fraktion (**F**) zeigten keinen Effekt.

Im Vergleich zum ADP-stimulierten Blut ohne Inkubation mit Oligosacchariden (Abbildung 38 B) zeigte die zusätzliche Inkubation mit sLe^x im CD11b/CD42a-Punktdiagramm (Abbildung 38 C) sowohl eine Verschiebung nach unten (verminderte Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung) als auch eine Verschiebung nach links (verminderte CD11b-Expression). Die Inkubation mit TriGal zeigte im Vergleich zum ADP-stimulierten Blut ohne Oligosaccharid-Inkubation keine Veränderung (Abbildung 38 D). Wurde das Blut mit der sHMO-Fraktion inkubiert zeigte sich eine deutlich verminderte Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung und auch die CD11b-Expression der Granulozyten war deutlich reduziert (Abbildung 38 E). Die nHMO-Fraktion hatte hingegen keinen Effekt (Abbildung 38 F).

Neben der qualitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung sollten die Effekte der verschiedenen Oligosaccharide auf die Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen auch quantifiziert werden. Zuvor wurde jedoch die optimale Inkubationszeit mit den Oligosacchariden bestimmt.

4.3.4 Zeit-Wirkungs-Beziehung

Da die Inkubationsdauer mit den Oligosacchariden möglicherweise einen Einfluss auf deren Wirkung hat, wurde im Folgenden zunächst die optimale Inkubationsdauer anhand der sHMO-Fraktion ermittelt. Vollblut wurde zur Aktivierung der Thrombozyten für 5 min mit 10 µM ADP stimuliert und anschließend für 60, 45, 30, 15 und 5 min mit der sHMO-Fraktion in einer Konzentration von 125 µg/ml inkubiert oder sofort nach der Zugabe der sHMO-Fraktion analysiert (t=0).

Der Einfluss der Oligosaccharide auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wurde als prozentuales Verhältnis der medianen Fluoreszenzintensität von CD42a (MFI_{CD42a}) im Vergleich zur ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden angegeben. Bei Zugabe der Oligosaccharide zu ADP-stimuliertem Blut und sofortiger Analyse ohne Inkubationszeit verringerte sich das MFI_{CD42a}-Verhältnis und damit die Anzahl der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe um 3,6 auf 96,4%. Nach einer Inkubationszeit von 5, 15, 30, 45 bzw. 60 min reduzierte sich die Komplexbildung entsprechend auf 85,8, 77,7, 78,4, 79,9 bzw. 82,1% (Abbildung 39). Da der Effekt auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung nach einer Inkubationszeit von 15 min maximal war, wurden in der Folge alle weiteren Experimente mit dieser Inkubationszeit durchgeführt.

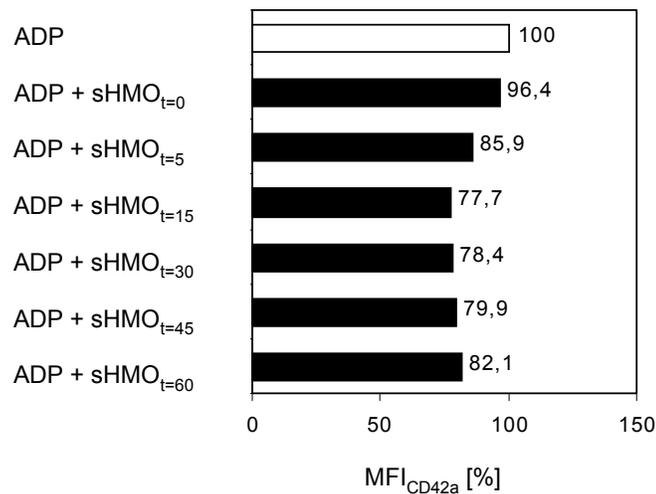


Abbildung 39. ZEIT-WIRKUNGS-BEZIEHUNG

Durchflusszytometrische Untersuchung der Effekte verschiedener Inkubationszeiten auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung. Die zur Inkubation verwendete Konzentration der sHMO-Fraktion im Vollblut betrug 125 µg/ml. Die MFI_{CD42a} der einzelnen Ansätze wurde ins Verhältnis zur MFI_{CD42a} der ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden gesetzt (100%, weißer Balken). MFI_{CD42a} gilt als Maß für die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung. Durch die Inkubation mit der sHMO-Fraktion wurde die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (t) reduziert. Ein maximaler Effekt zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 15 min.

4.3.5 Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung

Zur Quantifizierung der Struktur-Wirkungs-Beziehung wurde Vollblut zur Aktivierung der Thrombozyten mit 10 µM ADP stimuliert und anschließend für 15 min mit sLe^x, TriGal, nHMO oder sHMO in einer Konzentration von 125 µg/ml inkubiert. Für jeden Standard bzw. für jede HMO-Fraktion wurden jeweils zehn unabhängige Experimente mit Blut verschiedener Spender durchgeführt.

4.3.5.1 Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung

Der Einfluss der Oligosaccharide auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wurde als MFI_{CD42a}-Verhältnis im Vergleich zur ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden angegeben (Abbildung 40 A). In unstimuliertem Blut fand sich eine um 37,9±13,2% ($P < 0,001$) geringere Anzahl an Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen als in ADP-stimuliertem Blut (100%).

Die Inkubation des ADP-stimulierten Blutes mit sLe^x bewirkte eine Reduktion der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung um 14,7 auf 85,3±8,8% ($P < 0,01$). Das als

Negativkontrolle verwendete TriGal hatte hingegen keinen Effekt ($P>0,344$). Die Inkubation mit der sHMO-Fraktion führte zu einer Reduktion der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung um 20,3% auf $79,7\pm 7,4\%$ ($P<0,001$). Durch Inkubation mit der nHMO-Fraktion wurde die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen um 3,7% auf $96,3\pm 4,2\%$ ($P<0,05$) verringert. Der Reduktionseffekt der sHMO-Fraktion war signifikant größer als der Effekt der nHMO-Fraktion ($P<0,001$).

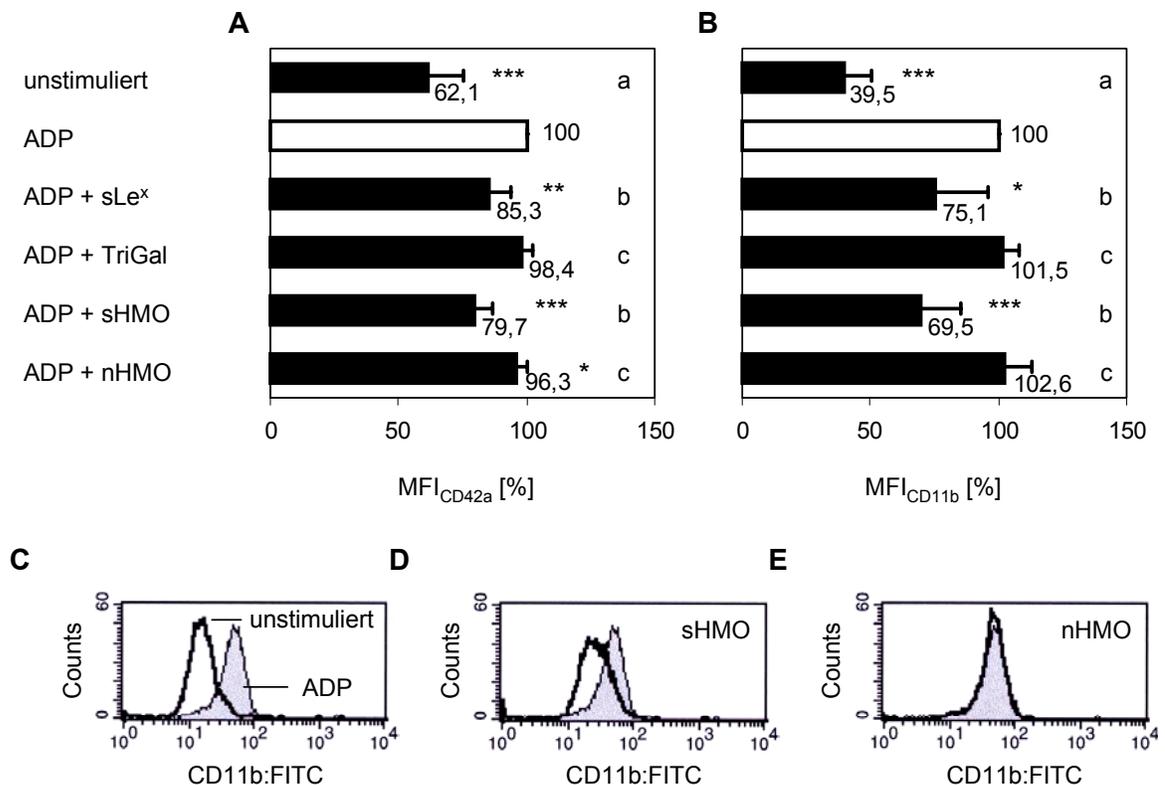


Abbildung 40. STRUKTUR-WIRKUNGS-BEZIEHUNG

Durchflusszytometrische Untersuchung der Effekte verschiedener Oligosaccharid-Standards bzw. Fraktionen auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung. Die zur Inkubation verwendete Oligosaccharid-Konzentration im Vollblut betrug 125 µg/ml. Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CD42a (**A**) bzw. CD11b (**B**) der einzelnen Ansätze wurde ins Verhältnis zur jeweiligen MFI der ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden gesetzt (100%, weißer Balken). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von zehn unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede durch die Inkubation mit Oligosacchariden im Vergleich zum ADP-stimulierten Blut ohne Inkubation mit Oligosacchariden wurden gekennzeichnet. (* $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der einzelnen Oligosaccharid-Standards bzw. -Fraktionen wurden mit Kleinbuchstaben markiert. Gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied ($P>0,05$).

C: Die schwarze Linie zeigt die CD11b-Fluoreszenzintensitätsverteilung der unstimulierten Kontrolle. Die grauschraffierte Fläche stellt die Verteilung nach Stimulation mit ADP dar. **D, E:** Die schwarze Linie zeigt die CD11b-Fluoreszenzintensitätsverteilung des mit ADP-stimulierten und mit sHMO bzw. nHMO inkubierten Blutes. Die grauschraffierte Fläche stellt die Verteilung des ADP-stimulierten Blutes ohne weitere Inkubation mit Oligosacchariden dar.

4.3.5.2 Expression des β 2-Integrins CD11b

Der Einfluss der Oligosaccharide auf die CD11b-Expression wurde als MFI_{CD11b} -Verhältnis im Vergleich zur ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden angegeben (Abbildung 40 B). Die CD11b-Expression der Granulozyten in unstimuliertem Blut war um $60,5 \pm 11,1\%$ ($P < 0,001$) geringer als in ADP-stimuliertem Blut (100%, Abbildung 40 C).

Wurde das ADP-stimulierte Blut mit sLe^x inkubiert verringerte sich die CD11b-Expression um 24,9% auf $75,1 \pm 20,5\%$ ($P < 0,05$). Die Negativkontrolle, TriGal, hatte keinen Effekt ($P > 0,565$). Die Inkubation mit der sHMO-Fraktion führte zu einer Reduktion der CD11b-Expression um 30,5% auf $69,5 \pm 15,7\%$ ($P < 0,001$) (Abbildung 40 D). Die nHMO-Fraktion hatte keinen Effekt ($P > 0,134$) (Abbildung 40 E).

4.3.6 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde die Konzentration der sHMO-Fraktion im Vollblut sukzessive vermindert. Vollblut wurde zur Aktivierung der Thrombozyten mit 10 μ M ADP stimuliert und anschließend für 15 min mit der sHMO-Fraktion in den folgenden Konzentrationen inkubiert: 125, 87,5, 50, 25, 12,5 und 6,25 μ g/ml. Für jede Konzentration wurden jeweils zehn unabhängige Experimente mit Blut verschiedener Spender durchgeführt.

4.3.6.1 Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung

Der Einfluss der Oligosaccharide auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wurde als MFI_{CD42a} -Verhältnis im Vergleich zur ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden angegeben (Abbildung 41 A). Die Anzahl der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe in unstimuliertem Blut war um $37,9 \pm 13,2\%$ ($P < 0,001$) geringer als nach Aktivierung der Thrombozyten mit ADP (100%).

Die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung in ADP-stimuliertem Blut wurde nach Inkubation mit der sHMO-Fraktion in einer Konzentration von 125, 87,5, 50, 25 bzw. 12,5 μ g/ml auf $79,7 \pm 7,4\%$ ($P < 0,001$), $82,2 \pm 7,0\%$ ($P < 0,001$), $86,4 \pm 7,1\%$ ($P < 0,001$), $90,2 \pm 4,8\%$ ($P < 0,001$) bzw. $92,7 \pm 3,7\%$ ($P < 0,001$) reduziert. Die Inkubation des Blutes mit der sHMO-Fraktion in einer Konzentration von 6,25 μ g/ml hatte keinen Einfluss auf die Bildung von

Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen ($P>0,053$). Die Effekte bei einer Konzentration von 25 und 12,5 $\mu\text{g/ml}$ waren nicht signifikant verschieden.

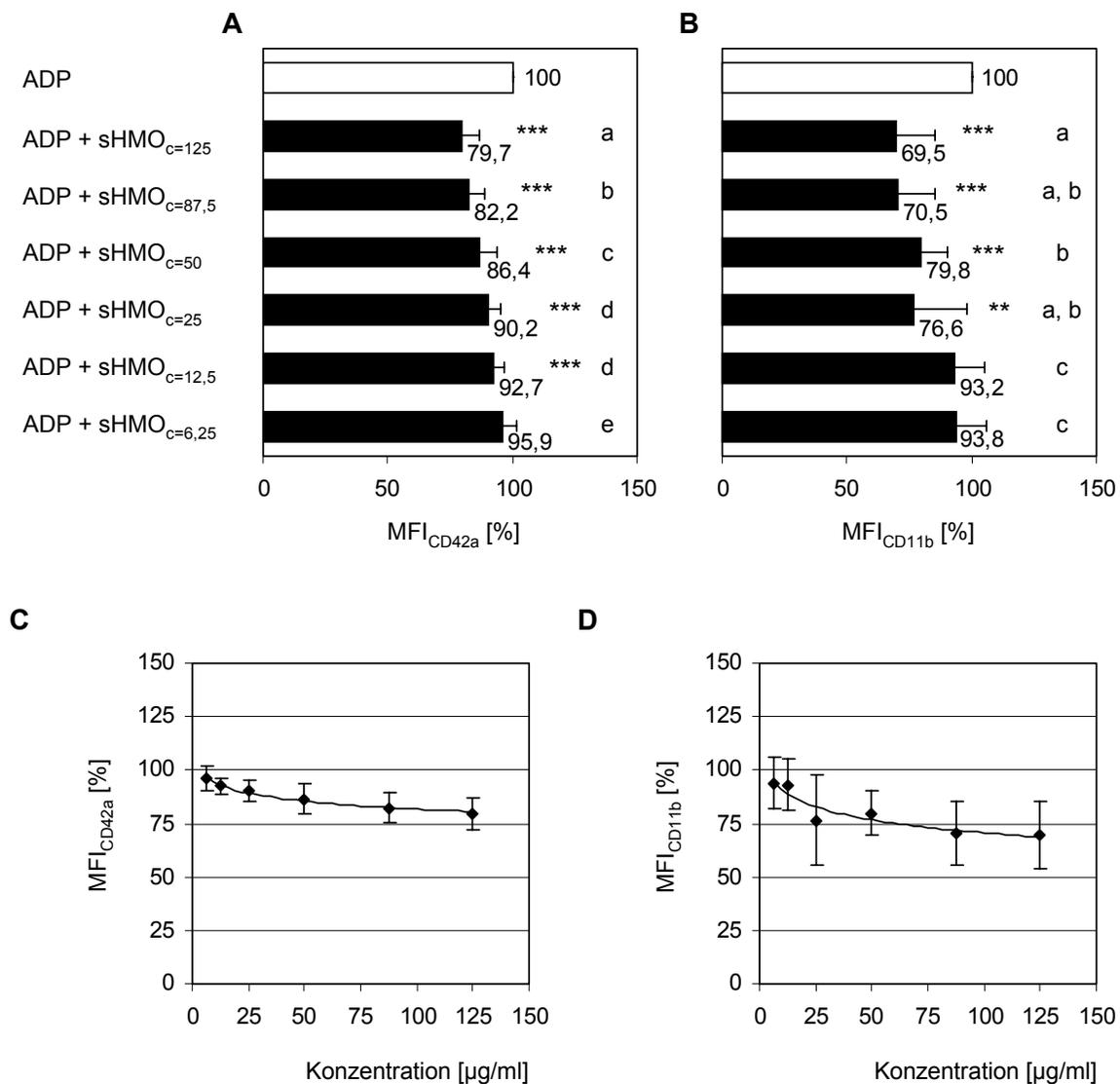


Abbildung 41. DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG

Durchflusszytometrische Untersuchung der Effekte verschiedener sHMO-Konzentrationen (c , in $\mu\text{g/ml}$) auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung. Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CD42a (**A**) bzw. CD11b (**B**) der einzelnen Ansätze wurde ins Verhältnis zur jeweiligen MFI der ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden gesetzt (100%, weißer Balken).

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von zehn unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede durch die Inkubation mit Oligosacchariden im Vergleich zum ADP-stimulierten Blut ohne Inkubation mit Oligosacchariden wurden gekennzeichnet. (* $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der einzelnen sHMO-Konzentrationen wurden mit Kleinbuchstaben markiert. Gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied ($P>0,05$). Für die Reduktionseffekte der sHMO-Fraktion wurde jeweils eine Regressionskurve angegeben (**C**, **D**).

Die Berechnung der Regressionskurve für die Effekte auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung in Abhängigkeit von der sHMO-Konzentration lieferte einen logarithmischen Funktionsverlauf (Abbildung 41 C). Bei zunehmender sHMO-Konzentration nimmt der Grenzeffekt ab, d.h. pro zusätzlicher Konzentrationseinheit wird der Effekt auf die Komplexbildung geringer.

4.3.6.2 Expression des β 2-Integrins CD11b

Der Einfluss der Oligosaccharide auf die CD11b-Expression wurde als MFI_{CD11b} -Verhältnis im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Oligosacchariden angegeben (Abbildung 41 B). In unstimuliertem Blut exprimierten die Granulozyten um $60,5 \pm 11,1\%$ ($P < 0,001$) weniger CD11b als in ADP-stimuliertem Blut (100%).

Die Inkubation des ADP-stimulierten Blutes mit der sHMO-Fraktion führte bei einer Oligosaccharid-Konzentration von 125, 87,5, 50 bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$ zu einer Reduktion der CD11b-Expression auf $69,5 \pm 15,7\%$ ($P < 0,001$), $70,5 \pm 14,9\%$ ($P < 0,001$), $79,8 \pm 10,6\%$ ($P < 0,001$) bzw. $76,6 \pm 21,3\%$ ($P < 0,01$). In einer Konzentration von 12,5 und 6,25 $\mu\text{g/ml}$ hatte die sHMO-Fraktion keinen Effekt auf die CD11b-Expression ($P > 0,108$ und $P > 0,134$).

Die Effekte bei einer Konzentration von 125, 87,5 und 25 $\mu\text{g/ml}$ wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ($P > 0,05$). Gleiches galt für die Effekte bei einer Konzentration von 87,5, 50 und 25 $\mu\text{g/ml}$ sowie bei 12,5 und 6,25 $\mu\text{g/ml}$.

Die Berechnung der Regressionskurve für die sHMO-Effekte auf die CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche lieferte einen logarithmischen Funktionsverlauf (Abbildung 41 D).

4.3.7 Einfluss der Endotoxin-Konzentration

Die in den vorangegangenen Versuchen verwendeten neutralen und sauren Oligosaccharid-Fractionen aus Humanmilch wiesen nach Detoxifikation mittels Affinitätschromatographie eine Endotoxin-Konzentration von $815,5 \pm 2,1$ bzw. $790,9 \pm 121,4$ pg/mg auf. Durch die Inkubation des Vollblutes mit diesen Oligosaccharid-Fractionen in einer maximalen Konzentration von 125 $\mu\text{g/ml}$ ergab sich daraus im Vollblut eine Endotoxin-Konzentration von $102,0 \pm 0,2$ pg/ml für die neutrale bzw. $98,9 \pm 15,2$ pg/ml für

die saure HMO-Fraktion. Der Einfluss dieser Endotoxin-Konzentration auf die Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen wurde im Folgenden untersucht. Unstimuliertes sowie ADP-stimuliertes Blut wurde für 15 min bei Raumtemperatur mit einem Endotoxin-Standard (*E. coli* Serotyp O111:B4) in zwei verschiedenen Konzentrationen (100 pg/ml und 1.000 pg/ml) inkubiert. Für jede Variable wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt.

4.3.7.1 Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung

Der Einfluss der Endotoxine auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wurde als MFI_{CD42a} -Verhältnis im Vergleich zur ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Endotoxinen angegeben (Abbildung 42 A). Die Inkubation des unstimulierten Blutes mit Endotoxinen führte weder bei der relevanten Konzentration von 100 pg/ml ($P > 0,423$) noch bei einer entsprechend höheren Konzentration von 1.000 pg/ml ($P > 0,664$) zu einer Veränderung der Anzahl an Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen. Die Inkubation des ADP-stimulierten Blutes mit dem Endotoxin-Standard führte ebenfalls zu keiner Veränderung bei der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung ($P > 0,915$ bei 100 pg/ml bzw. $P > 0,066$ bei 1.000 pg/ml).

4.3.7.2 Expression des $\beta 2$ -Integrins CD11b

Der Einfluss der Endotoxine auf die CD11b-Expression wurde als MFI_{CD11b} -Verhältnis im Vergleich zur ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Endotoxinen angegeben (Abbildung 42 B). Die Inkubation des unstimulierten Blutes mit Endotoxinen führte bei einer relevanten Konzentration von 100 pg/ml zu keiner Veränderung der CD11b-Expression ($P > 0,184$). Bei einer Endotoxin-Konzentration von 1.000 pg/ml war die CD11b-Expression der Granulozyten jedoch signifikant erhöht ($P < 0,05$). Diese Endotoxin-Konzentration wurde durch die Verwendung der HMO-Fractionen jedoch nicht erreicht. Die Inkubation des ADP-stimulierten Blutes mit dem Endotoxin-Standard führte weder bei einer Konzentration von 100 pg/ml ($P > 0,417$) noch bei einer Konzentration von 1.000 pg/ml ($P > 0,102$) zu einer Veränderung der CD11b-Expression der Granulozyten.

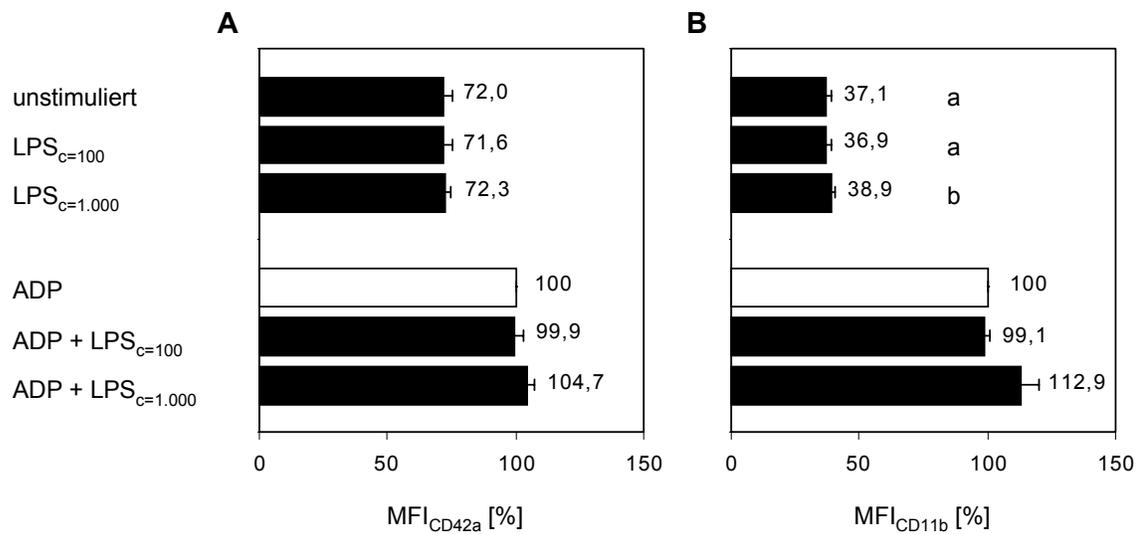


Abbildung 42. EINFLUSS DER ENDOTOXIN-KONZENTRATION

Durchflusszytometrische Untersuchung der Effekte von Endotoxinen in einer Konzentration von 100 bzw. 1.000 pg/ml auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung. Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CD42a (**A**) bzw. CD11b (**B**) der einzelnen Ansätze wurde ins Verhältnis zur jeweiligen MFI der ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Endotoxinen gesetzt (100%, weißer Balken).

Signifikante Unterschiede durch die Inkubation von unstimuliertem bzw. ADP-stimuliertem Blut mit Endotoxinen im Vergleich zur unstimulierten bzw. ADP-stimulierten Kontrolle ohne Inkubation mit Endotoxinen wurden mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Gleiche Buchstaben bedeuten keinen signifikanten Unterschied ($P > 0,05$).

4.4 Untersuchung der Wirkung von Oligosacchariden auf Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Oligosaccharide der sauren HMO-Fraktion Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen inhibieren können, sowohl zwischen Leukozyten und Endothelzellen als auch zwischen Thrombozyten und Granulozyten. Als Folge der reduzierten Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung nach Inkubation mit der sHMO-Fraktion kam es zu einer verminderten Expression von CD11b auf der Granulozyten-Oberfläche. Dieses β 2-Integrin spielt bei der Extravasation von Granulozyten ins umliegende Gewebe eine wichtige Rolle, indem es als Heterodimer mit CD18 an endothelständige Moleküle der Immunglobulin Superfamilie bindet und somit die feste Adhäsion ans Endothel vermittelt (Abschnitt 1.3.1.1.2). Im Folgenden wurde untersucht, ob die durch HMO reduzierte CD11b-Expression die Granulozyten-Adhäsion an Endothelzellen beeinflusst.

4.4.1 Untersuchungen mit isolierten Thrombozyten und Granulozyten

Die Interaktionen zwischen Thrombozyten, Granulozyten und Endothelzellen sollten zunächst anhand von isolierten Thrombozyten und Granulozyten untersucht werden. Hierfür wurde eine Thrombozyten-Granulozyten-Suspension in die Durchflussskammer injiziert, um dort mit den Endothelzellen zu interagieren. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der isolierten Granulozyten konnte jedoch beobachtet werden, dass die CD11b-Expression im Vergleich zu ruhenden Granulozyten im Vollblut bereits erhöht war (Abbildung 43 A). Wurden die Granulozyten mit ruhenden Thrombozyten versetzt, konnte keine weitere Expressionsinduktion des β 2-Integrins CD11b festgestellt werden (Abbildung 43 B). Die Stimulation der Thrombozyten mit 10 μ M ADP führte zwar zu einer Erhöhung der P-Selektin-Expression auf der Thrombozyten-Oberfläche und zu einer vermehrten Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen. Die CD11b-Expression der Granulozyten konnte jedoch nicht weiter stimuliert werden (Abbildung 43 C).

Da die Aktivierung der Thrombozyten keinen Einfluss auf die CD11b-Expression der isolierten Granulozyten zeigte, wurden die Versuche mit isolierten Thrombozyten und Granulozyten eingestellt.

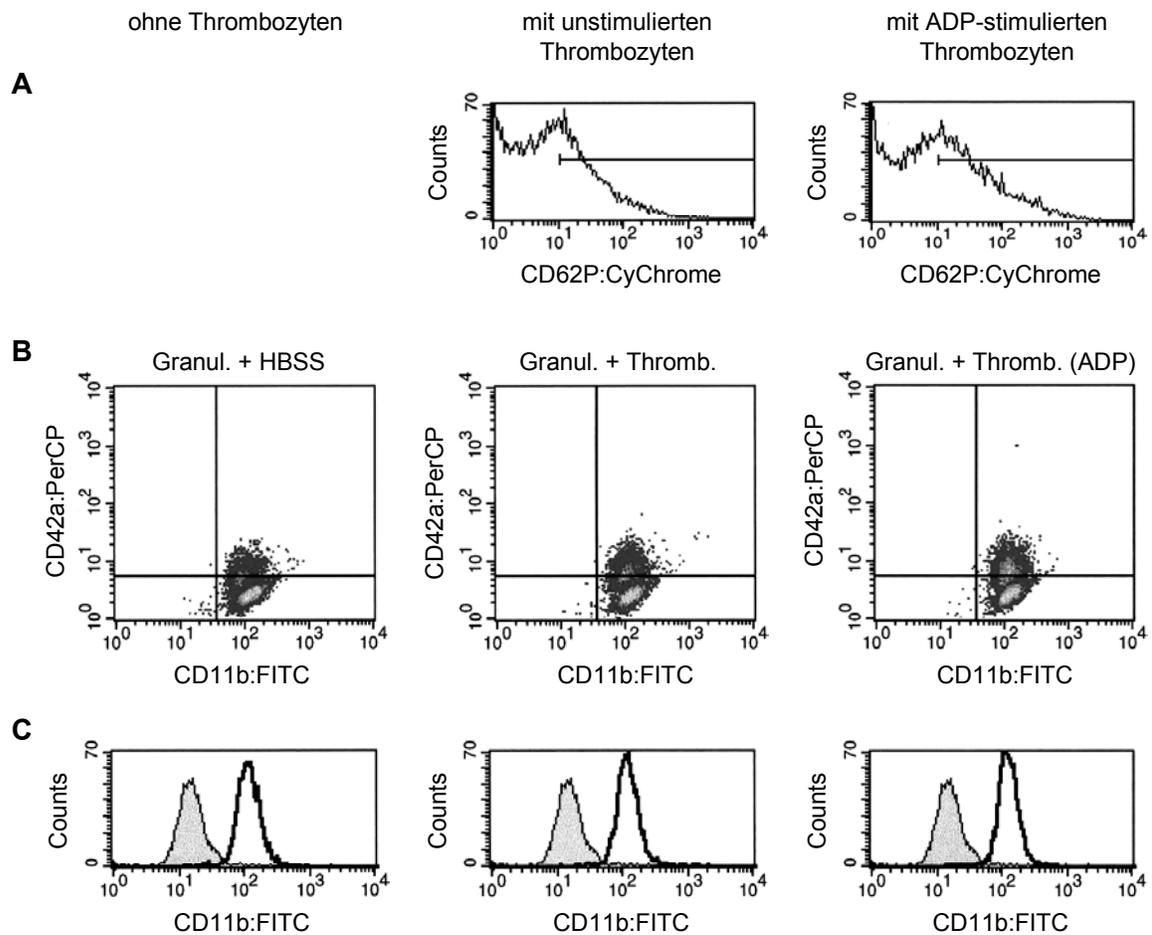


Abbildung 43. CD11B-EXPRESSION AUF DER OBERFLÄCHE VON ISOLIERTEN GRANULOZYTEN

Isolierte Granulozyten wurden entweder ohne Thrombozyten (HBSS als Puffer), oder nach Inkubation mit unstimulierten bzw. ADP-stimulierten Thrombozyten analysiert.

A: Fluoreszenzintensitätshistogramme zur P-Selektin-Expression (CD62P) von unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten.

B: Durchflusszytometrische Untersuchung der Effekte auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung nach Inkubation von isolierten Granulozyten mit HBSS bzw. unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten. Die Trennlinien repräsentieren jeweils die 98%-Schwelle der Fluoreszenzintensität in unstimuliertem Vollblut.

C: Fluoreszenzintensitätshistogramme zur CD11b-Expression auf der Oberfläche von isolierten Granulozyten nach der Inkubation mit HBSS bzw. unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten (schwarze Linie). Die grauschraffierten Flächen repräsentieren die Fluoreszenzintensitätsverteilung in unstimuliertem Vollblut.

4.4.2 Untersuchungen mit verdünntem Vollblut und Endothelzellen

In der Folge wurden die Versuche mit verdünntem Vollblut (1:5 in Leukozytenmedium) durchgeführt. Da adhärenente Granulozyten nicht von adhärenenten Monozyten oder Lymphozyten unterschieden werden konnten, wurden nachfolgend allgemein Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen untersucht. Im Gegensatz zu isolierten Leukozyten-Fraktionen führte die hohe Erythrozyten-Konzentration im Vollblut dazu, dass trotz der Verdünnung des Blutes das Verhalten von einzelnen Zellen bei der Passage nicht beobachtet werden konnte. Die Bestimmung der Anzahl rollender Leukozyten war deshalb nicht möglich. Nachdem alle nicht-adhärenenten Zellen das System passiert hatten, konnte die Anzahl der verbleibenden, adhärenenten Zellen bestimmt werden.

Nach der Passage von unstimuliertem Vollblut über unstimulierte Endothelzellen konnte nur vereinzelt eine Adhäsion von Leukozyten beobachtet werden (Abbildung 45, oberste Reihe). Im Vergleich dazu nahm die Leukozyten-Adhäsion nach Stimulation der Endothelzellen mit TNF- α deutlich zu (Abbildung 45, mittlere Reihe).

Zur Aktivierung der Thrombozyten wurde das Vollblut mit 10 μ M ADP inkubiert. In der Folge konnte eine um den Faktor 1,5 vermehrte Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung (Abbildung 44 A1) sowie eine um den Faktor 2,7 erhöhte CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche gemessen werden (Abbildung 44 A2). Im Vergleich zum unstimulierten Vollblut hatte die Stimulation mit ADP jedoch keinen Einfluss auf die Leukozyten-Adhäsion an TNF- α -stimulierten Endothelzellen ($P > 0,646$) (Abbildung 45, untere Reihe, links und Abbildung 46).

Da die Stimulation mit ADP möglicherweise nicht ausreichend war, um einen Effekt auf die Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen zu zeigen, wurde zur Aktivierung der Thrombozyten das Vollblut mit TRA (Thrombin-Rezeptor-Agonist) inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass nach der Inkubation mit TRA nahezu alle Granulozyten mit Thrombozyten assoziiert waren (Abbildung 44, B1). Die mediane Fluoreszenzintensität für CD42a nahm im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle um den Faktor 24,4 zu und war damit auch im Vergleich zum ADP-stimulierten Vollblut deutlich erhöht. Darüber hinaus führte die Inkubation mit TRA zu einer deutlichen Erhöhung der CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche. Die mediane Fluoreszenzintensität nahm um den Faktor 4,3 zu (Abbildung 44, B2). Ein Einfluss auf die

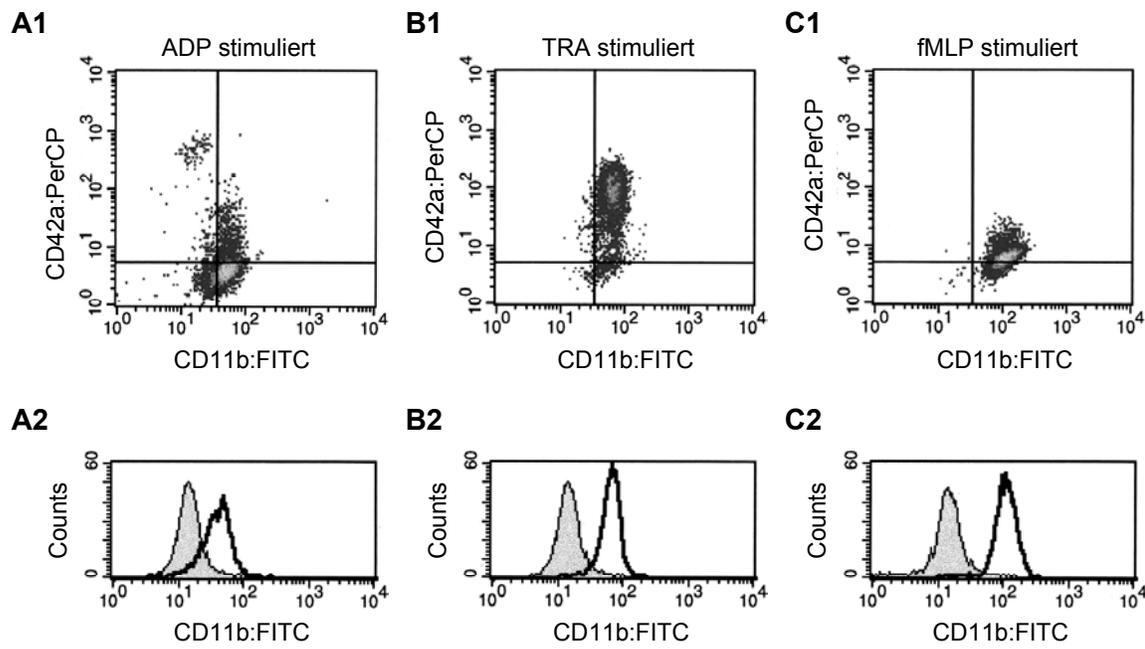


Abbildung 44. THROMBOZYTEN-GRANULOZYTEN-KOMPLEXE IN VOLLBLUT NACH STIMULATION MIT ADP, TRA ODER fMLP

Die Punktdiagramme stellen die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen nach Stimulation des Vollblutes mit ADP (**A1**), TRA (**B1**) bzw. fMLP (**C1**) dar. Die schwarzen Linien repräsentieren zum Vergleich jeweils 98% der Fluoreszenzintensität in der unstimulierten Blutprobe.

Die schwarzen Linien in den Histogrammen zeigen jeweils die Fluoreszenzverteilung für CD11b:FITC nach Stimulation des Vollblutes mit ADP (**A2**), TRA (**B2**) bzw. fMLP (**C2**). Zum Vergleich ist die jeweilige Fluoreszenzverteilung in der unstimulierten Blutprobe angegeben (graue Fläche).

Leukozyten-Adhäsion an TNF- α -stimulierte Endothelzellen konnte jedoch nicht beobachtet werden ($P > 0,257$) (Abbildung 45, untere Reihe, Mitte und Abbildung 46).

Um auszuschließen, dass die Assoziation mit Thrombozyten zu einer sterischen Behinderung der Interaktion zwischen dem Integrin-Heterodimer CD11b/CD18 auf der Granulozyten-Oberfläche und den Molekülen der Immunglobulin Superfamilie auf der Endothelzell-Oberfläche führt, wurde das Vollblut mit fMLP inkubiert. Das Tripeptid bakteriellen Ursprungs induzierte die CD11b-Expression der Granulozyten um den Faktor 7,2, ohne dass es dabei zu einer Zunahme der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung kam (Abbildung 44, C1 und C2). Die Inkubation mit fMLP hatte im Vergleich zu unstimuliertem Vollblut jedoch ebenfalls keinen Einfluss auf die Leukozyten-Adhäsion an TNF- α -stimulierte Endothelzellen ($P > 0,769$) (Abbildung 45, untere Reihe, rechts und Abbildung 46).

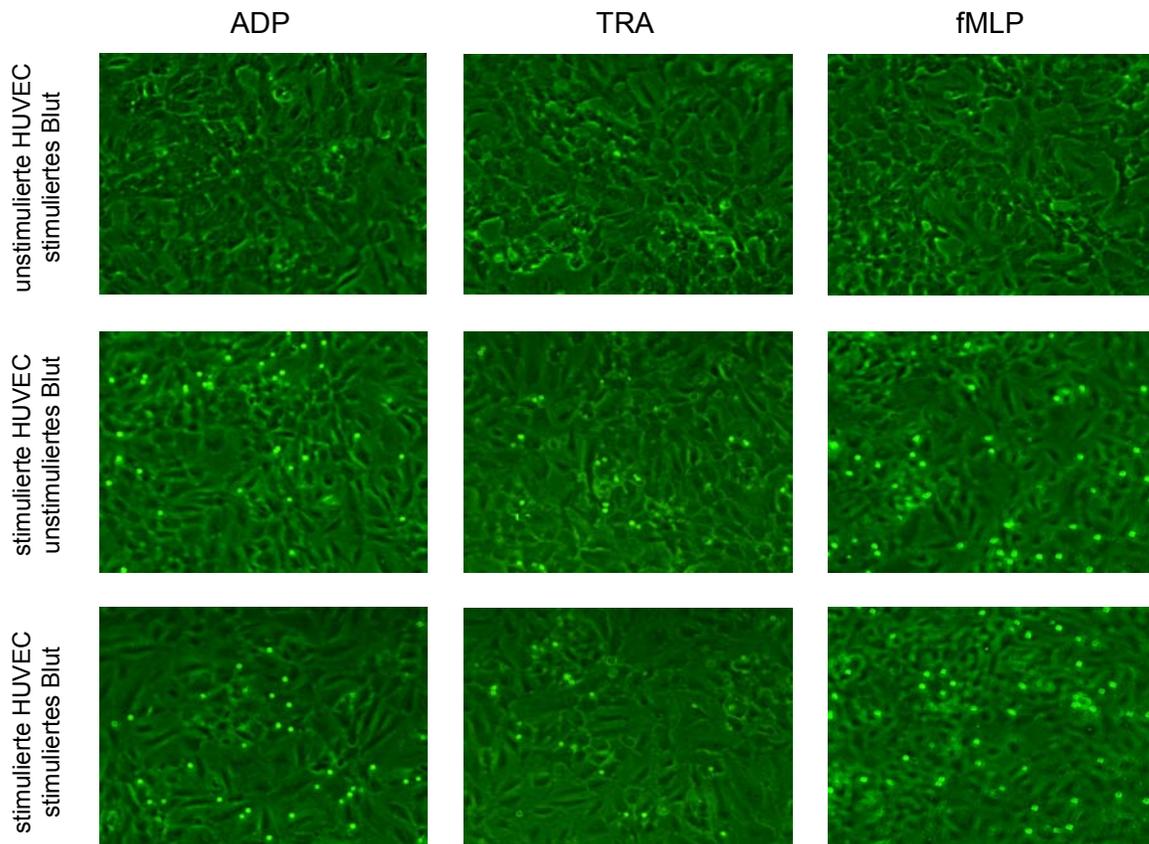


Abbildung 45. LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTIONEN MIT VOLLBLUT

Mikroskopische Darstellung der nach den Durchflussversuchen adhärenen Leukozyten aus ADP-, TRA- bzw. fMLP-stimuliertem Vollblut. Durch den verwendeten optischen Grünfilter konnten die hellgrün erscheinenden Leukozyten deutlich von den dunkelgrünen Endothelzellen unterschieden werden. Die Versuche wurden entweder mit unstimulierten Endothelzellen durchgeführt (obere Reihe) oder mit Endothelzellen, die zuvor mit TNF- α stimuliert wurden (mittlere und untere Reihe).

Es lässt sich zusammenfassen, dass eine Induktion der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung und die nachfolgende Erhöhung der CD11b-Expression nicht zu einer Veränderung der Leukozyten-Adhäsion an Endothelzellen führte. Eine Untersuchung, ob die durch HMO reduzierte CD11b-Expression die Granulozyten-Adhäsion an Endothelzellen beeinflusst, erübrigte sich folglich.

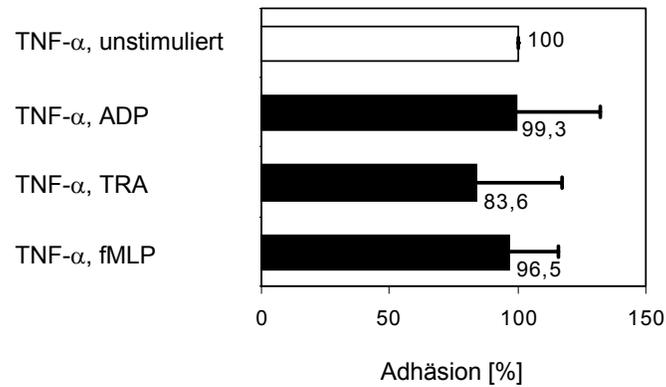


Abbildung 46. ADHÄSION VON LEUKOZYTEN AUS VOLLBLUT AN AKTIVIERTE ENDOTHELZELLEN

Effekte verschiedener Stimuli auf die Adhäsion von Leukozyten an TNF- α -aktivierte Endothelzellen. Die Anzahl adhärenter Leukozyten nach Stimulation des Vollblutes mit ADP, TRA bzw. fMLP wurde ins Verhältnis zur Anzahl adhärenter Leukozyten aus unstimuliertem Vollblut gesetzt (100%, weißer Balken). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

5 Diskussion

5.1 Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

5.1.1 Bewertung des *In-vitro*-Systems

Die Extravasation von Leukozyten spielt eine zentrale Rolle im Inflammationsgeschehen. Die initialen Interaktionen zwischen Leukozyten und den aktivierten Endothelzellen führt zu einer Verlangsamung der Leukozyten aus dem Blutstrom und wird über Adhäsionsmoleküle der Selektin-Familie vermittelt (Abschnitt 1.3.1). Die aus humanen Nabelschnurvenen isolierten Zellen konnten sowohl morphologisch als auch immunochemisch eindeutig als Endothelzellen identifiziert werden. Die Inkubation der Zellen mit TNF- α führte nach 4 Stunden zu einer maximalen E-Selektin-Expression, was sich mit Beobachtungen von Bevilacqua *et al.* deckt (BEVILACQUA *et al.* 1989). Die Expression von P-Selektin konnte durch die Inkubation mit TNF- α nicht induziert werden. Aus Studien von Yao *et al.* geht hervor, dass weder die Inkubation mit TNF- α noch die Stimulation mit Interleukin-1 β oder LPS zu einer vermehrten Expression von P-Selektinen auf HUVEC führt (YAO *et al.* 1996). Da sich die Funktionen der Selektine beim *Rolling* teilweise überlappen (Abschnitt 1.3.1.1.1), konnte auch bei einer Basisexpression von P-Selektin eine rollende Verlangsamung der Leukozyten beobachtet werden. Die HUVEC exprimierten darüber hinaus die Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie, ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1, so dass die Voraussetzungen für eine anschließende feste Adhäsion gegeben waren.

Die Leukozyten wurden jeweils durchflusszytometrisch anhand ihrer Größe und Granularität identifiziert. Die relativen Konzentrationen der Monozyten, Lymphozyten bzw. Granulozyten lagen jeweils bei über 90%, so dass klare Aussagen über das Verhalten der einzelnen Leukozyten-Fractionen getroffen werden konnten. Der Anteil der B-Zellen und T-Zellen bzw. der Anteil CD4- und CD8-positiver Zellen in der Lymphozyten-Fraktion entspricht den Verhältnissen im Blut gesunder Menschen (GAEHTGENS 1994).

Am Beispiel der Granulozyten konnte gezeigt werden, dass sowohl sLe^x als Bindungsdeterminante der Selektin-Liganden als auch CD11b als Ligand der Moleküle der Immunglobulin Superfamilie exprimiert werden. Damit wurde sichergestellt, dass

sowohl auf der Oberfläche der Endothelzellen als auch auf der Oberfläche der Leukozyten die entsprechenden Adhäsionsmoleküle für das *Rolling* und die feste Adhäsion vorhanden waren.

Die Leukozyten wurden mit einer Flussrate von 6,7 ml/h über die Endothelzellen geleitet. Aus dieser Geschwindigkeit berechnete sich ein *shear-stress* von 1 dyne/cm², was den physiologischen Bedingungen in Kapillaren entspricht (MAYER *et al.* 2002).

Die Natrium-Konzentration der Oligosaccharide lag bei rund 0,3 mmol/l. Die Natrium-Konzentration im Blut gesunder Menschen beträgt rund 140 mmol/l und unterliegt Schwankungen von 2-3 mmol/l (GAEHTGENS 1994). Es ist deshalb nicht zu erwarten, dass die über die HMO-Fraktion eingebrachte Natrium-Menge durch osmotische Effekte zu einer Beeinträchtigung des Systems führte.

Anhand von LPS-Standards konnte gezeigt werden, dass die Endotoxin-Konzentration der verwendeten Oligosaccharid-Standards bzw. HMO-Fractionen keinen Einfluss auf das *Rolling* oder die Adhäsion der Leukozyten hat. Die beobachteten Effekte können somit auf die Oligosaccharide zurückgeführt werden.

Der Einfluss der Oligosaccharide auf das *Rolling* war in der Regel geringer als der Einfluss auf die Leukozyten-Adhäsion. Vor allem bei geringen Wirkungen auf die feste Adhäsion konnte unter gleichen Bedingungen kein Einfluss auf das *Rolling* beobachtet werden. 3'-Sialyllactose reduzierte die feste Adhäsion der Monozyten um 7,7±6,4%, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Monozyten-*Rolling*. Die Inkubation der Endothelzellen mit sLe^x führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Monozyten-Adhäsion um 36,7±8,0%. Das *Rolling* wurde durch sLe^x jedoch nicht beeinflusst. Die sHMO-Fraktion reduzierte sowohl das *Rolling* als auch die feste Adhäsion. Bei der sukzessiven Abnahme der sHMO-Konzentration konnte jedoch beobachtet werden, dass das *Rolling* bereits bei einer Konzentration von 50 µg/ml nicht mehr signifikant beeinflusst wurde, während die feste Adhäsion noch bei einer Konzentration von 25 µg/ml um 23,7±9,2% reduziert wurde.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse auf das *Rolling* und die Adhäsion lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Einflüsse auf das *Rolling* im verwendeten *In-vitro*-System unterschätzt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass Leukozyten bei der Verlangsamung aus dem Blutstrom eine bestimmte individuelle

Anzahl an Selektin-vermittelten Kontakten benötigen bis sie fest an das Endothel adhären können. Oligosaccharide, die als Selektin-Liganden-Analoga wirken, blockieren einige dieser Selektine, so dass sich die Wegstrecke zwischen dem initialen Kontakt und der festen Adhäsion verlängert. Für einige Leukozyten verlängert sich diese Wegstrecke möglicherweise derart, dass die Selektin-vermittelten Kontakte nicht mehr ausreichen, um die Zellen aus dem Blutstrom genügend zu verlangsamen. Diese Leukozyten können demnach nicht fest an das Endothel adhären, werden aber trotzdem noch als rollend gewertet. Andere Leukozyten benötigen eventuell nur wenige Selektin-Kontakte vor der festen Adhäsion. Ohne die Blockierung der Selektin-Bindungsdomänen durch Oligosaccharide wäre die rollend zurückgelegte Wegstrecke dieser Leukozyten möglicherweise so kurz, dass sie in dem System nicht als rollend, sondern lediglich als adhären gewertet würden. Durch die Inkubation der Endothelzellen mit Oligosacchariden verlängerte sich die Wegstrecke dieser Leukozyten entsprechend, so dass sie nun als rollende Zellen gewertet würden. Eine schematische Darstellung zur Theorie der unterschätzten Wirkung auf das *Rolling* zeigt Abbildung 47.

Für geringe Wirkungen scheint die Methode der visuell ermittelten Anzahl rollender Leukozyten nicht ausreichend sensitiv zu sein. Größere Effekte werden zwar erkannt, aufgrund der dargelegten Theorie womöglich aber unterschätzt. Aus diesen Gründen ist die aus dem *Rolling* resultierende feste Adhäsion als Indikator für den Einfluss von Inhibitoren auf die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen besser geeignet.

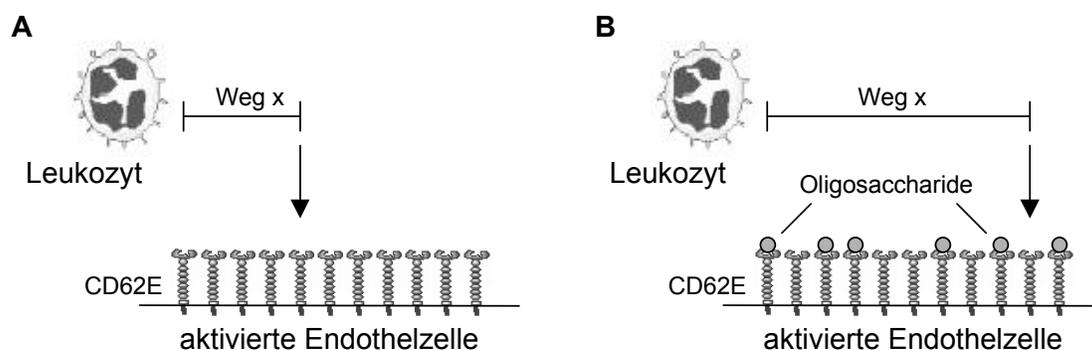


Abbildung 47. ERKLÄRUNGSANSATZ FÜR EINEN UNTERSCHÄTZTEN EFFEKT AUF DAS *ROLLING*

Bevor es zur festen Adhäsion kommt, benötigt ein Leukozyt eine bestimmte Anzahl Kontakte mit den Selektinen auf der Endothelzell-Oberfläche. Ohne eine Blockierung der Selektine (**A**) ist der dabei zurückgelegte Weg *x* möglicherweise so kurz, dass einige Leukozyten mit dem Mikroskopie-System nicht als rollend gewertet werden. Bei einer teilweisen Blockierung der Selektin-Bindungsdomänen mit Oligosacchariden (**B**) wird der Weg *x* dieser Leukozyten verlängert, so dass ein vermehrtes Leukozyten-*Rolling* beobachtet wird. Die inhibitorische Wirkung auf das *Rolling* wird dadurch möglicherweise unterschätzt.

5.1.2 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Das Tetrasaccharid sLe^x wurde als universelle Bindungsdeterminante der Selektin-Liganden identifiziert (Abschnitt 1.2.3). Die Inkubation der Endothelzellen mit sLe^x führte zu einer Reduktion der Monozyten-, Lymphozyten- bzw. Granulozyten-Adhäsion um rund 36%. In einer Studie von Welply et al. führte die Inkubation von HUVEC mit 300 µM sLe^x zu einer 50%-igen Reduktion der Granulozyten-Adhäsion (WELPLY *et al.* 1994). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 125 µg/ml entspricht einer molaren Konzentration von 152 µM ($M(\text{sLe}^x) = 821 \text{ g/mol}$), so dass die Ergebnisse durchaus vergleichbar sind.

Das als Negativkontrolle dienende TriGal ist weder sialyliert noch fucosyliert, so dass essentielle Strukturmerkmale der Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden fehlen. Folglich zeigte die Inkubation der Endothelzellen mit TriGal keinen Effekt auf das Monozyten-*Rolling* oder die Monozyten-Adhäsion. Daraus kann geschlossen werden, dass die inhibierende Wirkung der Oligosaccharide strukturspezifisch ist.

5.1.2.1 Essentialität der Sialinsäure

In einer Vielzahl von Studien konnte belegt werden, dass Sialinsäure ein essentielles Strukturelement der physiologischen Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden ist (Abschnitt 1.2.3). Durch die Trennung der HMO-Gesamtfraktion in sialylierte und nicht-sialylierte Oligosaccharide, konnte die Essentialität der Sialinsäure bestätigt werden. Die Inkubation der Endothelzellen mit der sHMO-Fraktion führte zu einer Reduktion des Monozyten- und Lymphozyten-Rollings um $24,0 \pm 17,6\%$ bzw. $14,2 \pm 14,0\%$. Die Adhäsion von Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten wurde um $52,8 \pm 9,7\%$, $43,2 \pm 11,6\%$ bzw. $46,1 \pm 12,5\%$ reduziert. Die nHMO-Fraktion hatte jedoch weder einen Effekt auf das *Rolling* noch auf die feste Adhäsion. Ähnliche Unterschiede in den Effekten der beiden HMO-Fraktionen konnten auch für die P-Selektin-vermittelten Interaktionen zwischen Thrombozyten und Granulozyten nachgewiesen werden.

Offenbar ist nicht nur das Vorhandensein, sondern auch die Art der glykosidischen Bindung der Sialinsäure von Bedeutung. Die Inkubation der Endothelzellen mit 3'-Sialyllactose führte zu einer Reduktion der Monozyten-Adhäsion um $7,7 \pm 6,4\%$. 6'-Sialyllactose hatte hingegen keinen Effekt auf die Anzahl adhärenter Monozyten. Im Gegensatz zur α 2-6-glykosidisch gebundenen Sialinsäure scheint die α 2-3-glykosidische Bindung durch eine veränderte sterische Anordnung der Sialinsäure im Molekül eine

Interaktion mit der Lektin-Bindungsdomäne der Selektine zu ermöglichen. So liegt die Sialinsäure in der physiologischen Bindungsdeterminante sLe^x ebenfalls α 2-3-glykosidisch gebunden vor.

5.1.2.2 *N-Acetylierung der Glucose*

Der einzige strukturelle Unterschied zwischen sLe^x und 3'-Sialyl-3-fucosyllactose ist die fehlende N-Acetylierung der Glucose am reduzierenden Ende (Abbildung 48). Die inhibitorischen Wirkungen von sLe^x und 3'-Sialyl-3-fucosyllactose auf die Monozyten-Adhäsion waren mit $36,7 \pm 8,0\%$ und $35,7 \pm 9,8\%$ nicht signifikant verschieden. Daraus kann gefolgert werden, dass die N-Acetylierung der Glucose kein essentielles Strukturelement der Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden darstellt.

5.1.2.3 *Essentialität der Fucose*

Während die Inkubation der Endothelzellen mit sLe^x bzw. 3'-Sialyl-3-fucosyllactose zu einer Reduktion der Monozyten-Adhäsion um $36,7 \pm 8,0\%$ bzw. und $35,7 \pm 9,8\%$ führte, zeigte 3'-Sialyllactose mit $7,7 \pm 6,4\%$ einen signifikant geringeren Reduktionseffekt. Während sLe^x am reduzierenden Ende einen N-Acetyl-Glucosamin-Rest trägt, steht dort bei 3'-Sialyllactose ein Glucose-Rest. Die N-Acetylierung der Glucose stellt jedoch kein essentielles Strukturelement der Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden dar (5.1.2.2) und kann deshalb nicht für den geringeren Effekt der 3'-Sialyllactose verantwortlich gemacht werden. Darüber hinaus fehlt bei 3'-Sialyllactose im Gegensatz zu sLe^x der Fucose-Rest (Abbildung 48). 3'-Sialyllactosamin, welches im Vergleich zu sLe^x zwar einen N-Acetyl-Glucosamin-Rest am reduzierenden Ende trägt, aber, wie 3'-Sialyllactose, nicht fucosyliert ist, zeigte in Untersuchungen von Welply *et al.* im Gegensatz zu sLe^x keinen Einfluss auf das Monozyten-Rolling (WELPLY *et al.* 1994). Die Fucosylierung, als einziger struktureller Unterschied zwischen sLe^x und 3'-Sialyllactosamin, stellt damit ein weiteres essentielles Kriterium für die Bindungsdeterminanten der Selektin-Liganden dar.

Dass Fucose ein essentielles Strukturelement der Selektin-Liganden ist, konnte auch anhand der molekularen Ätiologie einer seltenen Erbkrankheit nachgewiesen werden. Die heute als CDG IIc (*Congenital Disorder of Glycosylation* Typ IIc) bezeichnete Erkrankung wurde erstmals 1992 von Etzioni *et al.* als LAD II (*Leukocyte Adhesion Deficiency* Typ II) beschrieben (ETZIONI *et al.* 1992). In den fünf bisher veröffentlichten Kasuistiken (ETZIONI

et al. 1992, MARQUARDT *et al.* 1999a, ETZIONI UND TONETTI 2000) litten die Patienten seit frühester Kindheit an häufig auftretenden bakteriellen Infektionen wie Pneumonien, Peridontitis und Otitis media (Etzioni *et al.* 1998). Darüber hinaus konnte eine extreme Neutrophilie beobachtet werden. In Infektionsphasen wurden Neutrophilen-Konzentrationen von über 150.000 pro μl gemessen. Selbst in infektionsfreien Zeiten lagen die Konzentrationen bei den CDG IIc-Patienten zwischen 20.000 und 35.000 pro μl (ETZIONI *et al.* 1998) statt der bei Säuglingen üblichen Konzentrationen von unter 10.000 pro μl .

Es konnte gezeigt werden, dass die Fucosylierung von Glykokonjugaten bei den beschriebenen Patienten stark reduziert ist. Unter anderem ist davon auch die Fucosylierung der Selektin-Liganden, wie beispielsweise sLe^x , betroffen. Dadurch wird bei einer Infektion das Rollen der Leukozyten entlang des Endothels und die anschließende Leukozyten-Transmigration stark beeinträchtigt. Aufgrund des anhaltenden Stimulus steigen die Leukozyten-Konzentrationen im Blut stark an. Eine effektive Bekämpfung der Infektion ist jedoch eingeschränkt (PHILLIPS *et al.* 1995).

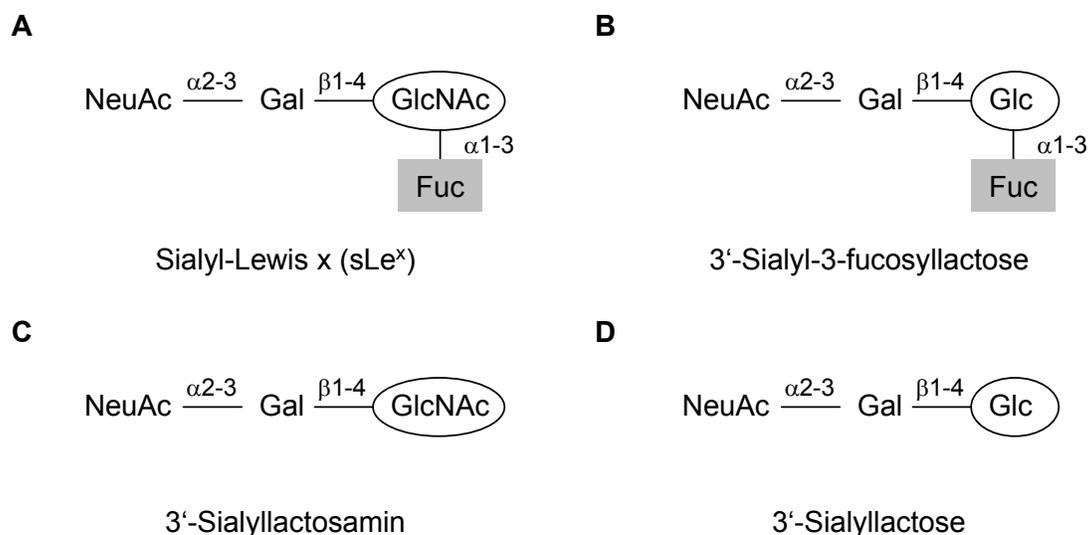


Abbildung 48. VERGLEICH DER STRUKTUREN VON SIALYL-LEWIS X, 3'-SIALYL-3-FUCOSYLLACTOSE, 3'-SIALYLLACTOSAMIN UND 3'-SIALYLLACTOSE

Der einzige strukturelle Unterschied zwischen den fucosylierten Oligosacchariden Sialyl-Lewis x (**A**) und 3'-Sialyl-3-fucosyllactose (**B**) besteht in der N-Acetylierung der Glucose am reduzierenden Ende. Während Sialyl-Lewis x ein N-Acetyl-Glucosamin trägt, steht bei 3'-Sialyl-3-fucosyllactose am reduzierenden Ende ein Glucose-Rest (umrandet). 3'-Sialyllactosamin (**C**) und 3'-Sialyllactose (**D**) sind jeweils nicht fucosyliert und unterscheiden sich voneinander lediglich durch die N-Acetylierung der Glucose am reduzierenden Ende.

5.1.3 Multivalente Bindungshypothese

Obwohl aufgrund der massenspektrometrischen Analysen eine mittlere molare Masse der sHMO-Fraktion nicht genau berechnet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass diese aufgrund des Anteils höhermolekularer Verbindungen nicht geringer ist als die molare Masse des Tetrasaccharids sLe^x. Zwar haben zwei der Hauptkomponenten der sHMO-Fraktion, 3'-Sialyllactose und 6'-Sialyllactose, mit 634 g/Mol eine geringere molare Masse als sLe^x mit 821 g/Mol, die übrigen Oligosaccharide der sHMO-Fraktion liegen mit 900 bis über 2.500 g/Mol jedoch weit darüber. Bei gleicher Massenkonzentration (125 µg/ml) ist die Mengenkonzentration der sHMO-Fraktion folglich höchstens so hoch wie die von sLe^x (152 µM). Die sHMO-Fraktion führte zu einer Reduktion der Monozyten-, Lymphozyten- bzw. Granulozyten-Adhäsion um 52,8±9,7%, 43,2±11,6% bzw. 46,1±12,5%. Die inhibitorische Wirkung einer ähnlichen oder sogar geringeren Anzahl an Molekülen war damit größer als die Effekte von sLe^x, welches die Adhäsion der Monozyten, Lymphozyten bzw. Granulozyten lediglich um 36,7±8,0%, 36,2±9,5% bzw. 35,9±6,5% reduzierte. Ähnliche Unterschiede zwischen den Effekten von sLe^x und der sHMO-Frakturen konnten auch für die P-Selektin-vermittelten Interaktionen zwischen Thrombozyten und Granulozyten nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der multivalenten Bindungshypothese, dem sogenannten Glykosid-Cluster-Effekt (LEE UND LEE 1995). So konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass es sich zwischen monovalentem sLe^x und E-, P- bzw. L-Selektin um eine sehr schwache Bindung mit K_D-Werten im unteren Millimolar-Bereich handelt, während das Selektin-vermittelte Rolling eine wesentlich stärkere Affinität mit K_D-Werten im Nanomolar-Bereich voraussetzen würde (USHIYAMA *et al.* 1993, PATEL *et al.* 1994, JACOB *et al.* 1995). Aufgrund dieser Diskrepanz zwischen den gemessenen und den erforderlichen Bindungsstärken wurde die These aufgestellt, dass auch Selektine, wie die meisten anderen Lektine (SHARON 1993, LEE UND LEE 2000, SACCHETTINI *et al.* 2001), hoch affine Bindungen mit ihren physiologischen Liganden eingehen, die multivalente Oligosaccharid-Bindungs determinanten besitzen (MCEVER UND CUMMINGS 1997). Diese multivalente Bindungshypothese konnte in mehreren *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimenten bestätigt werden. Welply *et al.* untersuchten die Wirkungen eines multivalenten Liganden-Analogons anhand von BSA-konjugiertem sLe^x in einem ähnlichen wie dem in dieser Arbeit verwendeten Assay. Dabei wurden 16 Mol sLe^x mit einem Mol BSA konjugiert (sLe^x16BSA) und die inhibitorische Wirkung auf das Granulozyten-Rolling auf Interleukin-1β-stimulierten HUVEC in einer parallelen Durchflusskammer analysiert. Die Inkubation der stimulierten Endothelzellen mit 1 µM sLe^x16BSA reduzierte das Granulozyten-Rolling

um 50%. Zur Erzielung des gleichen Effektes wurden hingegen 300 μM freies, monovalentes sLe^x benötigt (WELPLY *et al.* 1994).

Eine stärkere inhibitorische Wirkung multivalenter Bindungsdeterminanten auf E-Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen konnte auch mit Hilfe von multivalenten Glykopeptiden beobachtet werden. Stahn *et al.* untersuchten den Effekt eines trivalenten Glykotetrapeptids (Lys-Gly-Gly-Lys[sLe^x]₃) auf die Adhäsion humaner Hepatomzellen (HepG2) an Interleukin-1 β -stimulierte HUVEC. Die drei sLe^x -Determinanten wurden an die freie α -Aminogruppe der Peptidkette, sowie an die beiden ϵ -Aminogruppen der Lysylreste gebunden (STAHN *et al.* 1998). Die humane Hepatomzelllinie HepG2 wurde verwendet, weil die Zellen auf ihrer Oberfläche große Mengen sLe^x exprimieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Adhäsion von HepG2 an aktivierte HUVEC hauptsächlich um einen E-Selektin-vermittelten Prozess handelt (TAKADA *et al.* 1993). Die Inkubation der stimulierten Endothelzellen mit 1 mM des trivalenten Glykopeptids reduzierte die Adhäsion der HepG2-Zellen um 50%. Ein ähnlicher Reduktionseffekt nach Inkubation mit freiem, monovalenten sLe^x konnte erst bei einer Konzentration von 2,3 mM beobachtet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch der Abstand der sLe^x -Determinanten zueinander einen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung der multivalenten Liganden-Analoga ausübt. So führte das zusätzliche Einfügen einer Heptyl-Kette ($-(\text{CH}_2)_7-$) zwischen das Tetrapeptid und die sLe^x -Determinanten zu einer Verringerung des Effekts (STAHN *et al.* 1998).

Einen Vorteil von Liganden-Analoga mit multivalenten Bindungsdeterminanten konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden. Oligosaccharide mit einer oder mehreren sLe^x -Determinanten wurden *N*-glykosidisch an ^{125}I -markiertes *t*-Butoxycarbonyltyrosinamid gebunden und Mäusen intravenös verabreicht. Die vorausgegangene intraperitoneale LPS-Gabe führte bei den Mäusen zu einer systemischen Induktion der E-Selektin-Expression. Anhand von radiographischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die *N*-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide mit di- und trivalenten Bindungsdeterminanten in den Geweben wesentlich effizienter angereichert wurden als Oligosaccharide mit nur einer sLe^x -Determinante. In weiteren Experimenten wurden den LPS-Mäusen auch Oligosaccharide mit sialylierten, nicht-fucosylierten Determinanten injiziert, die im Gewebe jedoch nicht angereichert wurden. Diese Ergebnisse zeigten erneut, dass Fucose ein essentielles Strukturelement der physiologischen Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden darstellt (THOMAS *et al.* 1999).

Dass die Anreicherung der radioaktiv markierten Oligosaccharide auf einer Bindung mit E-Selektinen beruhte, konnte mit zwei weiteren Experimenten belegt werden. Monoklonale Antikörper gegen E-Selektin, nicht aber gegen P-Selektin, blockierten die Bindung der markierten Oligosaccharide. Des weiteren erfolgte eine maximale Bindung der markierten Oligosaccharide nach 4 bis 5 Stunden, was mit dem Zeitpunkt der maximalen E-Selektin-Expression nach Induktion mit LPS übereinstimmte (THOMAS *et al.* 1999, FRIES *et al.* 1993).

Liganden-Analoga mit multivalenten Bindungsdeterminanten inhibieren E-Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stärker als freies, monovalentes sLe^x. Es kann deshalb vermutet werden, dass Oligosaccharide in der sHMO-Fraktion vorkommen, die ebenfalls über multivalente Bindungsdeterminanten verfügen. Aus diesem Grund führte die sHMO-Fraktion möglicherweise zu einer stärkeren inhibitorischen Wirkung auf die E-Selektin-vermittelten Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen als das freie, monovalente sLe^x.

5.1.4 Potentielle Liganden-Analoga

Anhand der massenspektrometrischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die sHMO-Fraktion aus über 20 verschiedenen Einzelkomponenten besteht. Zwei der Hauptkomponenten, 3'-Sialyllactose und 6'-Sialyllactose, hatten keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Monozyten-Adhäsion. Das strukturell dem sLe^x sehr ähnliche Tetrasaccharid 3'-Sialyl-3-fucosyllactose reduzierte die Anzahl adhärenter Monozyten dagegen um 35,7±9,8%. Bei einer gleichen Konzentration von 125 µg/ml führte das Nonasaccharid Disialyl-fucosyl-LNH mit 34,6±6,6% zu einem vergleichbaren Effekt. Da die molare Masse von Disialyl-fucosyl-LNH mit 1.802 g/Mol jedoch größer ist als die molare Masse von 3'-Sialyl-3-fucosyllactose mit 780 g/Mol, ist die für die gleiche inhibitorische Wirkung benötigte Mengenkonzentration bei Disialyl-fucosyl-LNH (70 µM) geringer als die von 3'-Sialyl-3-fucosyllactose (160 µM). Auch diese Ergebnisse lassen sich anhand der multivalenten Bindungshypothese erklären. So trägt Disialyl-fucosyl-LNH eine Le^x-Determinante und eine defucosylierte sLe^x-Determinante, die jeweils einen Teil der physiologischen Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden repräsentieren. Zur Erzielung der gleichen inhibitorischen Wirkung werden weniger Disialyl-fucosyl-LNH-Moleküle benötigt als 3'-Sialyl-3-fucosyllactose-Moleküle, welches nur eine Bindungsdeterminante trägt.

Die Einzeleffekte der untersuchten Oligosaccharide sind jedoch nicht ausreichend, um den Effekt der sHMO-Gesamtfraktion zu erklären, zumal Hauptkomponenten, wie 6'-Sialyllactose oder 3'-Sialyllactose, keinen oder nur einen geringen Effekt zeigten. Folglich stellt sich die Frage, welche anderen Oligosaccharide für die inhibitorische Wirkung der sHMO-Fraktion verantwortlich sind. Diese Oligosaccharide müssten sogar einen größeren Effekt auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen als die Gesamtfraktion haben, um die geringeren bzw. fehlenden Effekte der bisher untersuchten Komponenten kompensieren zu können.

In der massenspektrometrischen Charakterisierung der sHMO-Fraktion wurden für Sialyl-LNT, Sialyl-LNH, Disialyl-LNT und Disialyl-LNH relative Intensitäten von 100%, 28%, 19% bzw. 4% gemessen. Die jeweils fehlende Fucose lässt jedoch vermuten, dass diese Strukturen eher einen geringen Einfluss auf Selektin-vermittelte Prozesse haben.

Anders verhält es sich mit Sialyl-fucosyl-LNH, Sialyl-difucosyl-LNH und Sialyl-fucosyl-LNT. Mit einer gemessenen relativen Intensität von 51%, 13% und 10% kommen diese drei Oligosaccharide nicht nur in relativ hohen Konzentrationen in der sHMO-Fraktion vor, sondern tragen darüber hinaus auch die essentiellen Strukturmerkmale der physiologischen Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden. Unter den Minorkomponenten konnten zusätzlich zahlreiche Oligosaccharide identifiziert werden, die ein oder mehrere Sialinsäure- und Fucose-Monomere enthalten. Im Einklang mit der multivalenten Bindungshypothese erscheinen gerade Strukturen wie Disialyl-difucosyl-LNO und Disialyl-trifucosyl-LNO mit mehreren Fucose- und Sialinsäure-Resten als besonders vielversprechende Liganden-Analoga.

In der Humanmilch konnten mit entsprechend sensitiven Methoden weitere relativ komplexe, hochmolekulare Oligosaccharide identifiziert werden, die bis zu 15 Lactosamin-Einheiten enthalten und zahlreiche Sialyl- und Fucosyl-Reste tragen (STAHL *et al.* 1994, FINKE *et al.* 1999). Es kann vermutet werden, dass diese Strukturen mehrere physiologische Bindungsdeterminanten tragen und damit eine wesentlich potentere inhibitorische Wirkung auf Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen aufweisen als weniger komplexe Oligosaccharide.

Die meisten dieser möglichen Liganden-Analoga kommen jedoch ausschließlich in Humanmilch vor und sind nicht als kommerzielle Oligosaccharid-Standards erhältlich. Folglich müsste die sHMO-Fraktion in weitere Fraktionen unterteilt werden, um die

Oligosaccharide der Humanmilch weiter eingrenzen zu können. Zu diesem Zweck würde sich beispielsweise eine präparative HPAEC anbieten, um quantitativ ausreichende Mengen bestimmter Oligosaccharid-Fractionen zu isolieren.

5.2 Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden auf Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen

Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe repräsentieren eine Untergruppe von Granulozyten, die vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren und darüber hinaus eine erhöhte Phagozytoseaktivität zeigen sowie vermehrt ROS produzieren (PETERS *et al.* 1999). Die konfokalmikroskopischen Darstellungen zeigten, dass die Thrombozyten nach der Aktivierung mit ADP P-Selektine exprimieren. P-Selektine vermitteln den initialen Schritt der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung, indem sie an den Liganden PSGL-1 auf der Granulozyten-Oberfläche binden. Das Tetrasaccharid sLe^x wurde als Oligosaccharid-Bindungsdeterminante des Selektin-Liganden PSGL-1 indentifiziert (Abschnitt 1.2.3.2). Die konfokalmikroskopischen Darstellungen zeigten ebenfalls, dass sLe^x (CD15s) auf der Oberfläche von polymorphkernigen Granulozyten exprimiert wird. Die sLe^x-Determinante liegt dabei nicht gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt vor, sondern scheint in einigen Membranregionen gehäuft exprimiert zu werden. Diese Clusterung kann als weiteres Anzeichen gewertet werden, dass die an sich schwach affine Selektin-Liganden-Bindung durch multivalente Bindungspartner verstärkt wird. Eine derartige Clusterung wurde auch für den Glykoprotein-Rezeptor für Galectin-1 auf der Oberfläche von humanen T-Lymphozyten gezeigt (PACE *et al.* 1999). Die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung sowie die CD11b-Expression auf der Oberfläche der Granulozyten konnte anhand der konfokalmikroskopischen Darstellung in dem *Ex-vivo*-System nachgewiesen werden.

5.2.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Die Inkubation von ADP-stimuliertem Vollblut mit löslichem sLe^x als Liganden-Analogen führte sowohl zu einer Reduzierung der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung als auch zu einer verminderten Expression des β 2-Integrins CD11b. Dieser Effekt war strukturabhängig, da das strukturfremde TriGal keinen Einfluss auf die Interaktionen von Thrombozyten und Granulozyten zeigte.

Die Inkubation von ADP-stimuliertem Blut mit Oligosacchariden der sHMO-Fraktion führte ebenfalls zu einer Reduktion der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung und zu einer verminderten CD11b-Expression. Wie bereits bei den Untersuchungen zum Einfluss von Oligosacchariden auf die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen war die inhibitorische Wirkung der sHMO-Fraktion größer als die von sLe^x. Auch diese

Ergebnisse lassen sich sehr gut anhand der multivalenten Bindungshypothese erklären (Abschnitt 5.1.3).

Die nHMO-Fraktion, deren Oligosaccharide keine Sialinsäure-Reste tragen, hatte mit einer Reduktion um $3,7 \pm 4,2\%$ ($P < 0,05$) einen Effekt auf die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen, während die CD11b-Expression nicht signifikant beeinflusst wurde. Die inhibitorische Wirkung läßt sich möglicherweise auf den Restgehalt saurer Oligosaccharide in der nHMO-Fraktion zurückführen (Abbildung 15 A). So führte auch die sHMO-Fraktion bei einer geringen Konzentration von $12,5 \mu\text{g/ml}$ noch zu einem Effekt auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung, während die CD11b-Expression nicht beeinträchtigt wurde. Eine Reduktion des Monozyten-Rollings und der Monozyten-Adhäsion konnte dagegen weder bei der nHMO-Fraktion noch bei der geringen Konzentration der sHMO-Fraktion beobachtet werden. Der Restgehalt saurer Oligosaccharide in der nHMO-Fraktion hatte demnach keine Wirkung auf die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen, reichte aber aus, um die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Granulozyten zu beeinflussen. Darüber hinaus konnten Larson *et al.* zeigen, dass die nicht-sialylierte Le^x -Determinante an der P-Selektin-vermittelten Interaktion zwischen Thrombozyten und Granulozyten bzw. Monozyten beteiligt ist (LARSON *et al.* 1990). Die Le^x -Determinante konnte mit monoklonalen Antikörpern in der nHMO-Fraktion nachgewiesen werden (RUDLOFF *et al.* 2002). Der geringe Effekt der nHMO-Fraktion auf die Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen könnte daher möglicherweise auf das Vorkommen von Le^x -Determinanten auf Strukturen dieser Fraktion zurückzuführen sein.

5.2.2 Zeit-Wirkungs-Beziehung

Bei sehr geringen Inkubationszeiten von 0 bzw. 5 min führte die sHMO-Fraktion lediglich zu einer Reduktion der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung um 3,6 bzw. 14,1%. Es kann angenommen werden, dass sich an der P-Selektin-Bindungsdomäne zunächst ein Gleichgewicht zwischen dem physiologischen Liganden auf der Granulozyten-Oberfläche und den löslichen Liganden-Analoga einstellen muss. Nach 15 min liegt die inhibitorische Wirkung auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung bei 22,3%. Die anschließende leichte Abnahme des Reduktionseffekts bei längeren Inkubationszeiten ist möglicherweise die Folge einer teilweisen Degradation der HMO. Darüber hinaus wird P-Selektin nach etwa 30-60 min durch Endozytose wieder von der Membran-Oberfläche entfernt (SUBRAMANIAM *et al.* 1993), so dass P-Selektin als

Bindungspartner fehlt und gebundene Oligosaccharide möglicherweise zusammen mit den P-Selektinen internalisiert werden.

5.2.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die sHMO-Fraktion zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung und die CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche. Nur der initiale Schritt der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung wird über P-Selektine und PSGL-1 vermittelt. Die anschließende feste Adhäsion zwischen Thrombozyten und Granulozyten erfolgt über CD11b/CD18 auf der Granulozyten-Oberfläche und ICAM-2, Fibrinogen und das Glykoprotein-IIb/IIIa auf der Thrombozyten-Oberfläche (ALTIERI *et al.* 1993, SPANGENBERG *et al.* 1993, DIACOVO *et al.* 1994, WEBER UND SPRINGER 1997). Es kann vermutet werden, dass sich nach der 5-minütigen Aktivierung der Thrombozyten mit ADP bereits ein Teil der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe in einer stabilen Adhäsionsphase befinden, die über die Blockierung der P-Selektin-Bindungsdomäne nicht mehr beeinflusst werden kann. Bei steigender sHMO-Konzentration nimmt dementsprechend der Einfluss auf die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung ab.

Hat ein initialer, P-Selektin-vermittelter Kontakt zwischen Thrombozyten und Granulozyten stattgefunden, kommt es über die Aktivierung von Signaltransduktionswegen zu einer Induktion der CD11b/CD18-Expression. Die vermehrte Expression dieser Moleküle führt wiederum zu einer verstärkten Induktion ihrer eigenen Expression (EVANGELISTA *et al.* 1999), d.h., selbst wenn das von P-Selektin ausgehende Signal unterbrochen wird, kann die Expressionsinduktion von CD11b/CD18 nicht mehr blockiert werden. Aus diesem Grund nimmt möglicherweise der Grenzeffekt auf die CD11b-Expression bei steigender sHMO-Konzentration ab.

5.2.4 Einfluss der HMO auf Signaltransduktionswege

5.2.4.1 Selektin-Liganden-vermittelte Signaltransduktion

Es gibt eine Reihe von Anzeichen, dass Selektin-Liganden an der Signalweiterleitung in die Zelle beteiligt sind. Wie bereits dargestellt, wird der initiale Schritt der Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung über P-Selektin und PSGL-1 vermittelt (Abschnitt 1.3.2). Als Folge der Bindung mit P-Selektin kommt es zu einer Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domänen des PSGL-1-Homodimers, die eine Assoziation von Tyrosinkinase der *src*-Familie ermöglicht (EVANGELISTA *et al.* 1999, PICCARDONI *et al.* 2001), aber auch zu einer Aktivierung der MAP-Kinase führt (HIDARI *et al.* 1997). Am Ende dieser Signaltransduktionskaskade steht die Induktion der CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche, welches die Bindung mit den Thrombozyten festigt (ALTIERI *et al.* 1993, DIACOVO *et al.* 1994, WEBER UND SPRINGER 1997). Ob noch weitere Zellantworten aus diesen Signalwegen resultieren, ist derzeit nicht bekannt. Die durch PSGL-1 aktivierten Tyrosinkinase der *src*-Familie scheinen jedoch auch die Degranulation und den oxidativen Burst der Granulozyten zu beeinflussen (LOWELL UND BERTON *et al.* 1998, LOWELL UND BERTON *et al.* 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die P-Selektin-vermittelte Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung durch HMO inhibiert werden kann. In der Folge wurde auch die CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche vermindert. Es ist demnach zu vermuten, dass aufgrund der Blockierung der P-Selektin-Bindungsdomäne durch Liganden-Analoga, wie den HMO, keine Bindung zwischen P-Selektin und dem physiologischen Liganden PSGL-1 stattfinden kann. Als Folge des ausbleibenden Signals wird die Assoziation der Tyrosinkinase an die zytoplasmatischen PSGL-1-Domänen verhindert, so dass die Signaltransduktion nicht ausgelöst werden kann. Die Induktion der CD11b-Expression als Zellantwort unterbleibt.

Ein ähnlicher Effekt der HMO auf die Signaltransduktion von Selektin-Liganden kann auch als Folge der Blockierung der E-Selektin-Bindungsdomäne postuliert werden. Die Bindung von E-Selektin auf aktivierten Endothelzellen mit dem Liganden auf der Granulozyten-Oberfläche führt zu einer vermehrten CD11b-Expression der Granulozyten. Diese Expressionsinduktion konnte mit Inhibitoren der MAP-Kinase-Kaskade blockiert werden. Dies deutet darauf hin, dass der Selektin-Ligand auf der Granulozyten-Oberfläche die Integrin-Expression über einen MAP-Kinase-abhängigen Signalweg beeinflusst (SIMON *et al.* 2000). Auch in diesem Fall kann angenommen werden, dass die Blockierung der E-Selektin-Bindungsdomäne mit HMO zu einem Ausbleiben des Signals für den Selektin-

Liganden führt und folglich die Induktion der CD11b-Expression als Zellantwort unterbleibt.

5.2.4.2 Selektin-vermittelte Signaltransduktion

Die vorausgegangenen Ausführungen legen nahe, dass HMO möglicherweise Signaltransduktionswege beeinflussen können, die an die Selektin-Liganden gekoppelt sind. Auf der anderen Seite ist unklar, welchen Einfluss die HMO auf Signaltransduktionswege ausüben, die von der zytoplasmatischen Domäne der Selektine ausgehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen E-Selektin auf aktivierten Endothelzellen und den Liganden auf der Leukozyten-Oberfläche zu einer Phosphorylierung von Serin-Resten in der zytoplasmatischen Selektin-Domäne führt (YOSHIDA *et al.* 1998). In der Folge wird der Stimulus über die MAP-Kinase-Kaskade weitergeleitet (HU *et al.* 2000). Lorenzon *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass sowohl die Bindung an P-Selektin als auch an E-Selektin eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration nach sich zieht (LORENZON *et al.* 1998).

Die an L-Selektin gekoppelten Signaltransduktionswege führen bei Leukozyten sowohl zu einer Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade (BRENNER *et al.* 1997), zu einer Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration (CROCKETT-TORABI UND FANTONE 1997) als auch zu einer vermehrten Expression von TNF- α und Interleukin-8 (LAUDANNA *et al.* 1994). Darüber hinaus sind die L-Selektin-gekoppelten Signalwege auch an einer Induktion der CD11b/CD18-Expression beteiligt (SIMON *et al.* 1995, STEEBER *et al.* 1997) und beeinflussen die Granulozyten-Adhäsion und Degranulation (SMOLEN *et al.* 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von L-Selektin mit α -Actinin als Bestandteil des Zytoskeletts interagiert (PAVALKO *et al.* 1995).

Welche Auswirkungen die Blockierung der Selektin-Bindungsdomäne auf die Selektin-vermittelte Signaltransduktion ausübt, wurde mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern untersucht. Die Adhäsion von HL60-Zellen an Interleukin-1 β -stimulierte HUVEC führte zu einer erhöhten MAP-Kinase-Aktivität der Endothelzellen. Durch einen E-Selektin-blockierenden Antikörper wurde die Adhäsion der HL60-Zellen reduziert und in der Folge die Aktivierung der MAP-Kinase aufgehoben. Ein anderer Antikörper, der zu einer Kreuzvernetzung der E-Selektin-Moleküle auf der Endothelzelloberfläche führte, reduzierte ebenfalls die HL60-Adhäsion, aktivierte jedoch die MAP-Kinase-Kaskade. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass erst die Kreuzvernetzung der Selektine zum

Auslösen der Signaltransduktionswege führt. So kommen Selektin-Liganden als Dimere mit multivalenten Bindungsdeterminanten vor, die jeweils mehrere Selektine binden und damit vernetzen können (HU *et al.* 2000).

Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass monovalente Liganden-Analoga, wie beispielsweise freies sLe^x , zwar die Selektin-Bindungsdomäne blockieren, die Selektin-vermittelte Signaltransduktion jedoch nicht auslösen können. Liganden-Analoga mit multivalenten Bindungsdeterminanten, wie sie für hochmolekulare HMO postuliert werden (Abschnitt 5.1.3), könnten über eine Kreuzvernetzung der Selektine jedoch in der Lage sein, die Signaltransduktions-Kaskaden auszulösen. Welche Auswirkungen sich aus den daraus resultierenden Zellantworten auf zellulärer und physiologischer Ebene ergeben ist unklar.

5.2.4.3 Einfluss der HMO auf Phagozytosekapazität und oxidativen Burst

Peters *et al.* konnten zeigen, dass die mit Thrombozyten assoziierten Granulozyten nicht nur vermehrt das $\beta 2$ -Integrin CD11b/CD18 exprimieren, sondern auch eine höhere Phagozytosekapazität aufweisen und vermehrt ROS produzieren. Die durch ADP-induzierten Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe zeigten eine erhöhte Phagozytose von *Neisseria meningitidis*, die jedoch durch eine Blockierung der P-Selektine mit monoklonalen Antikörpern nicht reduziert werden konnte, obwohl dieser Antikörper zu einer verminderten Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen führte. Bei Granulozyten, die mit Thrombozyten assoziiert sind, wurde darüber hinaus ein erhöhter oxidativer Burst gemessen, d.h. diese Granulozyten bilden vermehrt ROS. In ADP-stimuliertem Blut konnte der oxidative Burst der Granulozyten durch die Blockierung der P-Selektine mit monoklonalen Antikörpern reduziert werden (PETERS *et al.* 1999). Es kann deshalb vermutet werden, dass die Blockierung der P-Selektine durch HMO zwar keinen Einfluss auf die Phagozytosekapazität der Granulozyten hat, dafür aber möglicherweise die Bildung von ROS reduziert.

5.3 Thrombozyten-Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Die Inkubation von Vollblut mit ADP führte zu einer Aktivierung der Thrombozyten, zu einer vermehrten Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung und in der Folge zu einer erhöhten Expression von CD11b. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur CD11b vermehrt exprimiert wird, sondern auch CD18, so dass auf der Granulozyten-Oberfläche mit dem CD11b/CD18-Heterodimer ein funktionsfähiger Ligand für die endothelständigen Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie vorliegt (PETERS *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es unter physiologischen Flussbedingungen durch die ADP-induzierte Expression von CD11b nicht zu einer vermehrten Adhäsion der Granulozyten kommt. Im Vergleich zum unstimulierten Blut blieb die Anzahl der adhärenenten Leukozyten nach Stimulation des Vollblutes mit ADP konstant. Für diese widersprüchlichen Ergebnisse gibt es drei mögliche Erklärungsansätze:

1. Aufgrund der Verwendung von Vollblut konnte in der Durchflusskammer zwischen Granulozyten und anderen Leukozyten nicht unterschieden werden. Es wäre demnach denkbar, dass als Folge der vermehrten CD11b/CD18-Expression zwar mehr Granulozyten an das aktivierte Endothel adhäreren, ein signifikanter Effekt aber in der Gesamtheit der Leukozyten nicht beobachtet werden kann. Gegen diesen Erklärungsansatz spricht zum einen, dass die Granulozyten in der Regel mit 50-65% den Hauptanteil an der gesamten Leukozyten-Fraktion ausmachen (GAEHTGENS 1994). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch bei anderen Leukozyten, wie beispielsweise den Monozyten, die Expression von CD11/CD18 nach der Assoziation mit aktivierten Thrombozyten induziert wird (AREFIEVA *et al.* 2001). In der Folge müsste in der Durchflusskammer ein allgemeiner Anstieg der Anzahl adhärenenten Leukozyten beobachtet werden können. Dies war jedoch nicht der Fall, so dass es andere Erklärungsansätze geben muss.
2. Wie gezeigt, wird das CD11b/CD18-Heterodimer bereits auf der Oberfläche von ruhenden Granulozyten in geringem Ausmaß exprimiert. Es wäre möglich, dass diese basale Expression bereits ausreicht, um die feste Adhäsion der Granulozyten an aktivierte Endothelzellen zu vermitteln. Eine Induktion der CD11b/CD18-Expression hätte dann keinen weiteren Effekt auf die Granulozyten-Adhäsion, so dass die Expression anderer Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise der Selektine, zum limitierenden Faktor wird.

Dass die Expression von CD11/CD18 einen limitierender Faktor sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Transmigration von Leukozyten darstellt, kann anhand einer hereditären Erkrankung abgeleitet werden, die als LAD I (*Leukocyte Adhesion Deficiency* Typ I) bezeichnet wird. Bei Patienten mit LAD I kommt es aufgrund einer Mutation im CD18-Gen zu einer verminderten Expression oder gar zu einem kompletten Verlust des CD11/CD18-Heterodimers (SLIGH *et al.* 1992, BACK *et al.* 1992, CORBI *et al.* 1992, BACK *et al.* 1993, MATHEW *et al.* 2000). Die Erkrankung ist charakterisiert durch häufig auftretende bakterielle Infektionen, einer verminderten Wundheilung sowie durch Abnormalitäten bei vielen Leukozyten-Funktionen, die eine Adhäsion der Zellen voraussetzen. Als Folge einer eingeschränkten Extravasation kommt es zu einer schweren Granulozytosis mit Granulozyten-Konzentrationen, die um das 5- bis 20-fache erhöht sind (ANDERSON *et al.* 1985, HAWKINS *et al.* 1992, GUNESER *et al.* 1996).

Aus der molekularen Ätiologie dieser Erkrankung kann abgeleitet werden, dass die Expression von CD11/CD18 einen essentiellen Schritt bei der Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Endothelzellen darstellt. Eine Induktion der CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche müsste folglich in einer vermehrten Adhäsion der Zellen resultieren.

3. Simon *et al.* konnten zeigen, dass die Bindung mit E-Selektinen zu einer vermehrten Expression von CD11b/CD18 auf der Granulozyten-Oberfläche führte. Diese E-Selektin-induzierte Expressionserhöhung konnte mit Inhibitoren der MAP-Kinase-Kaskade unterbunden werden. In den Experimenten, die ebenfalls in einer parallelen Durchflussskammer durchgeführt wurden, führte die Blockierung der E-Selektine mit monoklonalen Antikörpern über eine reduzierte CD11b/CD18-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche zu einer Verminderung der festen Adhäsion. Daraus wurde gefolgert, dass es durch den Kontakt der Granulozyten mit den E-Selektinen auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen zu einer vermehrten Expression von CD11b/CD18 kommt, die über die Bindung mit ICAM-1 die feste Adhäsion vermittelt. Die Induktion von CD11b/CD18 erfolgte dabei so schnell, dass es bereits in der Durchflussskammer zu einer festen Granulozyten-Adhäsion kam (SIMON *et al.* 2000).

Vor der Injektion des unstimulierten Vollblutes konnte eine deutlich geringere CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche gemessen werden als nach der Stimulierung mit ADP. Nach den Ergebnissen von Simon *et al.* muss aber vermutet werden, dass die CD11b-Expression nach dem Eintritt in die Durchflusskammer durch den Kontakt der Granulozyten mit den aktivierten Endothelzellen induziert wird, so dass es zur festen Adhäsion kommen kann. Im ADP-stimulierten Vollblut wird die CD11b/CD18-Expression durch die P-Selektin-vermittelte Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung bereits vor der Injektion in die Durchflusskammer induziert. Der Einfluss auf die feste Adhäsion ist jedoch ähnlich.

Die Induktion der CD11b/CD18-Expression durch P-Selektin bzw. E-Selektin ist schematisch in Abbildung 49 dargestellt. Dieser Ansatz scheint am besten zu erklären, warum nach der Stimulation des Vollblutes kein Effekt auf die Leukozyten-Adhäsion beobachtet werden konnte.

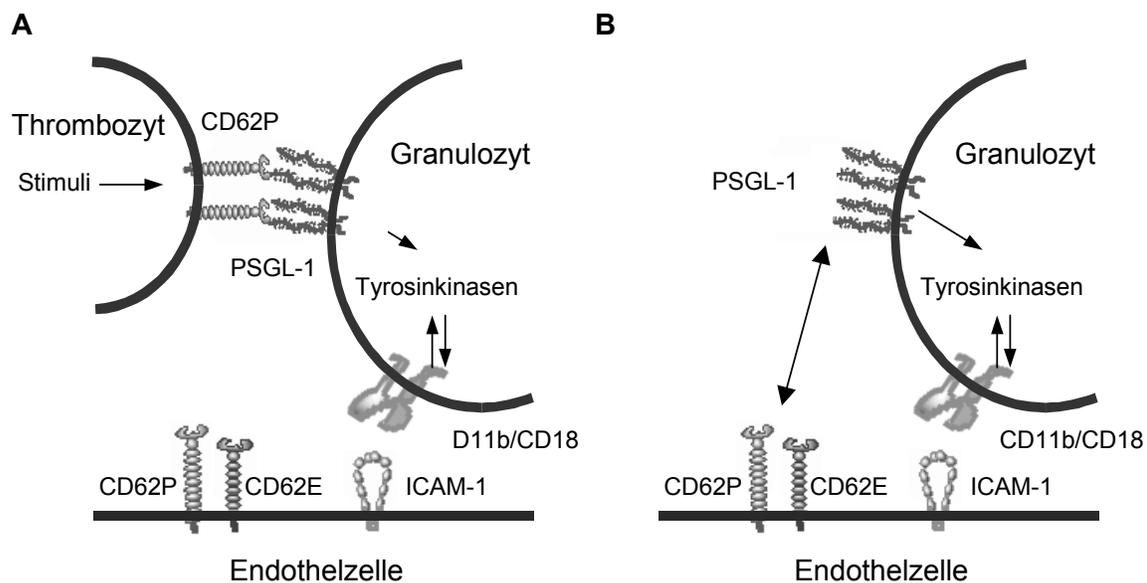


Abbildung 49. E- UND P-SELEKTIN-VERMITTELTE AKTIVIERUNG DER GRANULOZYTEN

Die Expression des CD11b/CD18-Heterodimers auf der Granulozyten-Oberfläche kann durch die Bindung von Selektinen an den Liganden PSGL-1 induziert werden. Die Signaltransduktion kann sowohl durch die Bindung von P-Selektin auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten (**A**) als auch durch E- und P-Selektin auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen (**B**) ausgelöst werden. In beiden Fällen führt die erhöhte Expression von CD11b/CD18 zu einer vermehrten Adhäsion der Granulozyten an das Endothel.

5.4 HMO-Konzentration in der systemischen Zirkulation

Für das Vorkommen von HMO in der systemischen Zirkulation des gestillten Säuglings gibt es bislang nur indirekte Anhaltspunkte. Die vorliegenden Daten erlauben jedoch eine grobe Abschätzung der HMO-Konzentration im Blut des Säuglings. Im Rechenmodell wurde davon ausgegangen, dass etwa 1% der täglich aufgenommenen HMO-Menge mit dem Urin ausgeschieden wird (RUDLOFF *et al.* 1996). Zusammen mit den von Gnoth *et al.* untersuchten Absorptionsmechanismen an intestinalen Epithelzellen (GNOTH *et al.* 2001) sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die HMO zu einem Teil im Darm des Säuglings intakt resorbiert werden und in die systemische Zirkulation gelangen. Ob die HMO auf dem Weg von der Absorption zur Ausscheidung zum Teil metabolisiert werden, ist nicht bekannt. Sollte es beispielsweise in den Nieren zu einem teilweisen Abbau der HMO kommen, läge die Absorptionsrate der HMO aus dem Darm höher als 1% und die Konzentration der HMO in der systemischen Zirkulation wäre entsprechend höher als in der hier angesetzten Berechnung zu Grunde gelegt wurde.

Auf der anderen Seite wurde in dem Rechenmodell davon ausgegangen, dass die täglich aufgenommene Menge von 10 g/l bzw. die daraus absorbierte Menge von 100 mg über 24 Stunden zur Verfügung steht. Da gezeigt werden konnte, dass einige Oligosaccharide bereits nach 4 bis 6 Stunden wieder mit dem Urin ausgeschieden werden (OBERMEIER *et al.* 1999), muss davon ausgegangen werden, dass die mittlere Konzentration im Blut geringer ist. Da Säuglinge über den Tag verteilt mehrere Male gestillt werden (MARQUIS *et al.* 2002), kann von einem relativ konstanten Flux an Oligosacchariden aus der Humanmilch in den Organismus des Säuglings ausgegangen werden. Bei der Berechnung der HMO-Konzentration im Blut muss die täglich aufgenommene Menge folglich auf mehrere Mahlzeiten aufgeteilt werden. Die mittlere Konzentration im Blut wäre demnach niedriger als in der hier angesetzten Berechnung zu Grunde gelegt wurde.

Bei der Berechnung der HMO-Konzentration im Blut von Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen müssen folgende veränderte Parameter berücksichtigt werden. Einerseits ist die Trinkmenge bei Frühgeborenen in der Regel geringer als bei Reifgeborenen, andererseits konnten in der Humanmilch von Müttern mit Frühgeborenen teilweise deutlich höhere Oligosaccharid-Konzentrationen gemessen werden (COPPA *et al.* 1999). Bei Frühgeborenen konnte darüber hinaus eine deutliche Erhöhung der intestinalen Permeabilität gemessen werden (AXELSSON *et al.* 1989, KUITUNEN *et al.* 1994). Daraus könnte man eine verstärkte Absorption intakter Oligosaccharide aus dem Darm ableiten.

Das Blutvolumen ist aufgrund des geringeren Körpergewichts bei Frühgeborenen geringer als bei Reifgeborenen, so dass sich die absorbierte Menge auf ein geringeres Volumen verteilt und die relative HMO-Konzentration im Blut steigt.

Die HMO-Konzentration im Blut des gestillten Säuglings lässt sich aufgrund der vielen Variablen nicht eindeutig berechnen. Aufgrund der Verteilung der täglich aufgenommenen Menge auf mehrere Mahlzeiten und die relativ schnelle Ausscheidung mit dem Urin stellt die für die *in vitro* bzw. *ex vivo* angesetzte Konzentration von 125 µg/ml jedoch eher eine Obergrenze dar. Durch die sukzessive Reduktion der sHMO-Konzentration in den experimentellen Assays konnte jedoch gezeigt werden, dass die Oligosaccharide der sHMO-Fraktion auch bei weit geringeren Konzentrationen noch einen Effekt auf Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktionen ausüben.

5.5 Mögliche (patho-)physiologische Bedeutung

Die Extravasation von Leukozyten stellt einen essentiellen Schritt in der Immunantwort des Körpers dar. Eine exzessive Leukozyten-Infiltration führt jedoch bei einer Reihe von akuten und chronischen Krankheiten zu einer Zerstörung von körpereigenen, gesunden Geweben (OSBORN 1990). Dies ist beispielsweise beim Hirnschlag (EMERICH *et al.* 2002) oder allgemein bei Reperfusionsschäden der Fall (CARDEN UND GRANGER 2000), konnte aber auch in der Pathogenese der Psoriasis (SCHON *et al.* 2002), der rheumatoiden Arthritis (SFIKAKIS UND TSOKOS 1995) oder bei entzündlichen Darmerkrankungen (LAROUX UND GRISHAM 2001) nachgewiesen werden. Aus diesem Grund gibt es eine Reihe von Ansätzen, das Selektin-vermittelte *Rolling* als initialen Schritt der Leukozyten-Extravasation pharmakologisch zu hemmen. Auf der einen Seite wurde versucht, die Interaktionen zwischen Selektinen und ihren Liganden mit Antikörpern zu blockieren (WEYRICH *et al.* 1993, MA *et al.* 1993). Auf der anderen Seite konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Leukozyten-Adhäsion und damit eine exzessive Extravasation mit Hilfe von löslichen Selektin-Liganden-Analoga reduziert werden kann (SIMANEK *et al.* 1998, HIRAMATSU *et al.* 1998, THOMA *et al.* 1999, VLEESCHAUWER *et al.* 2001, THEORET *et al.* 2001). Eine inhibitorische Wirkung auf das Leukozyten-*Rolling* und die Leukozyten-Adhäsion kann unter bestimmten Voraussetzungen also durchaus als ein positiver Effekt betrachtet werden (OSBORN 1990).

Bei der neonatalen nekrotisierenden Enterocolitis (NEC) handelt es sich ebenfalls um eine überschießende Immunreaktion, die vor allem bei Frühgeborenen auftritt. In der Pathogenese der NEC findet ein Rückkopplungskreislauf statt, der zu einer Potenzierung pro-inflammatorischer Signale führt, die eine exzessive Leukozyten-Infiltration induzieren. In der Folge kommt es zu einer weiteren Zerstörung des betroffenen Gewebes (HSUEH *et al.* 2003). Das Risiko an einer NEC zu erkranken ist bei gestillten Säuglingen weit geringer als bei Säuglingen, die ausschliesslich mit Säuglingsmilchnahrung ernährt wurden (LUCAS UND COLE 1990). Dieser protektive Effekt der Humanmilch läßt sich anhand der vorgestellten Ergebnisse möglicherweise auch auf den Gehalt spezieller Oligosaccharide zurückführen.

Um einen möglichen Einfluss von HMO auf die NEC ableiten zu können, soll zunächst ein Modell zur Pathogenese vorgestellt werden (HSUEH *et al.* 2003).

5.5.1 Epidemiologie und Klinik der NEC

Mit einer Inzidenz von rund 10% bei Säuglingen mit sehr geringem Geburtsgewicht (<1.500 g) (UAUY *et al.* 1991) und einer Sterblichkeitsrate von 26% (HACK *et al.* 1991) gilt die NEC nach wie vor als eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität im neonatalen Intensivbereich. Mindestens 80% der Patienten sind Frühgeborene oder Neugeborene mit einem geringen bzw. sehr geringen Geburtsgewicht (STOLL *et al.* 1980, DE CURTIS *et al.* 1987). Ein typisches klinisches Zeichen ist das aufgetriebene Abdomen sowie Erbrechen, Lethargie, Apnoe und Bradykardie. Das fortgeschrittene Stadium manifestiert sich mit Schock, intravaskulärer Koagulation, Azidose sowie Thrombozytopenie und es kommt teilweise zu intestinalen Perforationen in der betroffenen Region (BELL *et al.* 1978, WALSH *et al.* 1986). In schweren Fällen kann die NEC zu multisystemischem Organversagen führen (MORECROFT *et al.* 1994).

Von der NEC sind hauptsächlich das Ileum und das Colon betroffen. Ischämie gilt als Auslöser der Nekrosen, die die frühen histologischen Veränderungen bestimmen. In der Folge kommt es zu einer Infiltration von Leukozyten, vor allem Makrophagen und Granulozyten (MUSEMECHE *et al.* 1991). Bakterien spielen bei der Pathogenese der NEC offenbar eine wichtige Rolle, da die Krankheit nicht auftritt, bevor eine bakterielle Kolonisation des Darms stattgefunden hat (BALLANCE *et al.* 1990, NOWICKI 1990).

5.5.2 Postulierte Mechanismen in der Pathogenese der NEC

Die Ätiologie der NEC ist multifaktoriell und die Pathogenese nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Eine perinatale Hypoxie oder eine leichte postnatale Infektion werden als initiale Auslöser vermutet, die zu einer lokalen Läsion der Darmmukosa führen können. Bei einsetzender Kolonisation des Darms sind diese in ihrer Integrität gestörten Regionen besonders anfällig für eine vermehrte Adhäsion von Bakterien (HSUEH *et al.* 2003). Als Reaktion auf die Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien, wie *E.coli*, kommt es zu einer vermehrten Synthese und Sekretion von PAF (*Platelet-Activating Factor*) und TNF- α (ZANETTI *et al.* 1992). Durch diese beiden Mediatoren werden eine Reihe von Mechanismen ausgelöst:

- **Induktion der Synthese und Sekretion von PAF und TNF- α**

Sowohl PAF als auch TNF- α selbst induzieren die weitere Expression von TNF- α . Darüber hinaus führt TNF- α auch zu einer vermehrten PAF-Expression. Diese Auto-Induktion von PAF und TNF- α hat eine Potenzierung ihrer Wirkungen zur Folge (CAMUSSI *et al.* 1987, VALONE UND EPSTEIN 1988, VILCEK UND LEE 1991, HUANG *et al.* 1994).
- **Induktion der Synthese und Sekretion weiterer Zytokine**

Sowohl PAF als auch TNF- α induzieren unter anderem die Synthese von Leukotrien C₄ und Noradrenalin, deren starke vasokonstriktorische Wirkung zum Teil für die Ischämie und für die daraus resultierende Nekrose verantwortlich gemacht wird (HSUEH *et al.* 1986, HSUEH *et al.* 1988).
- **Erhöhung der Permeabilität der Darmmukosa**

PAF interagiert mit dem Zytoskelett intestinaler Epithelzellen und induziert die Phosphorylierung von E-Cadherin, einem epithelialen Membranbestandteil der *Zonula adherens*. Dadurch wird die Permeabilität der Darmmukosa erhöht und das Eindringen von LPS in die Epithelzellen erleichtert sowie die bakterielle Translokation ermöglicht (TAN *et al.* 2000). LPS führt wiederum zu einer vermehrten Expression von PAF und TNF- α . Die PAF-induzierte Erhöhung der Mukosapermeabilität konnte durch Superoxiddismutase und Katalase teilweise aufgehoben werden, so dass auf eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei der Zerstörung der Mukosaintegrität geschlossen wurde (KUBES *et al.* 1991).
- **Induktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies**

Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der NEC. An der Bildung endogener ROS im Darm sind vor allem Granulozyten beteiligt, die im Verlauf der NEC zusammen mit anderen Leukozyten das betroffene Gewebe infiltrieren (KUBES *et al.* 1990b, KUBES *et al.* 1991).
- **Induktion der Selektin-Expression und Leukozyten-Aktivierung**

TNF- α ist ein potenter Aktivator der E-Selektin-Expression auf Endothelzellen (BEVILACQUA *et al.* 1987, POBER *et al.* 1987) und ist damit maßgeblich am initialen Schritt der Leukozyten-Extravasation beteiligt (Abschnitt 1.3.1). PAF scheint darüber hinaus einen Einfluss auf P-Selektin-vermittelte Prozesse zu haben, da gezeigt werden konnte, dass P-Selektin-*knock-out* Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp nicht auf exogene PAF-Gaben reagieren (SUN *et al.* 1997).

Die Rolle der Leukozyten-Infiltration wird auch anhand von tierexperimentellen Ergebnissen verdeutlicht, bei denen die Depletion von polymorphkernigen Leukozyten zu einer Reduktion der PAF-induzierten Veränderungen am Darm führte (KUBES *et al.* 1990a, KUBES *et al.* 1990b). Die Blockierung der Leukozyten-Extravasation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD11a, CD11b oder CD18 zeigte ebenfalls eine reduzierte PAF-Wirkung auf den Darm. Darüber hinaus wurde eine geringere Myeloperoxidase-Aktivität in den betroffenen Geweben gemessen, was als Indikator für eine verminderte Infiltration von Leukozyten gilt (SUN *et al.* 1996).

PAF und TNF- α führen über die Simulierung der Adhäsionsmoleküle aus der Selektin- und Integrin-Familie zu einer exzessiven Leukozyten-Infiltration in das betroffene Gewebe. Reaktive Sauerstoffspezies, die hauptsächlich von Granulozyten gebildet werden, zerstören die Mukosaintegrität. In der Folge kommt es zu einem vermehrten Eintritt von LPS, welches wiederum die Expression von PAF und TNF- α induziert. Der damit geschlossene Kreislauf führt zu einer sich ausbreitenden Gewebsnekrose (HSUEH *et al.* 2003).

5.5.3 Protektive Wirkung von Humanmilch

In einer prospektiven Studie an 926 Frühgeborenen konnte gezeigt werden, dass Säuglinge, die ausschließlich Säuglingsmilchnahrung bekamen, eine um den Faktor 6 höhere Inzidenz für NEC aufwiesen als Säuglinge, die ausschließlich mit Humanmilch ernährt wurden (LUCAS UND COLE 1990). Im Vergleich zu Säuglingen, die sowohl Humanmilch als auch Säuglingsmilchnahrung erhielten, war die NEC-Inzidenz bei den nicht gestillten Säuglingen noch um den Faktor 3,5 erhöht. Aus diesen epidemiologischen Ergebnissen wurde auf das Vorhandensein von protektiven Faktoren in der Humanmilch geschlossen (LUCAS UND COLE 1990). So wird vermutet, dass sekretorisches IgA in der Humanmilch einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf der NEC ausübt, da orale Immunglobulin-Gaben bei nicht-gestillten Säuglingen einen prophylaktischen Schutz gegenüber NEC boten (EIBL *et al.* 1988). Darüber hinaus konnte in der Humanmilch im Vergleich zu Säuglingsmilchnahrung eine signifikante Aktivität des Enzyms PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) gemessen werden (FURUKAWA *et al.* 1993b, MOYA *et al.* 1994), die zu einer teilweisen Kompensierung der niedrigen PAF-AH-Aktivität bei Neugeborenen beitragen könnte (CAPLAN *et al.* 1990, FURUKAWA *et al.* 1993a). Durch den enzymatischen Abbau von PAF könnte die gemessene PAF-AH-Aktivität der Humanmilch einen protektiven Effekt auf die Pathogenese der NEC ausüben (TJOELKER *et al.* 1995).

5.5.4 Möglicher Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden

Humanmilch-Oligosaccharide nehmen aufgrund verschiedener Eigenschaften möglicherweise ebenfalls Einfluss auf die Pathogenese der NEC. Es wird vermutet, dass HMO über ihre bifidogene oder präbiotische Wirkung (Abschnitt 1.1.3) zu einer geringeren NEC-Inzidenz gestillter Säuglinge beitragen. Die Supplementation von *Bifidobacteria infantis*, die vermehrt im Darm von gestillten Säuglingen auftreten, reduzierte beispielsweise die NEC-Inzidenz bei Ratten über eine Beeinflussung des PAF-Stoffwechsels und über eine verminderte bakterielle Translokation (CAPLAN *et al.* 1999). Darüber hinaus wirken HMO möglicherweise der Kolonisation pathogener, NEC-fördernder Mikroorganismen entgegen, indem sie als Rezeptor-Homologe die Adhäsion von Pathogenen reduzieren (Abschnitt 1.1.3).

Neben diesen postulierten Einflussfaktoren auf die Pathogenese der NEC kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auf weitere protektive Effekte der HMO geschlossen werden:

- Eine exzessive Adhäsion und Infiltration von Leukozyten führt über die zuvor dargestellten Mechanismen zu einer Manifestierung der nekrotisierenden Enterocolitis (Abschnitt 5.5.2). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass HMO das E-Selektin-vermittelte *Rolling* und die anschließende feste Adhäsion an aktivierte Endothelzellen zu reduzieren vermögen. In der Folge kann postuliert werden, dass HMO über die Reduzierung der Leukozyten-Adhäsion und die sich anschließende Extravasation einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf der NEC ausüben.
- Granulozyten tragen im wesentlichen zur ROS-Produktion bei, die neben anderen Faktoren als Auslöser der Gewebsnekrosen angesehen werden (Abschnitt 5.5.2). Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe repräsentieren eine Granulozyten-Subpopulation, die besonders aktiv an der Bildung von ROS beteiligt sind. Eine Blockierung der P-Selektin-vermittelten Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung führte zu einer Reduktion der ROS-Produktion (PETERS *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HMO die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen inhibieren. Es kann vermutet werden, dass HMO über diesen Mechanismus die Bildung von ROS reduzieren und somit möglicherweise einen weiteren protektiven Effekt im Rahmen der NEC ausüben.

- Die Blockierung der Leukozyten-Extravasation mit monoklonalen Antikörpern gegen die Integrine CD11b oder CD18 zeigte eine reduzierte PAF-Wirkung auf den Darm (SUN *et al.* 1996). Die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen führte zu einer vermehrten CD11b/CD18-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche (PETERS *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HMO über ihre inhibitorische Wirkung auf die P-Selektin-vermittelte Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung die CD11b-Expression reduzieren können.

Durch den Kontakt der Granulozyten mit E-Selektinen auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen wird die Expression von CD11b/CD18 ebenfalls induziert (SIMON *et al.* 2000). Es kann vermutet werden, dass auch die Blockierung der E-Selektin-Bindungsdomäne durch HMO zu einer verminderten CD11b-Expression auf der Granulozyten-Oberfläche führt. Über ihre inhibitorische Wirkung auf die Selektin-vermittelte Expression von CD11b/CD18 greifen die HMO möglicherweise positiv in die Pathogenese der NEC ein.

Eine schematische Darstellung des vorgestellten Modells zur Pathogenese der NEC und der möglichen Angriffspunkte der HMO zeigt Abbildung 50.

Zu den hier postulierten Mechanismen der HMO in der Pathogenese der NEC liegen jedoch keinerlei *In-vivo*-Studien vor. Es ist derzeit nicht belegt, ob die in der vorliegenden Arbeit anhand von *In-vitro*- bzw. *Ex-vivo*-Experimenten beobachteten Effekte der HMO auf die *In-vivo*-Situation übertragbar sind. Des Weiteren ist nicht bekannt, inwieweit die inhibitorischen Wirkungen der HMO auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen bzw. die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen einen quantitativen Einfluss auf die Pathogenese der NEC ausüben. Der protektive Effekt der HMO könnte *in vivo* anhand von Interventionsstudien mit Säuglingsnahrung belegt werden, die mit oder ohne HMO supplementiert wird.

Über nachteilige Effekte, die sich aus dem Einfluss der HMO auf Selektin-vermittelte Interaktionen ergeben, liegen zur Zeit weder Daten aus *In-vivo*-Studien noch aus *In-vitro*-Experimenten vor.

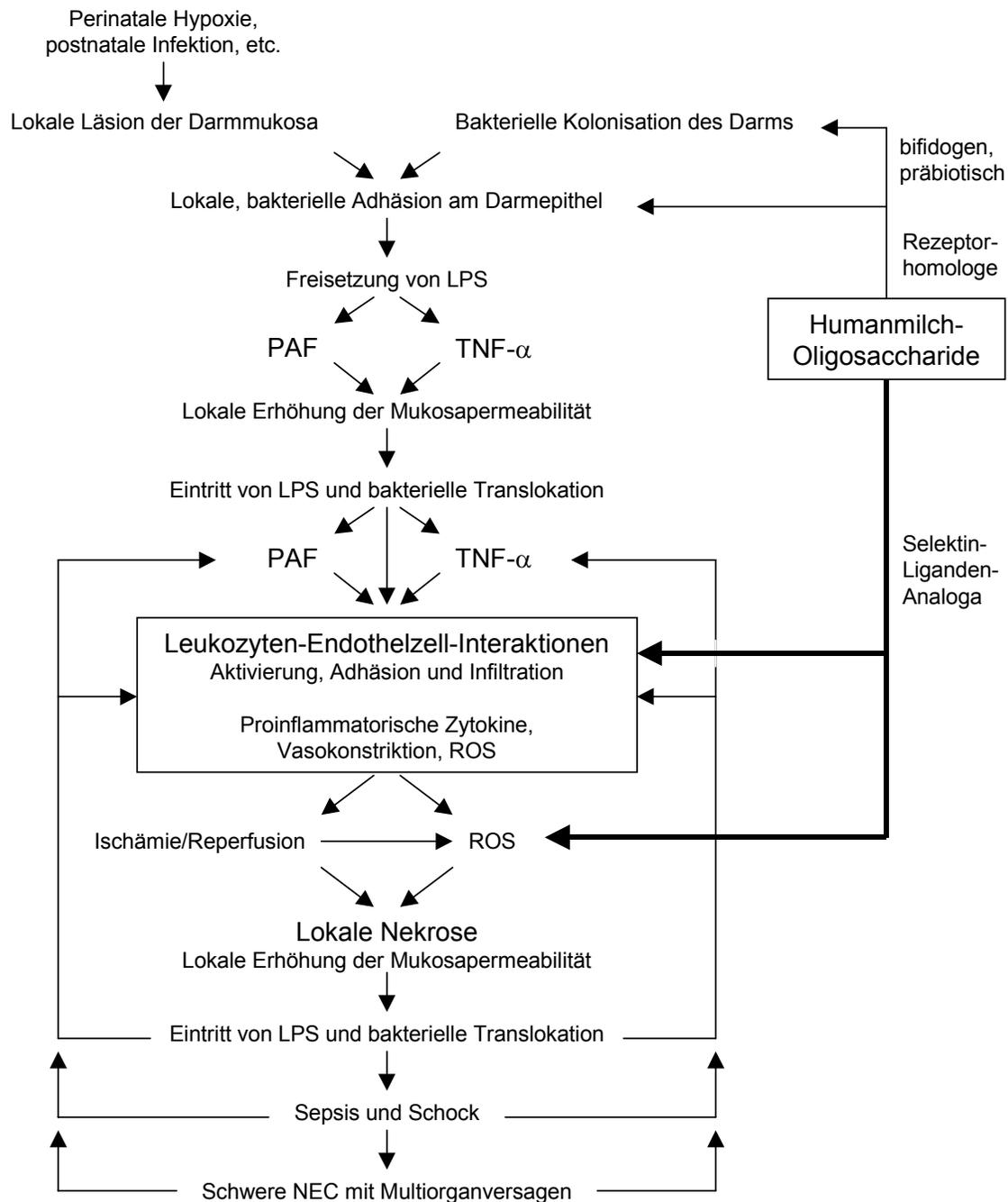


Abbildung 50. MODELL ZUR PATHOGENESE DER NEC

Im Laufe der Pathogenese der NEC kommt es zu einer überschießenden Stimulation proinflammatorischer Zytokine, wie PAF und TNF- α , die zu einer vermehrten Leukozyten-Infiltration führen. Die sukzessive Nekrotisierung des betroffenen Gewebes wird unter anderem durch die von den Leukozyten gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verursacht (modifiziert nach HSUEH *et al.* 2003).

Die HMO greifen möglicherweise auf verschiedenen Ebenen in die Pathogenese der NEC ein: Sie modifizieren die Zusammensetzung der Darmflora und inhibieren die Adhäsion verschiedener Bakterien an das Darmepithel. Darüber hinaus beeinflussen die HMO die Selektin-vermittelten Interaktionen zwischen Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten und reduzieren unter anderem die ROS-Bildung im betroffenen Gewebe (dickere Pfeile).

5.5.5 Interindividuelle Unterschiede

Der Einfluss der HMO auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen bzw. Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Oligosaccharide einer einzelnen Humanmilchprobe untersucht. Aufgrund des Vorkommens von 2'-Fucosyllactose und LNFP I handelt es sich dabei um Humanmilch einer Frau mit Sekretor-Status.

Aus der genetisch determinierten Expression der Glycosyltransferasen, vor allem der Fucosyltransferasen, leitet sich eine interindividuelle, strukturelle Variabilität der HMO ab. Diese Enzyme sind auch an der Synthese von Blutgruppenantigenen des ABO- und Lewis-Systems beteiligt (Abschnitt 1.1.1). Es gibt eine Reihe von Studien, die einen Zusammenhang der Blutgruppenantigene des ABO- und Lewis-Systems mit einer Prädisposition für verschiedene Infektionskrankheiten untersuchten (SHEINFELD *et al.* 1989, DICKEY *et al.* 1993, JANTAUSSCH *et al.* 1994).

Das Vorkommen von sLe^a-, sLe^x- und Le^x-Determinanten als Bestandteil der Oligosaccharide aus Humanmilch von Frauen mit unterschiedlichem Sekretor- und Lewis-Status wurde von Rudloff *et al.* untersucht. Die entsprechenden Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden wurden in den HMO-Frakturen der verschiedenen Spender in unterschiedlichem Ausmaß detektiert (RUDLOFF *et al.* 2002). Anhand dieser Ergebnisse kann postuliert werden, dass die Oligosaccharide aus der Humanmilch verschiedener Frauen einen unterschiedlichen Effekt auf die Selektin-vermittelten Zell-Zell-Interaktionen haben könnten. Zur Verifizierung bzw. Falsifizierung dieser Hypothese könnten Oligosaccharide aus der Humanmilch verschiedener Frauen mit unterschiedlichem Sekretor- bzw. Lewis-Status isoliert werden. Ihre Wirkungen auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen bzw. Thrombozyten-Granulozyten-Interaktionen könnten anschließend anhand der entsprechenden *In-vitro*- bzw. *Ex-Vivo*-Systeme untersucht werden.

Setzt man eine Übertragbarkeit der *In-vitro*- bzw. *Ex-vivo*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die *In-vivo*-Situation voraus, könnte man die weiteren interindividuelle Unterschiede auf physiologischer Ebene postulieren. Die interindividuelle, strukturelle Variabilität der HMO könnte damit die Suszeptibilität des Säuglings für bestimmte Erkrankungen sowohl auf lokaler als auch auf systemischer Ebene determinieren. Die Humanmilch einer Frau mit einem bestimmten Sekretor- bzw. Lewis-Status könnte den Säugling aufgrund der individuellen Oligosaccharid-Zusammensetzung möglicherweise besser vor einer NEC schützen als die Humanmilch einer anderen HMO-Komposition.

Aufgrund der jetzigen Datenlage können zu diesen Zusammenhängen jedoch lediglich spekulative Aussagen getroffen werden.

5.6 Einfluss von Humanmilch-Oligosacchariden auf weitere Lektin-vermittelte Interaktionen

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der Einfluss von HMO auf Selektin-vermittelte Interaktionen untersucht. Im menschlichen Körper gibt es jedoch eine ganze Reihe weiterer Prozesse, die auf der Interaktion von Lektinen und Glykokonjugaten beruhen (Abschnitt 1.2). So könnten HMO aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten mit den physiologischen Oligosaccharid-Bindungs determinanten der verschiedenen Lektin-Liganden möglicherweise einen Einfluss auf Galectin- und Siglec-vermittelte Interaktionen ausüben.

5.6.1 Galectine

5.6.1.1 Vorkommen und Funktionen der Galectine

Dreizehn verschiedene Mitglieder der Galectin-Familie (*Galactoside-Binding Lectins*) konnten bislang in einer Vielzahl von Geweben identifiziert werden (COOPER UND BARONDES 1999). Ihr Vorkommen und ihre bislang beschriebenen Funktionen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Bei den meisten Galectinen handelt es sich um lösliche Proteine, die keine Transmembrandomäne aufweisen. Aufgrund ihrer multivalenten Bindungseigenschaften sind Galectine in der Lage Zellantworten auszulösen, indem sie Glykokonjugate auf Zelloberflächen quervernetzen (HIRABAYASHI UND KASAI 1993). Obwohl die meisten Mitglieder der Galectin-Familie ihre Funktionen außerhalb der Zelle ausüben, gibt es auch Hinweise, dass Galectine an intrazellulären Prozessen beteiligt sind, wie beispielsweise der Regulation des prä-mRNA-Splicings (DAGHER *et al.* 1995).

Die postulierten biologischen Funktionen der Galectine umfassen die Modulation von Zellwachstum, Proliferation und Apoptose sowie die Beeinflussung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Daneben konnte gezeigt werden, dass Galectine in die Synthese und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen eingreifen (RABINOVICH *et al.* 1999a, RABINOVICH *et al.* 1999b, SANTUCCI *et al.* 2000). Galectin-3 gilt darüber hinaus als potenter chemotaktischer Faktor bei der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen (MATSUMOTO *et al.* 1998), während Galectin-9 eine chemotaktische Wirkung auf eosinophile Granulozyten aufweist (SANO *et al.* 2000). Neben ihren vielfältigen Funktionen im Immunsystem scheinen Galectine auch an verschiedenen Schritten bei der Metastasierung von Krebszellen beteiligt zu sein (AKAHANI *et al.* 1997, XU *et al.* 1995,

ELLEHORST *et al.* 1999, RORIVE *et al.* 2001, VAN DEN BRULE *et al.* 2001, RABINOVICH *et al.* 2002).

Tabelle 7. VORKOMMEN UND FUNKTIONEN DER GALECTINE¹

Galectin	Vorkommen	Funktionen
Galectin-1	in nahezu allen Organen nachgewiesen	<ul style="list-style-type: none"> • induziert Apoptose von aktivierten T-Zellen und unreifen Thymozyten • beeinflusst Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen • blockiert Arachidonsäure-Freisetzung, Mastzell-Degranulation und Granulozyten-Extravasation • supprimiert chronische Inflammation und Autoimmunität
Galectin-2	Magenepithelzellen	unbekannt
Galectin-3	Tumorzellen, Makrophagen, Epithelzellen, Fibroblasten, aktivierte T-Zellen	<ul style="list-style-type: none"> • anti-apoptotisch und pro-inflammatorisch • beeinflusst Zelladhäsion und -migration • induziert Monozyten-Chemotaxis • potenziert Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Interleukin-1) • inhibiert die Genexpression von Interleukin-5
Galectin-4	Gastrointestinaltrakt	unbekannt
Galectin-5	Erythrozyten	unbekannt
Galectin-6	Gastrointestinaltrakt	unbekannt
Galectin-7	Haut	<ul style="list-style-type: none"> • erhöht die Empfindlichkeit der Keratinozyten für UVB-induzierte Apoptose
Galectin-8	Leber, Niere, Herzmuskel, Prostata und Gehirn	<ul style="list-style-type: none"> • beeinflusst Integrin-Interaktionen mit der Extrazellulärmatrix
Galectin-9	Thymus, T-Zellen, Niere	<ul style="list-style-type: none"> • induziert Eosinophilen-Chemotaxis
Galectin-10	Eosinophile, Basophile	unbekannt
Galectin-11	Linse	unbekannt
Galectin-12	Adipozyten	<ul style="list-style-type: none"> • induziert Apoptose und Zellarrest
Galectin-13	Plazenta	unbekannt

¹ modifiziert nach RABINOVICH *et al.* 2002

5.6.1.2 Humanmilch-Oligosaccharide als potentielle Galectin-Liganden

Über die Liganden der einzelnen Galectine ist bisher wenig bekannt. Proteine der Basalmembran, wie Laminin und Fibronectin, wurden als Liganden für Galectin-1 und Galectin-3 identifiziert (ZHOU *et al.* 1993, KUWABARA UND LIU 1996, OCHIENG *et al.* 1998). Darüber hinaus interagieren Galectine mit Membranrezeptoren, beispielsweise mit dem Integrin $\alpha 7 \beta 1$ oder mit CD43 und CD45 (GU *et al.* 1994, BAUM *et al.* 1995, NGUYEN *et al.* 2001). Die intrazellulär lokalisierten *Lysosome-associated membrane proteins* (LAMP) stellen ebenfalls physiologische Liganden der Galectine dar (SARAFIAN *et al.* 1998). Alle Mitglieder der Galectin-Familie binden einfache β -Galactoside. N-Acetyllactosamin wurde als Grundstruktur der Oligosaccharid-Bindungsdeterminanten von Galectin-Liganden identifiziert (RABINOVICH 1999). Die Bindungsaffinität zu monomerem N-Acetyllactosamin ist jedoch relativ gering (Dissoziationskonstanten im Bereich zwischen 90 und 100 μ M), während die Affinität zu Glykoproteinen mit Polylactosamin-Sequenzen um ein Vielfaches erhöht ist (Dissoziationskonstanten im Bereich von 1 μ M) (CHO UND CUMMINGS 1995).

Da die Grundstruktur der HMO ebenfalls von N-Acetyllactosamin gebildet wird, bestehen strukturelle Ähnlichkeiten mit den Bindungsdeterminanten der Galectin-Liganden (Abschnitt 1.1.1). Da Oligosaccharide der Humanmilch sogar aus bis zu 15 N-Acetyllactosamin-Einheiten bestehen und somit Polylactosamine darstellen, kann vermutet werden, dass sie im Vergleich zum monovalenten N-Acetyllactosamin eine relativ hohe Bindungsaffinität besitzen. Galectine sind an einer Reihe von Prozessen im Immunsystem beteiligt (RABINOVICH *et al.* 2002). Es ist jedoch bislang nicht bekannt, ob HMO Galectin-vermittelte Interaktionen im Immunsystem beeinflussen können.

5.6.2 Siglecs

5.6.2.1 Vorkommen und Funktionen der Siglecs

Die Familie der Siglecs (*Sialic acid binding Ig-like lectins*) gehört zur Klasse der I-Typ-Lektine und umfaßt derzeit zehn Mitglieder (Abschnitt 1.2). Siglecs werden auf einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems exprimiert und spielen deshalb möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort (CROCKER UND VARKI 2001). Siglec-1 (Sialoadhesin) wird auf Makrophagen exprimiert und vermittelt eine Vielzahl von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (CROCKER *et al.* 1991). Siglec-2 (CD22) ist am *Homing* von B-Lymphozyten ins Knochenmark beteiligt (FLOYD *et al.* 2000, NITSCHKE *et al.* 1997, NITSCHKE *et al.* 1999). Darüber hinaus ist Siglec-2 mit dem B-Zell-Rezeptor (BCR) assoziiert und vermag ein über BCR-vermitteltes Signal zu inhibieren (PEAKER *et al.* 1993, LEPRICE *et al.* 1993, O'KEEFE *et al.* 1996, SATO *et al.* 1996, SMITH *et al.* 1998, POE *et al.* 2000). Die Siglecs-3 bis -10 werden auf einer Vielzahl von Leukozyten exprimiert. Es wird vermutet, dass sie an der Regulation der Leukozyten-Aktivierung beteiligt sind (CORNISH *et al.* 1998, NICOLL *et al.* 1999, PATEL *et al.* 1999, FLOYD *et al.* 2000, KIKLY *et al.* 2000, ANGATA *et al.* 2000, ANGATA UND VARKI 2000, ZHANG *et al.* 2000, MUNDAY *et al.* 2001). Über ihre genaue Funktion ist jedoch bislang nichts bekannt (CROCKER UND VARKI 2001).

Eine Besonderheit von Siglecs stellt ihre Maskierung auf ruhenden Zellen dar, die auch als *cis*-Interaktion bezeichnet wird. Mit Ausnahme von Siglec-1 bindet die Lektin-Domäne der Siglecs Sialinsäure-haltige Oligosaccharid-Determinanten auf benachbarten Glykokonjugaten der gleichen Zelle. Durch die Aktivierung der Zelle wird diese Bindung aufgehoben und die Siglecs können mit Liganden auf anderen Zellen oder der Extrazellulärmatrix interagieren (CROCKER *et al.* 1995, RAZI UND VARKI 1998, RAZI UND VARKI 1999, FLOYD *et al.* 2000).

Eine Übersicht über das Vorkommen und die Funktion der Siglecs, sowie über Besonderheiten der Bindungsdeterminanten ihrer Liganden zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8. VORKOMMEN UND FUNKTIONEN DER SIGLECS¹

Siglec	Vorkommen	Funktion / Bindungs determinante
Siglec-1 Sialoadhesin	Makrophagen	<ul style="list-style-type: none"> • vermittelt Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen • bevorzugt Sialinsäure in α2-3-glykosidischer Bindung
Siglec-2 CD22	B-Lymphozyten	<ul style="list-style-type: none"> • beteiligt am <i>Homing</i> der B-Lymphozyten ins Knochenmark • inhibiert B-Zell-Aktivierung • bevorzugt Sialinsäure in α2-6-glykosidischer Bindung
Siglec-3 CD33	Monozyten, Makrophagen und myeloide Vorläuferzellen	<ul style="list-style-type: none"> • beeinflusst möglicherweise die Leukozyten-Aktivierung
Siglec-4	Oligodendrozyten	<ul style="list-style-type: none"> • bevorzugt Sialinsäure in α2-3-glykosidischer Bindung
Siglec-5	Monozyten, Granulozyten und B-Lymphozyten	<ul style="list-style-type: none"> • bindet sowohl Sialinsäure in α2-3- als auch in α2-6-glykosidischer Bindung
Siglec-6	Trophoblasten, B-Lymphozyten	unbekannt
Siglec-7	Natürliche Killerzellen und Monozyten	<ul style="list-style-type: none"> • bindet sowohl Sialinsäure in α2-3- als auch in α2-6-glykosidischer Bindung
Siglec-8	Eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen	<ul style="list-style-type: none"> • bevorzugt Sialinsäure in α2-3-glykosidischer Bindung
Siglec-9	Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen	<ul style="list-style-type: none"> • bindet sowohl Sialinsäure in α2-3- als auch in α2-6-glykosidischer Bindung • bindet sLe^x
Siglec-10	Natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten	<ul style="list-style-type: none"> • bindet sowohl Sialinsäure in α2-3- als auch in α2-6-glykosidischer Bindung

¹ modifiziert nach CROCKER UND VARKI 2001

5.6.2.2 Humanmilch-Oligosaccharide als potentielle Siglec-Liganden

Die meisten Siglecs scheinen lediglich die terminale Sialinsäure zu erkennen (CROCKER UND VARKI 2001). Darüber hinaus spielt bei einigen Siglecs auch die Art der glykosidischen Bindung eine Rolle, über die die Sialinsäure mit dem benachbarten Zucker verbunden ist. Siglec-2 erkennt beispielsweise ausschließlich α 2-6-glykosidisch gebundene Sialinsäure (VAN DER MERWE *et al.* 1996), während Siglec-3 und Siglec-4 nur mit α 2-3-glykosidisch gebundener Sialinsäure interagieren (FREEMAN *et al.* 1995, COLLINS *et al.* 1997). Die Siglecs-5, -7, -9 und -10 binden sowohl α 2-3- als auch α 2-6-verknüpfte Sialinsäure (COLLINS *et al.* 1997, KELM *et al.* 1998). Die Struktur des Oligosaccharid-

Rückgrats kann in einigen Fällen die Bindungsaffinität beeinflussen. Die Modifizierung der Oligosaccharid-Bindungsdeterminante mit einer α 2-3-glykosidisch gebundenen Fucose schwächt beispielsweise die Liganden-Bindung einiger Siglecs (BRINKMAN-VAN DER LINDEN UND VARKI 2000).

Humanmilch-Oligosaccharide der sauren Fraktion tragen per Definition Sialinsäure-Reste in α 2-3- oder α 2-6-glykosidischer Bindung. Gerade die Hauptkomponenten der sauren HMO-Fraktion, 3'- und 6'-Sialyllactose sowie Sialyl-LNT, stellen aufgrund ihrer Struktur putative Analoga der Siglec-Liganden dar. Weitere Modifikationen der Oligosaccharide, wie beispielsweise Fucosylierungen, könnten die Bindungsaffinität zu den Siglecs möglicherweise schwächen (BRINKMAN-VAN DER LINDEN UND VARKI 2000). Zum Einfluss von HMO auf Siglec-vermittelte Interaktionen liegen derzeit jedoch keine Erkenntnisse vor.

6 Zusammenfassung

Humanmilch enthält eine Vielzahl freier Oligosaccharide (5-10 g/l), die teilweise resorbiert werden und so in die systemische Zirkulation des Säuglings gelangen können. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Humanmilch-Oligosaccharide (HMO) Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden enthalten. Die Adhäsionsmoleküle der Selektin-Familie sind an Zell-Zell-Interaktionen des Immunsystems beteiligt. Im Rahmen einer Inflammation vermitteln Selektine das *Rolling* von Leukozyten auf aktivierten Endothelzellen. Durch diese Verlangsamung der Leukozyten aus dem Blutstrom wird die Leukozyten-Extravasation eingeleitet. Darüber hinaus sind Selektine an der Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen beteiligt, welche eine Subpopulation von hoch reaktiven Granulozyten darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob HMO als lösliche Liganden-Analoga die Selektin-vermittelten Zell-Zell-Interaktionen des Immunsystems beeinflussen können.

Oligosaccharide wurden aus Humanmilch isoliert und in eine saure und eine neutrale Fraktion getrennt. Die Oligosaccharide der sauren Fraktion enthielten Sialinsäure-Reste. Sialinsäure ist ein essentielles Strukturelement der Bindungsdeterminanten von Selektin-Liganden.

Um den Einfluss der HMO auf das *Rolling* und die Adhäsion von Leukozyten zu untersuchen, wurden Monozyten, Lymphozyten oder Granulozyten aus humanem, peripheren Blut isoliert und in einer parallelen Durchflusskammer über humane Endothelzellen geleitet. Die Selektin-Expression wurde zuvor mit TNF- α induziert. Das Zellkulturmedium wurde mit verschiedenen HMO-Fractionen oder Oligosaccharid-Standards supplementiert. In einem physiologischen Bereich zwischen 12,5 und 125 $\mu\text{g/ml}$ führte die saure HMO-Fraktion zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Leukozyten-*Rollings* um bis zu 24,0% und zu einer Reduktion der Leukozyten-Adhäsion um bis zu 52,8%. Eine Reihe von aktiven Komponenten innerhalb der sauren HMO-Fraktion konnten identifiziert werden. Die neutrale Fraktion hatte hingegen keinen Effekt.

Der Einfluss der HMO auf die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen in Vollblut wurde durchflusszytometrisch mit monoklonalen Antikörpern für den Thrombozyten-Marker CD42a und den Granulozyten-Aktivitätsmarker CD11b untersucht. In einem Bereich zwischen 6,25 und 125 $\mu\text{g/ml}$ reduzierte die saure HMO-Fraktion nicht nur die Thrombozyten-Granulozyten-Komplexbildung um bis zu 20,3%, sondern sie führte darüber hinaus auch zu einer verminderten Granulozyten-Aktivierung um bis zu 30,5%. Auch hier zeigte die neutrale HMO-Fraktion keinen Effekt.

Die Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass saure HMO anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen. Die geringere Inzidenz gestillter Säuglinge für inflammatorische Erkrankungen, wie beispielsweise der nekrotisierenden Enterocolitis, basiert möglicherweise zum Teil auf einer spezifischen protektiven Wirkung der HMO.

7 Summary

Influence of human milk oligosaccharides on selectin-mediated cell-cell interactions in the immune system

Human milk is a rich source of a large variety of unbound oligosaccharides (5-10 g/l) partly reaching the systemic circulation of breast-fed infants. In recent studies it was shown that human milk oligosaccharides (HMO) contain binding determinants for selectins, a family of adhesion molecules involved in several cell-cell interactions in the immune system. The initial step of leukocyte extravasation at sites of inflammation is mediated by selectins leading to the rolling of leukocytes on activated endothelial cells. The formation of platelet-neutrophil complexes (PNC) is also mediated by selectins. PNC represent a subpopulation of highly activated neutrophils. The objective of this study was to determine whether or not HMO may serve as soluble selectin-ligand analogs and therefore modulate selectin-mediated cell-cell interactions.

Oligosaccharides were isolated from human milk and separated into an acidic and a neutral fraction containing structures with or without sialic acid residues, respectively. Sialic acid is an essential structural component for selectin binding determinants. To investigate the influence of HMO on leukocyte rolling and adhesion, monocytes, lymphocytes, or neutrophils from human peripheral blood were passed over human endothelial cells in a parallel flow chamber. Selectin expression on endothelial cells was induced by TNF- α . The cell culture media were supplemented with different HMO fractions or oligosaccharide standards. In a physiological range between 12.5 and 125 $\mu\text{g/ml}$, the acidic HMO fraction inhibited leukocyte rolling up to 24.0% and leukocyte adhesion up to 52.8% in a concentration dependent manner. Several active components within the acidic HMO fraction were identified. The neutral HMO fraction had no effect.

The influence of HMO on PNC formation was investigated by flow cytometry of whole blood using monoclonal antibodies for the platelet marker CD42a and the neutrophil activation marker CD11b. Within a concentration of 6.25 and 125 $\mu\text{g/ml}$, the acidic HMO fraction not only reduced PNC-formation up to 20.3% but also decreased neutrophil activation in a concentration dependent manner up to 30.5% according to CD11b-expression. The neutral HMO fraction had no effect.

These results indicate that acidic oligosaccharides may serve as anti-inflammatory components of human milk and might therefore contribute to the lower incidence of inflammatory diseases such as necrotizing enterocolitis in breast-fed versus formula-fed infants.

8 Anhang

8.1 Material

8.1.1 Chemikalien

Aceton p.a.	Merck, Darmstadt
ADP	Sigma, St, Louis, MO, USA
Caesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Citifluor	Citifluor, London, UK
Detergenz	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel	Pierce, Rockford, IL, USA
Dextran (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	Sigma, St, Louis, MO, USA
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ficoll	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	DAKO, Glostrup, Dänemark
fMLP	Sigma, St, Louis, MO, USA
Glucose	Sigma, St, Louis, USA
Heparin, Monoparin 5000 IU/ml	CP Pharmaceuticals, Wrexham, UK
HEPES	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Lymphoprep	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazetat, wasserfrei, p.A.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	BDH Laboratory Supplies, Poole, UK
Natriumdesoxycholat-Monohydrat	Sigma, St, Louis, MO, USA
Natriumhydroxyd (50%)	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Prostacyclin	Sigma, St, Louis, MO, USA
Sephadex G25 Fine	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
TRA	Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA

8.1.2 Lösungen und Puffer

Steriles Wasser, pyrogenfrei	Baxter, Unterschleißheim
PBS (10 x), ohne Ca, Mg	PAA Laboratories, Linz, Österreich
EDTA 1% in PBS	Biochrom AG, Berlin
Natriumpyruvat 100 mM	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Glucose 10%	Braun, Melsungen
HSA (Humanes Serum Albumin) 20%	Baxter, Unterschleißheim
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid-Lösung, steril, pyrogenfrei, isoton	Baxter, Unterschleißheim
HBSS (-/-) (1x), ohne Ca, Mg	Gibco/Life Technologies, Karlsruhe
HBSS (+/+) (1x), mit Ca, Mg	Gibco/Life Technologies, Karlsruhe
CellFIX	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FACS Lysing Solution	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

8.1.2.1 Allgemein

PBS (1x)

- 450 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
- 50 ml PBS (10 x), ohne Ca, Mg

Natriumchlorid-Lösung (1,8%)

- 100 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
 - 1,8 g Natriumchlorid
- steril filtrieren durch 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter

CaCl₂-Stammlösung (150 mM)

- 100 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
 - 2,2 g Calciumchlorid-Dihydrat
- steril filtrieren durch 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter

MgCl₂-Stammlösung (50 mM)

- 100 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
 - 1,017 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat
- steril filtrieren durch 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter

HBS-Stammlösung (11x)

900 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
88,0 g NaCl
26,2 g HEPES
22,0 g Glucose
3,3 g KCl

pH auf 7,58 einstellen

auf 1.000 ml mit sterilem Wasser auffüllen

steril filtrieren durch 0,22 µm Flaschenaufsatzfilter

HBS (1x)

500 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
50 ml HBS-Stammlösung (11x)

HEPES-Lösung (200 mM)

100 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
4,76 g HEPES

pH auf 7,4 einstellen

steril filtrieren durch 0,22 µm Flaschenaufsatzfilter

Dextran-Lösung (10%)

100 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
10 g Dextran

steril filtrieren durch 0,45 µm Spritzenaufsatzfilter

8.1.2.2 Chromatographie**HPLC: Eluent B (0,6 M Natriumchlorid)**

1.000 ml bidest. Wasser
35,06 g Natriumchlorid
10 min mit Helium entgasen

HPAEC-PAD: Eluent A (100 mM Natriumhydroxid)

1.989,6 ml bidest. Wasser
10,4 ml Natriumhydroxid (50%)
10 min mit Helium entgasen

HPAEC-PAD: Eluent B (100 mM Natriumhydroxid + 250 mM Natriumazetat)

600 ml bidest. Wasser

41,23 g Natriumazetat

durch Membranfilter (Zelluloseazetat, 0,45 µm) filtrieren

mit bidest, Wasser auf 2000 ml auffüllen

10,4 ml entnehmen und durch 10,4 ml NaOH (50%) ersetzen

10 min mit Helium entgasen

Affinitätschromatographie: Natriumdesoxycholat-Lösung (1%)

100 ml steriles Wasser, pyrogenfrei

1 g Natriumdesoxycholat

8.1.2.3 *Elutriation***Waschpuffer für die Elutriation**

400 ml steriles Wasser, pyrogenfrei

50 ml PBS (10 x), ohne Ca, Mg

25 ml Natrium-Pyruvat (100 mM)

25 ml EDTA 1% in PBS

2,5 ml HSA (Humanes Serum Albumin) 20%

Elutriationspuffer

800 ml steriles Wasser, pyrogenfrei

100 ml PBS (10 x), ohne Ca, Mg

50 ml Natrium-Pyruvat (100 mM)

50 ml EDTA 1% in PBS

10 ml Glucose (10%)

8.1.2.4 *Durchflusszytometrie***FACS-Lyse**

90 ml steriles Wasser, pyrogenfrei

10 ml FACS Lysing Solution

steril filtrieren durch 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter

FACS-Fix

90 ml steriles Wasser, pyrogenfrei

10 ml CellFIX

steril filtrieren durch 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter

FACS-Wash

50 ml PBS (1x)

0,5 mg BSA (Bovines Serum Albumin)

0,05 mg Natriumazid

steril filtrieren durch 0,22 µm Spritzenaufsatzfilter

8.1.3 Zellkulturmedien und Supplemente

MCDB 131, ohne L-Glutamin

Gibco/Life Technologies, Karlsruhe

RPMI 1640, mit L-Glutamin

Gibco/Life Technologies, Karlsruhe

FCS (Fetal calf serum)

Biochrom, Berlin

Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml, 10,000 µg/mL)

Gibco/Life Technologies, Karlsruhe

L-Glutamin (200 mM)

Gibco/Life Technologies, Karlsruhe

EGF (Epidermal growth factor)

Gibco/Life Technologies, Karlsruhe

ECGS (Endothelial cell growth supplement)

PromoCell, Heidelberg

Amphotericin B (250 µg/ml)

Gibco/Life Technologies, Karlsruhe

hrTNF-α (Tumor necrosis factor alpha)

R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Gelatine (aus Schweinehaut)

Sigma, St, Louis, MO, USA

Fibronectin (aus humanem Plasma)

Sigma, St, Louis, MO, USA

Trypsin-EDTA (10x) in HBSS

Gibco/Life Technologies, Karlsruhe

Acutase

PAA Laboratories, Linz, Österreich

Collagenase Typ II, 196 Units

Biochrom, Berlin

EGF-Lösung (2,5 µg/100 µl)

100 µg EGF (Epidermal Growth Factor)

4 ml MCDB 131, ohne L-Glutamin

auf Eis aliquotieren zu 100 µl

HUVEC-Medium

- 440 ml MCDB 131, ohne L-Glutamin
- 50 ml FCS (Fötale Kälberserum)
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml, 10,000 µg/mL)
- 1 ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)
- 100 µl EGF-Lösung (2,5 µg/100 ml)

steril filtrieren durch 0,45 µm Flaschenaufsatzfilter

Flussmedium

- 88 ml MCDB 131, ohne L-Glutamin
- 10 ml FCS (Fötale Kälberserum)
- 1 ml L-Glutamin (200 mM)
- 1 ml Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml, 10,000 µg/mL)

steril filtrieren durch 0,45 µm Flaschenaufsatzfilter

Leukozytenmedium

- 45 ml RPMI 1640, mit L-Glutamin
- 5 ml FCS (Fötale Kälberserum)
- 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml, 10,000 µg/mL)

steril filtrieren durch 0,45 µm Flaschenaufsatzfilter

TNF- α (10 ng/µl)

- 10 µg hrTNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*)
- 1 ml PBS (1x)
- 5 µl HSA (Humanes Serum Albumin) 20%

auf Eis aliquotieren zu 10 µl

Fibronectin-Lösung (0,002%)

- 10 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
- 5 mg Fibronectin (aus humanem Plasma)

5 min im Ultraschallbad in Lösung bringen

mit Natriumchloridloesung (steril, pyrogenfrei, isoton) auf 250 ml auffüllen

Gelatine-Stammlösung (2%)

- 100 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
- 2 g Gelatine (aus Schweinehaut)

kurz aufkochen und anschließend autoklavieren

Gelatine-Lösung (0,2%)

90 ml Natriumchloridloesung, steril, pyrogenfrei, isoton
 10 ml Gelatine-Stammlösung (2%)

Trypsin (1x)

80 ml Natriumchloridloesung, steril, pyrogenfrei, isoton
 10 ml HEPES-Lösung (200mM)
 10 ml Trypsin-EDTA (10x)

Collagenase-Lösung (0,025%)

100 ml steriles Wasser, pyrogenfrei
 25 mg Collagenase Typ II, 196 Units
 steril filtriert durch 0,2 µm Flaschenaufsatzfilter

8.1.4 Oligosaccharid-Standards**Galactotriose**Gal α 1-3Gal β 1-4Gal

Dextra Laboratories, Reading, UK

3'-SialyllactoseNeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc

Dextra Laboratories, Reading, UK

6'-SialyllactoseNeuAc α 2-6Gal β 1-4Glc

Dextra Laboratories, Reading, UK

3'-Sialyl-3-fucosyllactoseNeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc

Glyko, Novato, CA, USA

3'-Sialyl-Lewis xNeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc

Dextra Laboratories, Reading, UK

Disialyl-monofucosyllacto-N-HexaoseNeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GlcNAc β 1-3(Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6)Gal β 1-4Glc

Glyko, Novato, CA, USA

8.1.5 Antikörper und Kernfärbereagenz

8.1.5.1 Primärantikörper

<i>Mouse anti-human CD11b:FITC</i>	Serotec, Oxford, UK
<i>Mouse anti-human CD15:FITC</i>	DAKO, Glostrup, Dänemark
<i>Mouse anti-human CD15s:FITC</i>	Serotec, Oxford, UK
<i>Mouse anti-human CD42a:PerCP</i>	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
<i>Mouse anti-human CD54</i>	Serotec, Oxford, UK
<i>Mouse anti-human CD62E:CyChrome</i>	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>Mouse anti-human CD62P:CyChrome</i>	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>Mouse anti-human CD62P:PE</i>	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>Mouse anti-human CD102</i>	Serotec, Oxford, UK
<i>Mouse anti-human CD106:PE</i>	Serotec, Oxford, UK
<i>Mouse anti-human vW-factor</i>	DAKO, Glostrup, Dänemark

8.1.5.2 Sekundärantikörper

<i>Goat anti-mouse:FITC</i>	Sigma, St, Louis, MO, USA
<i>Rabbit anti-mouse:FITC</i>	DAKO, Glostrup, Dänemark
<i>Goat anti-mouse:RPE</i>	DAKO, Glostrup, Dänemark
<i>Goat anti-mouse:Cy5</i>	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

8.1.5.3 Antikörper für Isotypen-Negativkontrollen

<i>anti-mouse IgG1:FITC</i>	DAKO, Glostrup, Dänemark
<i>anti-mouse IgG1:PE</i>	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>anti-mouse IgG1:CyChrome</i>	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>anti-mouse IgG2a:PerCP</i>	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

8.1.5.4 Antikörper-Kits zur Leukozyten-Charakterisierung

<i>anti-mouse IgG1:FITC</i>	DAKO, Glostrup, Dänemark
<i>anti-mouse IgG1:PE</i>	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>anti-mouse IgG1:CyChrome</i>	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
<i>anti-mouse IgG1:PerCP</i>	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

8.1.5.5 Kernfärbereagenz

TO-PRO-3 Iodid	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
----------------	-----------------------------------

8.2 Geräte

8.2.1 Allgemein

Drei-Wege-Hahn	Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden
Gefriertrockungsanlage Alpha 1-4	Christ, Osterode
Neubauer-Zählkammer	Merck, Darmstadt
Rotationsverdampfer	Büchi, Konstanz
Spritzenvorsatzfilter (Nylon 0,2 µm)	Macherey-Nagel, Düren
Zellkulturflasche (75 cm ²)	Biochrom, Berlin

8.2.2 Isolierung und Charakterisierung der Oligosaccharide

Gelfiltration

Pumpe P-500	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Steuereinheit LCC-500 Plus	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Säule	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Differentialrefraktometer	Knauer, Berlin
Fraktionensammler FC204	Gilson, Middleton, WI, USA

Anionenaustauschchromatographie (HPLC)

Pumpe LC-10AS	Shimadzu, Kyoto, Japan
Resource Q Säule, 6 ml	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
UV-VIS-Detektor SPD-10A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Fraktionensammler	Shimadzu, Kyoto, Japan
Class-LC10 Software	Shimadzu, Kyoto, Japan

Detoxifikation und Endotoxin-Quantifizierung

Chromabond Glassäule (6 ml, mit Filterelement)	Macherey-Nagel, Weilmünster
LAL Test Kit QCL-1000	BioWhittaker, Walkersville, MD, USA
ELISA-Reader	ASYS Hitech, Eugendorf, Österreich

Atomabsorptionsspektrometrie

Atomabsorptionsspektrometer PU9400X	Philips Analyticals, Almelo, Niederlande
-------------------------------------	--

HPAEC-PAD

HPAEC-PAD-System	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
CarboPac PA 1 Guard	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
CarboPac PA 1 (4 x 250 mm)	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
Chromeleon V. 6.00 Software	Dionex, Sunnyvale, CA, USA

Nano-Elektrospray Massenspektrometrie

ESI-Q-TOF-MS	Micromass, Manchester, UK
MassLynx Windows NT Software	Micromass, Manchester, UK

8.2.3 Isolierung und Charakterisierung der Endothelzellen

sterile Kompresse	Bastos Viegas, Penafiel, Portugal
Einmal-Skalpell	Feather Safety Razor, Japan
Knopfkanüle (2.0 x 60 mm)	Unimed, Lausanne, Schweiz
Kabelbinder	Obi, Giessen
Nadeladapter (mit Lueranschluss)	Millipore, Bedford, MA, USA
Arterienklemme	Merck, Darmstadt
8-Well-Objektträger	Nalge NUNC International, Rochester, NY, USA
24-Well-Platten	Corning, Corning, NY, USA

8.2.4 Isolierung und Charakterisierung von Leukozyten und Thrombozyten

Beckman Coulter Elutriator J6-MC	Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA
Masterflex Pumpe 7014	Barnant, Barrington, IL, USA
Leukozytenfilter	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

8.2.5 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Plastik-Coverslip	Nalge NUNC International, Rochester, NY, USA
Pinzette, steril	Merck, Darmstadt
4-Well-Platte	Nalge NUNC International, Rochester, NY, USA
Durchflussskammer	von Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Infusionsleitung, 30 cm	Primed, Halberstadt
Mirkoperfusionspumpe	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert S100	Zeiss, Jena
Video-Dokumentationssystem	JVC, Tokio, Japan

8.2.6 Durchflusszytometrie

FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
CellQuest, Version 3.1f	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

8.2.7 Konfokalmikroskopie

Poly-Lysin beschichtete Objektträger	Nalge NUNC International, Rochester, NY, USA
Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop SP2	Leica, Milton Keynes, UK
Cofocal Imaging Software	Leica, Milton Keynes, UK

Literaturverzeichnis

- Akahani S**, Inohara H, Nangia-Makker P, Raz A (1997) Galectin-3 in tumor metastasis. *Trends Glycosci Glycotechnol* 9: 69-75
- Alon R**, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128: 1243-1253
- Altieri DC**, Plescia J, Plow EF (1993) The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen γ chain interacts with CD11b/CD18 integrin (α M β 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J Biol Chem* 268: 1847-1853
- Anderson DC und Springer TA** (1987) Leukocyte adhesion deficiency: An inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and p150,95 glycoproteins. *Ann Rev Med* 38: 175-194
- Anderson DC**, Rothlein R, Marlin SD, Krater SS, Smith CW (1990) Impaired transendothelial migration by neonatal neutrophils: abnormalities of Mac-1 (CD11b/CD18)-dependent adherence reactions. *Blood* 78: 2613-2621
- Anderson DC**, Schmalstieg FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, Kohl S, Tosi MF, Jacobs RL, Waldrop TC, Goldman AS, Shearer WT, Springer TA (1985) The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1, p150,95 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 152: 668-689
- Anderson JM**, Balda MS, Fanning AS (1993) The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 5: 772-778
- Angata T und Varki A** (2000a) Siglec-7: a sialic acid-binding lectin of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiology* 10: 431-438
- Angata T und Varki A** (2000b) Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs. Evidence for co-evolution with sialic acid synthesis pathways. *J Biol Chem* 275: 22127-22135
- Antonowicz I**, Chang SK, Grand RJ (1974) Development and distribution of lysosomal enzymes and disaccharidases in human fetal intestine. *Gastroenterology* 67: 51-58
- Arefieva TI**, Provatorov SI, Samko AN, Krasnikova TL, Resink TJ, Erne P, Tkachuk VA, Chazov EI (2001) Monocyte integrin expression and monocyte-platelet complex formation in humans with coronary restenosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 804-808
- Arfors KE**, Lundberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty PG, Harlan JM (1987) A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 69: 338-340

- Artursson P** (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 79: 476-482
- Asa D**, Raycroft L, Ma L, Aeed PA, Kaytes PS, Elhammer AP, Geng JG (1995) The P-selectin glycoprotein ligand-1 functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectin. *J Biol Chem* 270: 11662-11670
- Atherton A und Born GV** (1972) Quantitative investigation of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leukocytes to blood vessel walls. *J Physiol* 222: 447-474
- Aurrand-Lions M**, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA (2001a) JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276: 2733-2741
- Aurrand-Lions M**, Duncan L, Du Pasquier L, Imhof BA (2000) Cloning of JAM-2 and JAM-3: an emerging junctional adhesion molecular family? *Curr Top Microbiol Immunol* 251: 91-98
- Aurrand-Lions M**, Johnson-Leger C, Lamagna C, Ozaki H, Kita T, Imhof BA (2002) Junctional adhesion molecules and interendothelial junctions. *Cells Tissues Organs* 172: 152-160
- Aurrand-Lions M**, Johnson-Leger C, Wong C, Du Pasquier L, Imhof BA (2001b) Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* 98: 3699-3707
- Axelsson I**, Jakobsson I, Lindberg T, Polberger S, Benediktsson B, R ih  N (1989) Macromolecular absorption in term and preterm infants. *Acta Paediatr Scand* 78: 532-537
- Back AL**, Kerkering M, Baker D, Bauer TR, Embree LJ, Hickstein DD (1993) A point mutation associated with leukocyte adhesion deficiency type 1 of moderate severity. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 912-918
- Back AL**, Kwok WW, Hickstein DD (1992) Identification of two molecular defects in a child with leukocyte adherence deficiency. *J Biol Chem* 267: 5482-5487
- Ballance WA**, Dahms BB, Shenker N, Kliegmann RM (1990) Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: a ten-year experience. *J Pediatr* 117: S6-S13
- Baum LG**, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M, Seilhamer JJ (1995) Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 181: 877-887
- Baumhueter S**, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA (1993) Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262: 436-438
- Bayer N**, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R (1998) Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol* 72: 9645-9655

- Bazzoni G**, Dejana E, del Maschino A (1991) Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica* 76: 491-499
- Bazzoni G**, Dejana E, del Maschino A (1992) Platelet-dependent modulation of neutrophil function. *Pharmacol Res* 26: 269-272
- Bell MJ**, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherton T (1978) Neonatal necrotizing enterocolitis. *Ann Surg* 187: 1-7
- Berg EL**, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL (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 RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC (1995) alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80: 413-422
- Berlin C**, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC (1993) alpha4beta7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74: 185-195
- Bevilacqua MP und Nelson RM** (1993) Selectins. *J Clin Invest* 91: 379-387
- Bevilacqua MP**, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA (1987) Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9238-9242
- Bevilacqua MP**, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-1165
- Beyer EC** (1993) Gap junctions. *Int Rev Cytol* 137C: 1-37
- Bosse R und Vestweber D** (1994) Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur J Immunol* 24: 3019-3024
- Bowen B**, Fennie C, Lasky LA (1990) The Mel 14 antibody binds to the extracellular domain of the murine peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol* 110: 147-153
- Brand-Miller JC**, McVeagh P, McNeil Y, Messer M (1998) Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *J Pediatr* 133: 95-98
- Brenner B**, Gulbins E, Schlottmann K, Koppenhoefer U, Busch GL, Walzog B, Steinhausen M, Coggshall KM, Linderkamp O, Lang F (1996) L-selectin activates Ras pathway via the tyrosine kinase p56^{lck}. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15376-15381
- Brinkman-Van der Linden EC und Varki A** (2000) New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *J Biol Chem* 275: 8625-8632

- Brizzi MF**, Garbarino G, Rossi PR, Pagliardi GL, Arduino C, Avanci GC, Pegoraro L (1993) Interleukin 3 stimulates proliferation and triggers endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 gene activation of human endothelial cells. *J Clin Invest* 91: 2887-2892
- Brunk DK und Hammer DA** (1997) Quantifying rolling adhesion with a cell-free assay: E-selectin and its carbohydrate ligands. *Biophys J* 72: 2820-2833
- Brustein M**, Kraal, G, Merbius R, Watson S (1992) Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor. *J Exp Med* 176: 1415-1419
- Bullard DC**, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, Doerschuk CM, Ley K, Beaudet AL (1996) Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med* 183: 2329-2336
- Bullard DC**, Qin L, Lorenzo I, Quinlin WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet AL (1995) P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest* 95: 1782-1788
- Burns AR**, Bowden RA, MacDonell SD, Walker DC, Odebunmi TO, Donnachie EM, Simon SI, Entman ML, Smith CW (2000) Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci* 113: 45-57
- Campana D**, Sheridan B, Tidman N, Hoffbrand AV, Janossy G (1986) Human leukocyte function-associated antigens on lympho-hemopoietic precursor cells. *Eur J Immunol* 16: 537-542
- Camussi G**, Bussolino F, Salvidio G, Baglioni C (1987) Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J Exp Med* 166: 1390-1404
- Caplan MS**, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russel T, Lickerman M, Amer N, Xiao Y, Thompson R (1999) Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterol* 117: 577-583
- Carden DL und Granger DN** (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190:255-66
- Carlos TM**, Dobrina A, Ross R, Halan JM (1990) Multiple receptors on human monocytes are involved in adhesion to cultured human endothelial cells. *J Leukocyte Biol* 48: 451-456
- Cerletti C**, Evangelista V, de Gaetano G (1999) P-selectin- β 2-integrin cross-talk: a molecular mechanism for polymorphonuclear leukocyte recruitment at the site of vascular damage. *Thrombosis and Haemostasis* 82: 787-793
- Chang KC**, Tees DF, Hammer DA (2000) The state diagram for cell adhesion under flow: leukocyte rolling and firm adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11262-11267

- Charo IF**, Yuen C, Goldstein IM (1985) Adherence of human polymorphonuclear leukocytes to endothelial monolayers: effects of temperature, divalent cations, and chemotactic factors on the strength of adherence measured with a new centrifugation assay. *Blood* 65: 473-479
- Cho M und Cummings RD** (1995) Galectin-1, a beta galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. 1. Physical and chemical characterization. *J Biol Chem* 270: 5198-5206
- Collins BE**, Kiso M, Hasegawa A, Tropak MB, Roder JC, Crocker PR, Schnaar RL (1997) Binding specificities of the sialoadhesin family of I-type lectins. Sialic acid linkage and substructure requirements for binding of myelin-associated glycoprotein, Schwann cell myelin protein, and sialoadhesin. *J Biol Chem* 272: 16889-16895
- Cooper DN und Barondes SH** (1999) God must love the galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 9: 919-984
- Coppa GV**, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL (1993) Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* 91: 637-641
- Coppa GV**, Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Gabrielli O (1999) Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr* 88: 89-94
- Corbi AL**, Vara A, Ursa A, Garcia Rodriguez MC, Fontan G, Sanchez-Madrid F (1992) Molecular basis for a severe case of leukocyte adhesion deficiency. *Eur J Immunol* 22: 1877-1881
- Cornish AL**, Freeman S, Forbes G, Ni J, Zhang M, Cepeda M, Getz R, Augustus M, Carter KC, Crocker PR (1998) Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. *Blood* 92: 2123-2132
- Crocker P und Feizi T** (1996) Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. *Curr Biol* 6: 679-691
- Crocker PR und Varki A** (2001) Siglecs in the immune system. *Immunology* 103: 137-145
- Crocker PR**, Freeman S, Gordon S, Kelm S (1995) Sialoadhesin binds preferentially to cells of the granulocytic lineage. *J Clin Invest* 95: 635-643
- Crocker PR**, Kelm S, Dubois C, Martin B, McWilliam AS, Shotton DM, Paulson JC, Gordon S (1991) Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages. *EMBO J* 10: 1661-1669
- Crockett-Torabi E und Fantone JC** (1997) L-selectin stimulation of canine neutrophil initiates calcium signaling secondary to tyrosine kinase activation. *Am J Physiol* 272: H1302-H1308
- Cronstein BN**, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F (1992) A mechanism for the anti-inflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9991-9995
- Crovello CS**, Furie B, Furie B (1993) Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation. *J Biol Chem* 268: 14590-14593

- Cueva JP und Hsueh W** (1988) Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 29: 1207-1212
- Cummings RD** (1999) Plant lectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko J, Freeze HH, Hart G, Marth J (Hrsg.) *Essentials of Glycobiology*. 1. Aufl. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 455-467
- Cummings RD und Lowe JB** (1999) Selectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko J, Freeze HH, Hart G, Marth J (Hrsg.) *Essentials of Glycobiology*. 1. Aufl. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 391- 415
- Dagher SF**, Wang JL, Patterson RJ (1995) Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA slicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1213-1217
- Dai D und Walker WA** (1999) Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Adv Pediatr* 46: 353-382
- de Curtis M**, Paone C, Vetrano G, Romano G, Paludetto R, Cicimarra F (1987) A case control study of necrotizing enterocolitis occurring over 8 years in a neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr* 146: 398-400
- de Fougerolles AR**, Qin X, Springer TA (1994) Characterization of the function of ICAM-3 and comparison to ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med* 179: 619-629
- Dejana E**, Corada M, Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 9 910-918
- Deuel TF**, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Henrikson RL, Kaiser ET (1981) Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4584-4587
- Diacovo TG**, deFourgerolles AR, Bainton DF, Springer TA (1994) A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* 94: 1243-1251
- Diamond MS**, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA (1990) ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 111: 3129-3139
- Dickey W**, Collins JS, Watson RG, Sloan JM, Porter KG (1993) Secretor status and Helicobacter pylori infection are independent risk factors for gastroduodenal disease. *Gut* 34: 351-353
- Doré M** (1998) Platelet-leukocyte interactions. *Am Heart J* 135: S146-S151
- Doré M**, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW (1993) P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 82: 1308-1316
- Drickamer K** (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 263: 9557-9560
- Dustin ML und Springer TA** (1988) Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 107: 321-331

- Egge H**, Dell A, von Nicolai H (1983) Fucose containing oligosaccharides from human milk. I. Separation and identification of new constituents. *Arch Biochem Biophys* 224: 235-253
- Eibl MM**, Wolf HM, Furnkranz H, Rosenkranz A (1988) Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgA-IgG feeding. *N Engl J Med*: 319: 1-7
- Ellehorst J**, Nguyen T, Cooper DN, Lotan D, Lotan R (1999) Differential expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in human prostate cancer cell lines and effects of overexpressing galectin-1 on cell phenotype. *Int J Oncol* 14: 217-224
- Emerich DF**, Dean RL, Bartus RT (2002) The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol* 173:168-81
- Engfer MB**, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H (2000) Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 71: 1589-1596
- Erbe DV**, Watson SR, Presta LG, Wolitzky BA, Foxall C, Brandley BK, Lasky LA (1993) P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol* 120: 1227-1235
- Erbe DV**, Wolitzky BA, Presta LG, Norton CR, Ramos RJ, Burns, DK, Rumberger JM, Rao N, Foxall C, Brandley BK, Lasky LA (1992) Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. *J Cell Biol* 119: 215-227
- Etzioni A und Tonetti M** (2000) Fucose supplementation in leukocyte adhesion deficiency type II. *Blood* 95: 3641-3642
- Etzioni A**, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML, Paulson JC, Gershoni-Baruch R (1992) Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med* 327: 1789-1792
- Etzioni A**, Gershoni-Baruch R, Pollack S, Shehadeh N (1998) Leukocyte adhesion deficiency type II: long-term follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 102: 323-324
- Etzioni A**, Sturla L, Antonellis A, Green ED, Gershoni-Baruch R, Berninsone PM, Hirschberg CB, Tonetti M (2002) Leukocyte adhesion deficiency (LAD) type II/carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) IIc founder effect and genotype/phenotype correlation. *Am J Med Genet* 110: 131-135
- Evangelista V**, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni O, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C (1999) Platelet/polymorphonuclear leukocyte interactions: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: Role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 93: 876-885
- Feng D**, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM (1998) Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* 187: 903-915

- Figdor CG**, Leemans JM, Bont WS, de Vries JE (1983) Theory and practice of centrifugal elutriation (CE). Factors influencing the separation of human blood cells. *Cell Biophys* 5:105-118
- Finger EB**, Puri KD, Alon R, Lawrence MB, von Andrian UH, Springer TA (1996) Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature* 1996 379: 266-269
- Finke B**, Stahl B, Pfenninger A, Karas M, Daniel H, Sawatzki G (1999) Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS. *Anal Chem* 71: 3755-3762
- Fiore S und Serhan CN** (1990) Formation of lipoxins and leukotrienes during receptor-mediated interactions of human platelets and recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-primed neutrophils. *J Exp Med* 172: 1451-1457
- Fitzgerald DJ**, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA (1986) Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 315: 983-989
- Flotte T**, Springer TA, Thorbecke GJ (1983) Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am J Pathol* 111: 112-124
- Floyd H**, Ni J, Cornish AL, Zeng Z, Liu D, Carter KC, Steel J, Crocker PR (2000) Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* 275: 861-866
- Floyd H**, Nitschke L, Crocker PR (2000) A novel subset of murine B cells that expresses unmasked forms of CD22 is enriched in the bone marrow: implications for B-cell homing to the bone marrow. *Immunology* 101: 342-347
- Fox PF und Mcsweeney PLH** (1998) Dairy chemistry and biochemistry. Thomas Science, London, UK
- Foxall C**, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK (1992) The three members of the selectin family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis x oligosaccharide. *J Cell Biol* 117: 895-902
- Freeman SD**, Kelm S, Barber EK, Crocker PR (1995) Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesion family of cellular interaction molecules. *Blood* 85: 2005-2012
- Fries JW**, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Lipscomb MF, Collins T (1993) Expression of VCAM-1 and E-selectin in an *in vivo* model of endothelial activation. *Am J Pathol* 143: 725-735
- Fritz J**, Katopodis AG, Kolbinger F, Anselmetti D (1998) Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12283-12288
- Fukuda M**, Spooncer E, Oates JE, Dell A, Klock JC (1984) Structure of sialylated fucosylated lactosaminoglycan isolated from human granulocytes. *J Biol Chem* 259: 10925-10935

- Furukawa M**, Lee EL, Johnston JM (1993a) Platelet-activating factor-induced ischemic bowel necrosis: the effect of platelet-activating factor acetylhydrolase. *Pediatr Res* 34: 237-241
- Furukawa M**, Narahara H, Yasuda K, Johnston JM (1993b) Presence of platelet-activating factor-acetylhydrolase in milk. *J Lipid Res* 34: 1603-1609
- Furuse M**, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141: 1539-1550
- Furuse M**, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-1788
- Gaehtgens P** (1994) Physiologie des Blutes. In: Deetjen P und Speckmann EJ (Hrsg.) Physiologie. 2. Aufl. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg: 271-304
- Gallatin WM**, Weissman IL, Butcher EC (1983) A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304: 30-34
- Gallik S**, Usami S, Jan KM, Chien S (1989) Shear stress-induced detachment of human polymorphonuclear leukocytes from endothelial cell monolayers. *Biorheology* 26: 823-834
- Gamble JR**, Khew-Goodall Y, Vadas MA (1993) Transforming growth factor- β inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol* 150: 4494-4503
- Gawaz M**, Dickfeld T, Bogner C, Fateh Moghadam S, Neumann FJ (1997) Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 23: 379-385
- Geng JG**, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP (1990) Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343: 757-760
- Geng JG**, Heavner GA, McEver RP (1992) Lectin domain peptides from selectins interact with both cell surface ligands and Ca^{+2} ions. *J Biol Chem* 267: 19846-19853
- Ghera P**, van Huijsduijnen RH, Whelan J, Cambet Y, Pescini R, Delamarter JF (1994) Inhibition of E-selectin gene transcription through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem* 269: 29129-29137
- Gnoth MJ**, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S (2000a) Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J Nutr* 130: 3014-3020
- Gnoth MJ**, Kunz C, Rudloff S (2000b) Endotoxin-reduced milk oligosaccharide fractions suitable for cell biological studies. *Eur J Med Res* 5: 468-472
- Gnoth MJ**, Rudloff S, Kunz C, Kinne RKH (2001) Investigations of the *in vitro* transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem* 276: 34363-34370

- Goetz DJ**, Greif DM, Ding H, Camphausen RT, Howes S, Comess KM, Snapp KR, Kansas GS, Luscinkas FW (1997) Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin. *J Cell Biol* 137: 509-519
- Goldsmith HL und Spain S** (1984) Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. *Microvasc Res* 27: 204-222
- Grande P**, Grauhoft AM, Madsen JK (1990) Unstable angina pectoris: platelet behavior and prognosis in progressive angina and intermediate coronary syndromes. *Circulation* 81 (suppl): I16-I19
- Graves BJ**, Crowther RL, Chandran C, Rumberger JM, Li S, Huang KS, Presky DH, Familletti PC, Wolitzky BA, Burns DK (1994) Insight into E-selectin/ligand interactions from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. *Nature* 367: 532-538
- Gray GM** (1975) Carbohydrate digestion and absorption. *N Engl J Med* 292: 1225-1230
- Gu M**, Wang W, Song WK, Cooper DN, Kaufman SJ (1994) Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *J Cell Sci* 107: 175-181
- Guneser S**, Altintas DU, Aksungur P, Herguner O, Sanal O (1996) An infant with severe leukocyte adhesion deficiency. *Acta Paediatr* 85: 622-624
- Gurtner GC**, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI (1995) Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* 9: 1-14
- Guyer DA**, Moore KL, Lynam EB, Schammel CM, Rogelj S, McEver RP, Sklar LA (1996) P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1 is a ligand for I-selectin in neutrophil aggregation. *Blood* 88: 2415-2421
- György P**, Norris RF, Rose CS (1954) Bifidus factor I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch Biochem Biophys* 48: 193-201
- Hack M**, Horbar J, Malloy M, Tyson JE, Wright E, Wright L (1991) Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development neonatal network. *Pediatrics* 87: 587-597
- Hahne M**, Jäger U, Isenmann S, Hallmann R, Vestweber D (1993) Five TNF-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J Cell Biol* 121: 655-664
- Hamburger SA und McEver RP** (1990) GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 75: 550-554
- Hamosh M** (1996) Digestion in the newborn. *Clin Perinatol* 23: 181-209

- Harris ES**, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (2000) The leukocyte integrins. *J Biol Chem* 275: 23409-23412
- Hawkins HK**, Heffelfinger SC, Anderson DC (1992) Leukocyte adhesion deficiency: clinical and postmortem observations. *Pediatr Pathol* 12:119-130
- Hawrylowicz CM**, Howells GL, Feldmann M (1991) Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med* 174: 785-790
- Hemmerich S und Rosen SD** (1994) 6'-Sulfated sialyl Lewis x is a major capping group of GlyCAM-1. *Biochemistry* 33: 4830-4835
- Hemmerich S**, Butcher EC, Rosen SD (1994) Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA-79, an adhesion-blocking monoclonal antibody. *J Exp Med* 180: 2219-2226
- Hemmerich S**, Leffler H, Rosen SD (1995) Structure of the O-glycans in GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin. *J Biol Chem* 270: 12035-12047
- Henriques GM**, Miotla JM, Cordeiro SB, Woltzky BA, Woolley ST, Hellewell PG (1996) Selectins mediate eosinophil recruitment in vivo: a comparison with their role in neutrophil influx. *Blood* 87: 5297-5304
- Hidalgo IJ**, Raub TJ, Borchardt RT (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96: 736-749
- Hidari KI**, Weyrich AS, Zimmermann GA, McEver RP (1997) Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J Biol Chem* 272: 28750-28756
- Hirabayashi J und Kasai K** (1993) The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3: 297-304
- Hiramatsu Y**, Moriyama H, Kiyoi T, Tsukida T, Inoue Y, Kondo H (1998) Studies on Selectin Blockers. 6. Discovery of Homologous Fucose Sugar Unit Necessary for E-Selectin Binding. *J Med Chem* 41: 2302-2307
- Hochmuth RM**, Mohandas N, Blackshear PL (1993) Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys J* 13: 747-762
- Hodge C** (1983) Amylase in the saliva and gastric aspirates of the premature infants: its potential role in glucose polymer hydrolysis. *Pediatr Res* 17: 998
- Hoke D**, Mebius RE, Dybdal N, Dowbenko D, Gribling P, Kyle C, Baumhueter RS, Watson SR (1995) Selective modulation of the expression of L-selectin ligands by an immune response. *Curr Biol* 5: 670-678

- Holmgren J**, Svennerholm AM, Lindblad M (1983) Receptor-like glycocompounds in human milk that inhibit classical and El Tor *Vibrio cholerae* cell adherence (hemagglutination). *Infect Immun* 39: 147-154
- Hsueh W**, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, de Plaen IG, Gonzalez-Crussi (2003) Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediat Dev Pathol* 6: 6-23
- Hsueh W**, Gonzalez-Crussi F, Arroyave SL (1986) Release of leukotriene C4 by isolated, perfused rat small intestine in response to platelet-activating factor. *J Clin Invest* 78: 108-114
- Hsueh W**, Gonzalez-Crussi F, Arroyave SL (1988) Sequential release of leukotrienes and norepinephrine in rat bowel after platelet-activating factor. A mechanistic study of platelet-activating factor-induced bowel necrosis. *Gastroenterology* 94: 1412-1418
- Hsu-Lin S**, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B (1984) A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. *J Biol Chem* 259: 9121-9126
- Hu Y**, Kiely JM, Szente BE, Rosenzweig A, Gimbrone MA (2000) E-selectin-dependent signaling via the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular endothelial cells. *J Immunol* 165: 2142-2148
- Huang L**, Tan X, Crawford SE, Hsueh W (1994) Platelet-activating factor and endotoxin induce tumor necrosis factor gene expression in rat intestine and liver. *Immunology* 83: 65-69
- Hynes RO** (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25
- Imai Y**, Lasky LA, Rosen SD (1993) Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature* 361: 555-557
- Jacob GS**, Kirmaier C, Abbas SZ, Howard SC, Steininger CN, Welply JK, Scudder P (1995) Binding of sialyl Lewis x to E-selectin as measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* 34: 1210-1217
- Jaffe EA**, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756
- Jantusch BA**, Criss VR, O'Donnell R, Wiedermann BL, Majid M, Rushton HG, Shirey RS, Luban NL (1994) Association of Lewis blood group phenotypes with urinary tract infection in children. *J Pediatr* 124: 863-868
- Johnson PH und Watkins WM** (1992) Purification of the Lewis blood-group gene associated alpha-3/4-fucosyltransferase from human milk: an enzyme transferring fucose primarily to type 1 and lactose-based oligosaccharide chains. *Glycoconj J* 9: 241-249
- Johnson-Leger C**, Aurrand-Lions M, Imhof BA (2000) The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* 113: 921-933

- Johnston GI**, Cook RG, McEver RP (1989) Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 56: 1033-1044
- Jones DA**, Abbassi OA, McIntire LV, McEver RP, Smith CW. P-selectin supports leukocyte rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J* 65: 1560-1569
- Jones DA**, Smith CW, McIntire LV (1995) Effects of fluid shear stress on leukocyte adhesion to endothelial cells. In: Granger DN und Schmid-Schönbein GW (Hrsg.) Physiology and pathophysiology of leukocyte adhesion. 1. Aufl. New York, Oxford: Oxford University Press: 148-168
- Jones WM**, Watts GM, Robinson MK, Vestweber D, Jutila M (1997) Comparison of E-selectin-binding glycoprotein ligands on human lymphocytes, neutrophils, and bovine gammadelta T cells. *J Immunol* 159: 3574-3583
- Jung U und Ley K** (1999) Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol* 162: 6755-6762
- Jung U**, Bullard DC, Tedder TF, Ley K (1996) Velocity differences between L- and P-selectin-dependent neutrophil rolling in venules of mouse cremaster muscle in vivo. *Am J Physiol* 271: H2740-H2747
- Jung U**, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K (1998) Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest* 102: 1526-1533
- Jung TW**, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S (1986) Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related blood cells. *Blood* 67: 629-636
- Jutila MA**, Rott L, Berg EL, Butcher EC (1989) Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and Mac-1. *J Immunol* 143: 3318-3324
- Kaplanski G**, Porat R, Aiura K, Erban JK, Gelfand JA, Dinarello CA (1993) Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin-8 in vitro via an interleukin-1 mediated event. *Blood* 81: 2492-2495
- Karmann K**, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS (1995) CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4342-4346
- Kawamura N**, Imanishi N, Koike H, Nakahara H, Phillips L, Morooka S (1995) Lipoteichoic acid-induced neutrophil adhesion via E-selectin to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Biochem. Biophys Res Commun* 217: 1208-1215

- Kelm S**, Brossmer R, Isecke R, Gross HJ, Strenge K, Schauer R (1998) Functional groups of sialic acids involved in binding to soglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues. *Eur J Biochem* 255: 663-672
- Kemler R** (1993) From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9: 317-321
- Kien LC** (1996) Digestion, absorption and fermentation of carbohydrates in the newborn. *Clin Perinatol* 23: 211-227
- Kikly KK**, Bochner BS, Freeman SD, Tan KG, Gallagher KT, D'alessio KJ, Holmes SD, Abrahamson JA, Erickson-Miller CL, Murdock PR, Tachimoto H (2000) Identification of SAF-2, a novel siglec expressed on eosinophils, mast cells, and basophils. *J Allergy Clin Immunol* 105: 1093-1100
- Kikuta A und Rosen SD** (1994) Localization of ligands for L-selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cell by colloidal gold. *Blood* 84: 3766-3775
- Kishimoto TK**, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC (1989) Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245: 1238-1241
- Kishimoto TK**, Warnock RA, Jutila MA, Butcher EC, Lane C, Anderson DC, Smith CW (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
- Klausner RD**, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116: 1071-1080
- Klinger MH** (1997) Platelets and inflammation. *Anat Embryol* 196: 1-11
- Kobata A** (1972) Isolation of oligosaccharides from human milk. *Methods Enzymol* 28: 262-271
- Kobata A**, Ginsburg V, Tsuda M (1969) Oligosaccharides of human milk. I. Isolation and characterization. *Arch Biochem Biophys* 130: 509-513
- Kojima N**, Handa K, Newman W, Hakomori S (1992) Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 1288-1295
- Kornelisse RF**, Hazelzet JA, Hop WC, Spanjaard L, Suur MH, van der Voort E, de Groot R (1997) Meningococcal septic shock in children: clinical and laboratory features, outcome, and development of a prognostic score. *Clin Infect Dis* 25: 640-646
- Kubes P**, Arfors KE, Granger DN (1991) Platelet-activating factor-induced mucosal dysfunction: role of oxidants and granulocytes. *Am J Physiol* 260: G965-G971

- Kubes P**, Niu XF, Smith CW, Kehrli ME Jr, Reinhardt PH, Woodman RC (1995) A novel beta 1-dependent adhesion pathway on neutrophils: a mechanism invoked by dihydrocytochalasin B or endothelial transmigration. *FASEB J* 9: 1103-1111
- Kubes P**, Suzuki M, Granger DN (1990a) Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: role of adherent leukocytes. *Am J Physiol* 258:G158-163
- Kubes P**, Suzuki M, Granger DN (1990b) Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 259:G859-64
- Kuitunen OOM**, Savilahti E, Sarnesto A (1994) Human α -lactalbumin and bovine β -lactoglobulin absorption in preterm infants. *Pediatr Res* 34: 344-347
- Kumazuki T und Yoshida A** (1984) Biochemical evidence that secretor gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4193-4197
- Kunkel EJ und Ley K** (1996) Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 79: 1196-1204
- Kunz C und Rudloff S** (1993) Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr* 82: 903-912
- Kunz C**, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Ann Rev Nutr* 20: 699-722
- Kunz C**, Rudloff S, Hintelmann A, Pohlentz G, Egge H (1996) High-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *J Chromatogr B* 685: 211-221
- Kunz C**, Rudloff S, Schad W, Braun D (1999) Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br J Nutr* 82: 391-399
- Kuwabara I und Liu FT** (1996) Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol* 156: 3939-3944
- Kwak BR**, Pepper MS, Gros DB, Meda P (2001) Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. *Mol Biol Cell* 12: 831-845
- Labow MA**, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, Bertko R, Knaack PA, Terry RW, Harbison ML (1994) Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity* 1: 709-720
- Lampugnani MG**, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E (1992) A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 118: 1511-1522
- Larbi KY**, Dangerfield JP, Culley FJ, Marshall D, Haskard DO, Jose PJ, Williams TJ, Nourshargh S (2003) P-selectin mediates IL-13-induced eosinophil transmigration but not eotaxin generation in vivo: a comparative study with IL-4-elicited responses. *J Leukoc Biol* 73: 65-73

- Laroux FS und Grisham MB** (2001). Immunological basis of inflammatory bowel disease: role of the microcirculation. *Microcirculation* 8:283-301
- Larson E** Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B (1989) PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59: 305-312
- Larson E**, Palabrica T, Sajer S, Gilbert GE, Wagner DD, Furie BC, Furie B (1990) PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* 63: 467-474
- Larson RS und Springer TA** (1990) Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114: 181-217
- Lasky LA**, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD (1992) An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 69: 927-938
- Lasky LA**, Singer MS, Yednock TA, Dowbenko D, Fennie C, Rodriguez H, Nguyen T, Stachel S, Rosen SD (1989) Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* 56: 1045-1055
- Laudanna C und Constantin G** (2003) New models of intravital microscopy for analysis of chemokine receptor-mediated leukocyte vascular recognition. *J Immunol Methods* 273: 115-123
- Laudanna C**, Constantin G, Baron P, Scarpini E, Scarlato G, Cabrini C, Dehecchi C, Rossi F, Cassatella MA, Berton G (1994) Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils: evidence for the role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem* 269: 4021-4026
- Lawrence MB und Springer TA** (1993) Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol* 151: 6338-6346
- Lawrence MB**, McIntire LV, Eskin SG (1987) Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* 70: 1284-1290
- Lee RT und Lee YC** (2000) Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj J* 17: 543-551
- Lee YC und Lee RT** (1995) Carbohydrate-protein interactions: Basis of glycobiology. *Acc Chem Res* 28: 321-327
- Lenter M**, Levinovitz A, Isenmann S, Vestweber D (1994) Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J Cell Biol* 125: 471-481
- Leprince C**, Draves KE, Geahlen RL, Ledbetter JA, Clark EA (1993) CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3236-3240

- Lewinsohn DM**, Bargatze RF, Butcher EC (1987) Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J Immunol* 138: 4313-4321
- Ley K** (1996) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* 32: 733-742
- Ley K**, Allietta M, Bullard DC, Morgan S (1998) Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ Res* 1998 3: 287-294
- Ley K**, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD (1991) Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 77: 2553-2555
- Li F**, Wilkins PP, Crawley S, Weistein J, Cummings RD, McEver RP (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 N**, Goodall AH, Hjendahl P (1997) A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leukocyte aggregates. *Br J Haematol* 99: 808-816
- Li SH**, Burns DK, Rumberger JM, Presky DH, Wilkinson VL, Anostario M, Wolitzky BA, Norton CR, Familletti PV, Kim KJ, Goldstein AL, Cox DC, Huang KS (1994) Consensus repeat domains of E-selectin enhance ligand binding. *J Biol Chem* 269: 4431-4437
- Lloyd KO** (2000) The chemistry and immunochemistry of blood group A, B, H, and Lewis antigens: past, present and future. *Glycoconj J* 17: 531-541
- Loike JD**, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, Wright SD, Silverstein SC (1991) CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N-terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1044-1048
- Lorenzon P**, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F, Dobrina A (1998) Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol* 142: 1381-1391
- Lowell CA und Berton G** (1998) Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7580-7584
- Lowell CA und Berton G** (1999) Integrin signal transduction in myeloid leukocytes. *J Leukoc Biol* 65: 313-320
- Lu H**, Smith CW, Perrard J, Bullard D, Tang L, Shappell SB, Entman ML, Beaudet AL, Ballantyne CM (1997) LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J Clin Invest* 99: 1340-1350
- Lübke T**, Marquardt T, Etzioni A, Hartmann E, von Figura K, Körner C (2001) Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorder of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat Genet* 28: 73-76

- Lübke T**, Marquardt T, von Figura K, Körner C (1999) A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the Golgi. *J Biol Chem* 274: 25986-25989
- Lucas A und Cole TJ** (1990) Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 336: 1519-1523
- Lühn K**, Marquardt T, Harms E, Vestweber D (2001) Discontinuation of fucose therapy in LADII causes rapid loss of selectin ligands and rise of leukocyte counts. *Blood* 97: 330-332
- Luscinskas FW**, Ding H, Lichtman AH (1995) P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4+ T lymphocytes on tumor necrosis factor alpha-activated vascular endothelium under flow. *J Exp Med* 181: 1179-1186
- Luscinskas FW**, Ding H, Tan P, Cumming D, Tedder TF, Gerritsen ME (1996) L- and P-selectin, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol* 156: 326-335
- Ma XL**, Weyrich AS, Lefer DJ, Buerke M, Albertine KH, Kishimoto TK, Lefer AM (1993) Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 88: 649-58
- Maksymowych AB und Simpson LL** (1998) Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human carcinoma cells. *J Biol Chem* 273: 21959-21957
- Marchesi VT** (1966) Mechanisms of cell migration and macromolecule transport across the walls of blood vessels. *Gastroenterology* 51: 875-892
- Marquardt T**, Brune T, Lühn K, Zimmer KP, Korner C, Fabritz L, van der Werft N, Vormoor J, Freeze HH, Louwen F, Biermann B, Harms E, von Figura K, Vestweber D, Koch HG (1999a) Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism. *J Pediatr* 134: 681-688
- Marquardt T**, Lühn K, Srikrishna G, Freeze HH, Harms E, Vestweber D (1999b) Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose. *Blood* 94: 3976-3985
- Marquis GS**, Penny ME, Diaz JM, Marin RM (2002) Postpartum consequences of an overlap of breastfeeding and pregnancy: reduced breast milk intake and growth during early infancy. *Pediatrics* 109: 1-8
- Martin-Padura I**, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142: 117-127
- Mason RR und Weiner RS** (1985) Application of the Beckman JE6-B Elutriator System® in the isolation of human monocyte subpopulations. *Scand J Haematol* 34: 5-8

- Mathew EC**, Shaw JM, Bonilla FA, Law SK, Wright DA (2000) A novel point mutation in CD18 causing the expression of dysfunctional CD11/CD18 leukocyte integrins in a patient with leukocyte adhesion deficiency (LAD). *Clin Exp Immunol* 121: 133-138
- Matsumoto R**, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, Stevens RL, Hirashima M (1998) Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemotractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem* 273: 16976-16984
- Mayadas TN**, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74: 541-554
- Mayer K**, Merfels M, Muhly-Reinholz M, Gokorsch S, Rosseau S, Lohmeyer J, Schwarzer N, Krull M, Suttrop N, Grimminger F, Seeger W (2002) Omega-3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H811-8
- Mayrovitz HN** (1992) Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol* 262: H157-161
- McEver RP und Cummings RD** (1997) Role of PSGL-1 to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 100: 485-492
- Michishita M**, Videm V, Arnaout MA (1993) A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta-2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* 72: 857-867
- Miller BA**, Antognetti G, Springer TA (1985) Identification of cell surface antigens present on murine hematopoietic stem cells. *J Immunol* 134: 3286-4290
- Miller LJ**, Schwarting R, Springer TA (1986) Regulated expression of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family during leukocyte differentiation. *J Immunol* 137: 2891-2900
- Milstone DS**, Fukumura D, Padgett RC, O'Donnell PE, Davis VM, Benavidez OJ, Monsky WL, Melder RJ, Jain RK, Gimbrone MA (1998) Mice lacking E-selectin show normal numbers of rolling leukocytes but reduced leukocyte stable arrest on cytokine-activated microvascular endothelium. *Microcirculation* 5:153-171
- Mirelman D** (1986) Microbial lectins and agglutinins: Properties and biological activities. New York, Wiley
- Modur V**, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM (1997) Oncostatin M is a proinflammatory mediator: in vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest* 100: 158-168
- Montreuil J und Mullet S** (1960) Étude des variations des constituants glucidiques du lait de femme au cours de la lactation. *Bull Soc Chim Biol* 42: 365-377

- Moore KL**, Eaton SF, Lyons DE, Lichenstein HS, Cummings RD, McEver RP (1994) The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 269: 23318-23327
- Moore KL**, Patel KD, Bruehl RE, Li L, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP (1995) P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 128: 661-667
- Moore KL**, Stults NL, Diaz S, Smith DL, Cummings RD, Varki A, McEver RP (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 118: 445-456
- Morecroft JA**, Hamilton PA, Holmes SJK (1994) Necrotizing enterocolitis - multisystem organ failure of the newborn? *Acta Paediatr* 396 Suppl: 21-23
- Morgan WTJ und Watkins WM** (2000) Unrevealing the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. *Glycoconj J* 17: 501-530
- Moro E** (1900) Morphologische und bakteriologische Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings: Die Bakterienflora des normalen Frauenmilchstuhls. *Jahrbuch Kinderh* 61: 686-734
- Moya FR**, Eguchi H, Thao B, Furukawa M, Sfeir J, Osorio M, Ogawa Y, Johnston JM (1994) Platelet-activating factor acetylhydrolase in term and preterm human milk: a preliminary report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 19: 236-239
- Munday J**, Kerr S, Ni J, Cornish AL, Zhang JQ, Nicoll G, Floyd H, Mattei MG, Moore P, Liu D, Crocker PR (2001) Identification, characterisation and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor. *Biochem J* 355: 489-497
- Musemeche C**, Caplan M, Hsueh W, Sun X, Kelly A (1991) Experimental necrotizing enterocolitis: the role of polymorphonuclear neutrophils. *J Pediatr Surg* 26: 1047-9
- Nash GB** (1994) Adhesion between neutrophils and platelets: a modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res* 74: S3-S11
- Nelson RM**, Dolich S, Aruffo A, Cecconi O, Bevilacqua MP (1993) Higher-affinity oligosaccharide ligands for E-selectin. *J Clin Invest* 91:1157-1166
- Nelson RM**, Dolich S, Aruffo A, Cecconi O, Bevilacqua MP (1993) Higher-affinity oligosaccharide ligands for E-selectin. *J Clin Invest* 91: 1157-1166
- Nguyen TJ**, Evans DP, Galvan M, Pace KE, Leitenberg D, Bui TN, Baum LG (2001) CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2-O-glycans. *J Immunol* 167: 5697-5707
- Nicoll G**, Ni J, Liu D, Klenerman P, Munday J, Dubock S, Mattei MG, Crocker PR (1999) Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes. *J Biol Chem* 274: 34089-34095

- Nitschke L**, Carsetti R, Ocker B, Kohler G, Lamers MC (1997) CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 7: 133-143
- Nitschke L**, Floyd H, Ferguson DJ, Crocker PR (1999) Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J Exp Med* 189: 1513-1518
- Noble KE**, Panayiotidis P, Collins PW, Hoffbrand AV, Yong KL (1996) Monocytes induce E-selectin gene expression in endothelial cells: role of CD11/CD18 and extracellular matrix proteins. *Eur J Immunol* 26: 2944-2951
- Norgard KE**, Moore KL, Diaz S, Stults S, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A (1993) Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 268:12764-12774
- Noti JD**, Johnson AK, Dillon JD (2000) Structural and functional characterization of the leukocyte intergrin gene CD11d. *J Biol Chem* 275: 8959-8969
- Nowicki P** (1990) Intestinal ischemia and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 117: S14-S19
- Obermeier S**, Rudloff S, Pohlentz G, Lentze MJ, Kunz C (1999) Secretion of ¹³C-labelled oligosaccharides into human milk and infant's urine after an oral [¹³C]galactose load. *Isotopes Environ Health Stud* 35: 119-125
- Ochieng J**, Leite-Browning ML, Warfield P (1998) Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 788-791
- Ofek I und Sharon N** (1990) Adhesins as lectins: specificity and role in infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 151: 91-113
- O'Keefe TL**, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS (1996) Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* 274: 798-801
- Olofsson AM**, Arfors KE, Ramezani L, Wolitzky BA, Butcher EC, von Andrian UH (1994) E-selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules. *Blood* 84: 2749-2758
- Osborn L** (1990) Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 62: 3-6
- Ott I**, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A (1996) Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 94: 1239-1246
- Pace KE**, Lee C, Stewart PL, Baum LG (1999) Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 163: 3801-3811
- Palmantier R und Borgeat P** (1991) Transcellular metabolism of arachidonic acid in platelets and polymorphonuclear leukocytes activated by physiological agonists: enhancement of leukotriene B4 synthesis. *Adv Exp Med Biol* 314: 73-89

- Parkkinen J und Finne J** (1987) Isolation of sialyl oligosaccharides and sialyl oligosaccharide phosphates from bovine colostrum and human urine. *Methods Enzymol* 138: 289-300
- Parkkinen J, Finne J, Achtmann M, Vaisanen V, Korhonen TK** (1983) E. coli strains binding neuraminyl 2-3 galactosides. *Biochem Biophys Res Commun* 111: 456-461
- Patel N, Brinkman-Van der Linden EC, Altmann SW, Gish K, Balasubramanian S, Timas JC, Peterson D, Bell MP, Bazan JF, Varki A, Kastelein RA** (1999) OB-BP1/Siglec-6. A leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* 274: 22729-22738
- Patel TP, Goelz SE, Lobb RR, Parekh RB** (1994) Isolation and characterization of natural protein-associated carbohydrate ligands for E-selectin. *Biochemistry* 33: 14815-14824
- Pavalko FM, Walker DM, Graham L, Goheen M, Doerschuk CM, Kansas GS** (1995) The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin. *J Cell Biol* 129: 1155-64
- Peaker CJ und Neuberger MS** (1993) Association of CD22 with the B cell antigen receptor. *Eur J Immunol* 23: 1358-1363
- Perry MA und Granger DN** (1991) Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J Clin Invest* 87: 1798-1804
- Peters MJ, Dixon G, Kotowicz KT, Hatch DJ, Heyderman RS, Klein NJ** (1999) Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br J Haematol* 106: 391-399
- Peters MJ, Hyderman RS, Hatch DJ, Klein NJ** (1997) Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 209: 125-135
- Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC** (1990) ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* 250(4984):1130-1132
- Phillips ML, Schwartz BR, Etzioni A, Bayer R, Ochs HD, Paulson JC, Harlan JM** (1995) Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2. *J Clin Invest* 96: 2898-2906
- Piccardoni O, Sideri R, Manarini S, Piccoli A, Martelli N, de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V** (2001) Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood* 98: 108-116
- Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC** (1991) ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 349: 796-799
- Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC** (1991) The neutrophil LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 66: 921-933

- Pigott R**, Needham LA, Edwards RM, Walker C, Power C (1991) Structural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leukocyte adhesion molecule-1 using a panel of monoclonal antibodies. *J Immunol* 147: 130-135
- Pober JS**, Lapierre LA, Stolpen AH, Brock TA, Springer AT, Fiers W, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Gimbrone MA (1987) Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 138: 3319-3324
- Pober JS**, Slowik MR, de Luca LG, Ritchie AJ (1993) Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 150: 5114-4123
- Poe JC**, Fujimoto M, Jansen PJ, Miller AS, Tedder TF (2000) CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *J Biol Chem* 275: 17420-17427
- Pouyani T und Seed B** (1995) PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfatation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell* 83: 333-343
- Puri KD**, Finger EB, Springer TA (1997) The faster kinetics of L-selectin than of E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength. *J Immunol* 158: 405-413
- Qu XW**, Rozenfeld RA, Huang W, Bulkley GB, Hsueh W (1999) The role of xanthine oxidase in platelet-activating factor induced intestinal injury in the rat. *Gut* 44: 203-211
- Rabinovich GA** (1999) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Diff* 6: 711-721
- Rabinovich GA**, Ariel A, Hershkovich R, Hirabayashi J, Kasai K, Lider O (1999a) Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and pro-inflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 97: 100-106
- Rabinovich GA**, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y (1999b) Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 190: 385-397
- Rabinovich GA**, Rubinstein N, Fainboim L (2002) Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol* 71: 741-752
- Rabinovich GA**, Rubinstein N, Matar P, Rozados V, Gervasoni S, Scharovsky OG (2002) The anti-metastatic effect of a single low-dose cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. *Cancer Immunol Immunother* 50: 587-603
- Rainger GE**, Wautier MP, Nash GB, Wautier JL (1996) Prolonged E-selectin induction by monocytes potentiates the adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells. *Br J Haematol* 92: 192-199

- Razi N und Varki A** (1998) Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7469-7474
- Razi N und Varki A** (1999) Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. *Glycobiology* 9: 1225-1234
- Rinder HM**, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR (1991) Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 78: 1760-1769
- Rodriguez-Palmero M**, Koletzko B, Kunz C, Jensen R (1999) Nutritional and biochemical properties of human milk: II Lipids, Micronutrients, and Bioactive Factors. *Clin Perinatol* 26(2): 335-359
- Rorive S**, Belot N, Decaestecker C, Lefranc F, Gordower L, Micik S, Maurage CA, Kaltner H, Ruchoux MM, Danguy A, Gabius HJ, Salmon I, Kiss R, Camby I (2001) Galectin-1 highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into brain parenchima. *Glia* 33: 241-255
- Rosenbaum JT**, Planck SR, Martin TM, Crane I, Xu H, Forrester JV (2002) Imaging ocular immune responses by intravital microscopy. *Int Rev Immunol* 21: 255-272
- Rubin LL** (1992) Endothelial cells: adhesion and tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 4: 830-833
- Rudloff S**, Pohlentz G, Diekmann L, Egge H, Kunz C (1996) Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr* 85: 598-603
- Rudloff S**, Stefan C, Pohlentz G, Kunz C (2002) Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk. *Eur J Nutr* 41: 85-92
- Sabharwal H**, Nilsson B, Chester MA, Lindh F, Gronberg G, Sjoblad S, Lundblad A (1988a) Oligosaccharides from faeces of a blood-group B, breast-fed infant. *Carbohydr Res* 178:145-154
- Sabharwal H**, Nilsson B, Chester MA, Sjoblad S, Lundblad A (1984) Blood group specific oligosaccharides from faeces of a blood group A breast-fed infant. *Mol Immunol* 21: 1105-1112
- Sabharwal H**, Nilsson B, Gronberg G, Chester MA, Dakour J, Sjoblad S, Lundblad A (1988b) Oligosaccharides from feces of preterm infants fed on human milk. *Arch Biochem Biophys* 265: 390-406
- Sabharwal H**, Sjoblad S, Lundblad A (1991a) Affinity chromatographic identification and quantitation of blood group A-active oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 12: 474-479
- Sabharwal H**, Sjoblad S, Lundblad A (1991b) Sialylated oligosaccharides in human milk and faeces of preterm, full-term, and weaning infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 12: 480-484
- Sacchettini JC**, Baum LG, Brewer CF (2001) Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry* 40: 3009-3015

- Sako D**, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM Ahern TJ, Furie B, Cumming DA, Larson GR (1993) Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75: 1179-1186
- Sako D**, Comess KM, Barone KM, Camphausen RT, Cumming DA, Shaw GD (1995) A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* 83: 323-331
- Sanchez-Madrid F**, Nagy J, Robbins E, Simon P, Springer TA (1983) A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha subunits and a common beta subunit: the lymphocyte function associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med* 158: 1785-1803
- Sanders WE**, Wilson RW, Ballabtyne CM, Beaudet AL (1992) Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 80: 795-800
- Sano H**, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT (2000) Human galectin-3 is a novel chemoattract for monocytes and macrophages. *J Immunol* 165: 2156-2165
- Santucci L**, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A (2000) Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 31: 399-406
- Sarafian V**, Jadot M, Fiodart JM, Letesson JJ, Van den Brule F, Castronovo V, Wattiaux R, Coninck SW (1998) Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int J Cancer* 75: 105-111
- Sato S**, Miller AS, Inaoki M, Bock CB, Jansen PJ, Tang ML, Tedder TF (1996) CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction: altered signaling in CD22-deficient mice. *Immunity* 5: 551-562
- Scharffetter-Kochanek K**, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, Beaudet AL (1998) Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 188: 119-131
- Scheinfeld J**, Schaeffer AJ, Cordon-Cardo C, Rogatko A, Fair WR (1989) Association of the Lewis blood-group phenotype with recurrent urinary tract infections in women. *N Engl J Med* 320: 773-777
- Schmelz M und Franke WW** (1993) Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *Eur J Cell Biol* 61: 274-289

- Schmits R**, Kundig TM, Baker DM, Shumaker G, Simard JJ, Duncan G, Wakeham A, Shahinian A, van der Heiden A, Bachmann MF, Ohashi PS, Mak TW, Hickstein DD (1996) LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med* 183: 1415-1426
- Schmuke JJ und Welply JK** (1995) A method for measuring leukocyte rolling on the selectins. *Anal Biochem* 226: 197-201
- Schon MP**, Krahn T, Schon M, Rodriguez ML, Antonicek H, Schultz JE, Ludwig RJ, Zollner TM, Bischoff E, Bremm KD, Schramm M, Henninger K, Kaufmann R, Gollnick HP, Parker CM, Boehncke WH (2002) Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. *Nat Med* 8:366-72
- Schönfeld H** (1926) Über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile von Frauenmilch zur Bifidusflora. *Jahrbuch Kinderh* 113: 19-60
- Sfikakis PP und Tsokos GC** (1995) Lymphocyte adhesion molecules in autoimmune rheumatic diseases: basic issues and clinical expectations. *Clin Exp Rheumatol* 13: 763-77
- Sharon N** (1993) Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends Biochem Sci* 18: 221-226
- Sharon N und Ofek I** (2000) Safe as mother's milk: Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconj J* 17: 659-664.
- Shimizu Y**, Shaw S, Graber N, Gopal TV, Horgan KJ, van Seventer GA, Newman W (1991) Activation-independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM-1. *Nature* 349: 799-802
- Siegelman M und Weissman I** (1989) Homolog of mouse lymph node homing receptor: evolutionary conservation at tandem cell interaction domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5562-5566
- Siegelman MH**, van de Rijn M, Weissman IL (1989) Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science* 243: 1165-1172
- Simanek EE**, McGarvey GJ, Jablonowski JA, Wong CH (1998) Selectin-Carbohydrate Interactions: From Natural Ligands to Designed Mimics. *Chem Rev* 98: 833-862
- Simmons DL**, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 148: 267-271
- Simon SI**, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK, Lynam EB, Sklar LA, Smith CW (1995) L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) β 2 integrin. *J Immunol* 155: 1502-1514

- Simon SI**, Hu Y, Vestweber D, Smith CW (2000) Neutrophil tethering on E-selectin activates β_2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol* 164: 4348-4358
- Singer MS und Rosen SD** (1996) Purification and quantification of L-selectin-reactive GlyCAM-1 from mouse serum. *J Immunol Methods* 196: 153-161
- Sligh JE**, Hurwitz MY, Zhu CM, Anderson DC, Beaudet AL (1992) An initiation codon mutation in CD18 in association with the moderate phenotype of leukocyte adhesion deficiency. *J Biol Chem* 267:714-718
- Smith CW**, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC (1989) Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 83: 2008-2017
- Smith KG**, Tarlinton DM, Doody GM, Hibbs ML, Fearon DT (1998) Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *J Exp Med* 187: 807-811
- Smolen JE**, Petersen TK, Koch C, O'Keefe SJ, Hanlon WA, Seo S, Pearson D, Fossett MC, Simon SI (2000) L-selectin signaling of neutrophil adhesion and degranulation involves p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 15876-15884
- Spangenberg P**, Redlich H, Bergmann I, Lösche W, Götzrath M, Kehrel B (1993) The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost* 70: 514-521
- Spertini O**, Cordey AS, Monai N, Giuffre L, Schapira M (1996) P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol* 135: 523-531
- Sponcer E**, Fukuda M, Klock JC, Oates JE, Dell A (1984) Isolation and characterization of polyfucosylated lactosaminoglycan from human granulocytes. *J Biol Chem* 259: 4792-4801
- Springer TA** (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314
- Sriramarao P**, Anderson W, Wolitzky BA, Broide DH (1996) Mouse bone marrow-derived mast cells roll on P-selectin under conditions of flow in vivo. *Lab Invest* 74: 634-643
- Sriramarao P**, von Andrian UH, Butcher EC, Bourdon MA, Broide DH (1994) L-selectin and very late antigen-4 integrin promote eosinophil rolling at physiological shear rates in vivo. *J Immunol* 153: 4238-4246
- Stahl B**, Thurl S, Henker J, Siegel M, Finke B, Sawatzki G (2001) Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Adv Exp Med Biol* 501: 299-306

- Stahl B**, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F, Steup M, Sawatzki G (1994) Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 223: 218-226
- Stahn R**, Schäfer H, Kernchen F, Schreiber J (1998) Multivalent sialyl Lewis x ligands of definite structures as inhibitors of E-selectin mediated cell adhesion. *Glycobiology* 8: 311-319
- Stamper HB und Woodruff JJ** (1976) Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med* 144: 828
- Staunton DE**, Dustin ML, Springer TA (1989) Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339: 61-64
- Steeber DA**, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Teder TF (1997) Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J Immunol* 159: 952-963
- Stoll J**, Kanto WP, Glass R, Nahmias AJ, Brann AW (1980) Epidemiology of necrotizing enterocolitis: a case control study. *J Pediatr* 94: 447-451
- Stoolman LM und Rosen SD** (1983) Possible role for cell surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. *J Cell Biol* 96: 722-729
- Stoolman LM**, Tenforde TS, Rosen SD (1984) Phosphomannosyl receptors may participate in the adhesive interaction between lymphocytes and high endothelial venules. *J Cell Biol* 99: 1535-1540
- Subramaniam M**, Koedam JA, Wagner DD (1993) Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 4: 791-801
- Sun XM**, Qu, XW, Huang W, Granger DN, Bree M, Hsueh (1996) Role of leukocyte beta 2-integrin in PAF-induced shock and intestinal injury. *Am J Physiol* 270: G184-G190
- Sunderkötter C**, Steinbrink K, Henseleit U, Bosse R, Schwarz A, Vestweber D, Sorg C (1996) Activated T cells induce expression of E-selectin in vitro and in an antigen-dependent manner in vivo. *Eur J Immunol* 26: 1571-1579
- Takada A**, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R (1993) Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis a and sialyl Lewis x to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Anticancer Res* 53: 354-360
- Tamatani T**, Suematsu M, Tezuka K, Hanzawa N, Tsuji T, Ishimura Y, Kannagi R, Toyoshima S, Homma M (1995) Recognition of consensus CHO structure in ligands for selectins by novel antibody against sialyl Lewis X. *Am J Physiol* 269: H1282-H1287

- Tan XD**, Chang H, Qu XW, Caplan M, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W (2000) PAF increases mucosal permeability in rat intestine via tyrosine phosphorylation of E-cadherin. *Br J Pharmacol* 129: 1522-1529
- Theoret JF**, Bienvenu JG, Kumar A, Merhi Y (2001) P-Selectin Antagonism with Recombinant P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (rPSGL-Ig) Inhibits Circulating Activated Platelet Binding to Neutrophils Induced by Damaged Arterial Surfaces. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 658-664
- Thoma G**, Kinzy W, Bruns C, Patton JT, Magnani JL, Banteli R (1999) Synthesis and Biological Evaluation of Potent e-Selectin Antagonist. *J Med Chem* 42: 4909-4913
- Thomas VH**, Yang Y, Rice KG (1999) *In vivo* ligand specificity of E-selectin binding to multivalent Sialyl Lewis^x N-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 274: 19035-19040
- Thornhill MH und Haskard DO** (1990) IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor, or IFN- γ . *J Immunol* 145: 865-872
- Thurl S**, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G (1997) Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj J* 14: 795-799
- Tissier H** (1990) Recherches sur la flore intestinale des nourissons (etats normale et pathologique). Diss. Université de Paris
- Tjoelker LW**, Wilder C, Eberhardt C, Stafforino DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA (1995) Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 374: 549-553
- Tonnesen MG**, Anderson DC, Springer TA, Knedler A, Avdi N, Henson PM (1989) Adherence of neutrophils to cultured human microvascular endothelial cells: stimulation by chemotactic peptides and lipid mediators and dependence upon Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family. *J Clin Invest* 83: 637-646
- Tu L**, Chen A, Delahunty MD, Moore KL, Watson SR, McEver RP, Tedder TF (1996) L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity. *J Immunol* 157: 3995-4004
- Tyrrell D**, James P, Rao N, Foxall C, Abbas S, Dasgupta F, Nashed M, Hasegawa A, Kiso M, Asa D (1991) Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10372-10376
- Uauy R**, Fanaroff AA, Korones S, Phillips EA, Phillips JB, Wright LL (1991) Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: biodemographic and clinical correlates. *J Pediatr* 119: 630-638

- Ushiyama S**, Laue TM, Moore KL, Erickson HP, McEver RP (1993) Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin. *J Biol Chem* 268: 15229-15237
- Vachino G**, Chang XJ, Veldman GM, Kumar R, Sako D, Fouser LA, Berndt MC, Cumming DA (1995) P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *J Biol Chem* 270: 21966-21974
- Valone FH und Epstein LB** (1988) Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1-beta, tumor necrosis factor, or IFN-gamma. *J Immunol* 141: 3945-3950
- van den Brule FA**, Waltregny D, Castronovo V (2001) Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J Pathol* 193: 80-87
- van der Merwe PA**, Crocker PR, Vinson M, Barclay AN, Schauer R, Kelm S (1996) Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22. *J Biol Chem* 271: 9273-9280
- Varki A** (1997) Selectin ligands: Will the real ones please stand up? *J Clin Invest* 99: 158-162
- Varki A** (1999) Discovery and classification of animal lectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko J, Freeze HH, Hart G, Marth J (Hrsg.) *Essentials of Glycobiology*. 1. Aufl. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 333-343
- Vestweber D und Blanks JE** (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 79: 181-213
- Vestweber D und Marquardt T** (2000) Fucose supplementation in LAD II. *Blood* 95: 3642-43
- Vilcek J und Lee TH** (1991) Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266: 7313-7316
- Villalpando S und Hamosh M** (1998) Early and late effects of breast-feeding: Does breast-feeding really matter? *Biol Neonate* 74: 177-191
- Vitale C**, Romagnani C, Falco M, Ponte M, Vitale M, Moretta A, Bacigalupo A, Moretta L, Mingari MC (1999) Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15091-15096
- Viverge D**, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Bonnet H, Solere M (1985) Variations of lactose and oligosaccharides in milk from women of blood types secretor A or H, secretor Lewis, and secretor H/nonsecretor Lewis during the course of lactation. *Ann Nutr Metab* 29: 1-11
- Viverge D**, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Solere M (1990a) Discriminant carbohydrate components of human milk according to donor secretor types. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 11: 365-370

- Viverge D**, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Solere M (1990b) Variations in oligosaccharides and lactose in human milk during the first week of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 11: 361-364
- Vleeschauwer M**, Vaillancourt M, Goudreau N, Guindon Y, Gravel D (2001) Design and Synthesis of a New Sialyl Lewis X Mimetic: How Selective Are the Selectin Receptors? *Bioorg Med Chem Lett* 11: 1109-1112
- von Andrian UH**, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7538-7542
- Vora M**, Romero LI, Karasek MA (1996) Interleukin-10 induces E-selectin on small and large blood vessel endothelial cells. *J Exp Med* 184: 821-829
- Walcheck B**, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK (1996) Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1: a mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J Clin Invest* 98: 1081-1087
- Walsh MC und Kiegelman RM** (1986) Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 33: 179-201
- Weber C und Springer TA** (1997) Neutrophil accumulation on activated, surface adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 100: 2085-2093
- Weibel ER und Palade GE** (1964) New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol* 23: 101-112
- Weiss HJ** (1991) Von Willebrand factor and platelet functions. *Ann N Y Acad Sci* 614: 125-137
- Weller A**, Isenmann S, Vestweber D (1992) Cloning of the mouse endothelial selectins: expression of both E- and P-Selectin is inducible by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 267: 15176-15183
- Weller PF**, Rand TH, Goelz SE, Chi-Rosso G, Lobb RR (1991) Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7430-7433
- Welply JK**, Abbas SZ, Scudder P, Keene JL, Broschkat K, Casnocha S, Gorka C, Steininger C, Howard SC, Schmuke KK, et al. (1994) Multivalent sialyl-LeX: potent inhibitors of E-selectin-mediated cell adhesion; reagents for staining activated endothelial cells. *Glycobiology* 4: 259-265
- Welz B und Sperling M** (1997) Atomabsorptionsspektrometrie. 4. Aufl. Weinheim, Berlin, New York, Chichester, Toronto, Brisbane, Singapore: Wiley-VCH.

- Weyrich AS**, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM (1993) In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 91: 2620-9
- Wilkins PP**, Moore KL, McEver RP, Cummings RD (1995) Tyrosine sulfatation of P-selectin glycoprotein ligand 1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J Biol Chem* 270: 22677-22680
- Williams TJ und Hellewell PG** (1992) Adhesion molecules involved in the microvascular inflammatory response. *Am Rev Respir Dis* 146: S45-S50
- Wu X**, Helfrich MH, Horton MA, Feigen LP, Lefkowitz JB (1994) Fibrinogen mediates platelet-polymorphonuclear leukocyte cooperation during immune-complex glomerulonephritis in rats. *J Clin Invest* 94: 928-936
- Xie J**, Li R, Kotovuori P, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Arnaout MA, Nortamo P, Gahmberg CG (1995) Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J Immunol* 155: 3619-3628
- Xu XC**, el-Naggar AK, Lotan R (1995) Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 147: 815-822
- Yang JT**, Rayburn H, Hynes RO (1995) Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 121: 549-560
- Yao L**, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP (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
- Yellin MJ**, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D, Chess L (1995) Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med* 182: 1857-1864
- Yoshida M**, Szenté BE, Kiely JM, Rosenzweig A, Gimbrone MA (1998) Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion. *J Immunol* 161: 933-941
- Yuan Y und Flemig BP** (1990) A method for isolation and fluorescent labeling of rat neutrophils for intravital microvascular studies. *Microvasc Res* 40: 218-229
- Zanetti G**, Heumann D, Gerain J, Kohler J, Abbet P, Barras C, Lucas R, Glauser MP, Baumgartner JD (1992) Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor-alpha and to lipopolysaccharide. *J Immunol* 148: 1890-1897
- Zhang JQ**, Nicoll G, Jones C, Crocker PR (2000) Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes. *J Biol Chem* 275: 22121-22126.

- Zhang K**, Chuluyan HE, Hardie D, Shen DC, Larsen R, Issekutz A (1998) Novel monoclonal antibodies to putative selectin carbohydrate ligands that inhibit selectin binding to myeloid cells. *Hybridoma* 17:445-456
- Zhou Q und Cummings RD** (1993) L-14 lectin recognition of laminin and its promotion in vitro cell adhesion. *Arch Biochem Biophys* 300: 6-17
- Zhou Q**, Moore KL, Smith DF, Varki A, McEver RP, Cummings RD (1991) The selectin GMP-140 binds to sialylated, fucosylated lactosaminoglycans on both myeloid and nonmyeloid cells. *J Cell Biol* 115: 557-564
- Zöllner O**, Lenter MC, Blanks JE, Borges E, Steegmaier M, Zerwes HG, Vestweber D (1997) L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin. *J Cell Biol* 136: 707-716