



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Characterization of the glycocalyx of the human chondrocyte cell lines
C-28/I2 and T/C-28a2 using lectins

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Alexander Hifnawy
Matrikel-Nummer:	9702137
Studienrichtung:	Pharmazie
Betreuer:	Ao.Univ.-Prof.Mag.Dr. Michael Wirth

Wien, am 10.11.2008

Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei O.Univ.-Prof.Mag.Dr. Helmut Viernstein für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes bedanken.

Meine größte Dankbarkeit gebührt allerdings Ao.Univ.-Prof.Mag.Dr. Michael Wirth und Mag.Dr. Stefan Tögel für die Betreuung dieser Diplomarbeit und ihre fachliche und organisatorische Unterstützung. Während der praktischen Arbeit in meinem „Kammerl“ haben mich eine Reihe netter Menschen begleitet und sind mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Danke euch allen für die Unterstützung und die nette Aufnahme ins Team. Speziell möchte ich an dieser Stelle Ao.Univ.-Prof.Mag.Dr. Franz Gabor danken, der bei mir durch seine Vorlesung “Zielgerichtete Arzneiformen – Drug Targeting“ das Interesse an der Arbeit mit Zellkulturen geweckt hat.

Keine Diplomarbeit ohne vorangegangenes Studium, eine Zeit mit Höhen und Tiefen, sowohl seelischen wie auch finanziellen. Für eure Unterstützung, eure allzeit offenen Ohren und eure Geduld während dieser Zeit möchte ich mich jetzt noch einmal, bei euch liebe Eltern, bedanken. Vielen lieben Dank!!!

Bei aller Ernsthaftigkeit ist die Studienzeit natürlich auch eine schöne Zeit, besonders wenn man gute Freunde hat ohne die es nur halb so lustig gewesen wäre. Darum auch noch ein Dankeschön an euch.

Esther! Bei dir kann ich mich gar nicht genug bedanken. Deine aufmunternden und motivierenden Worte waren mir immer die größte Hilfe beim Kampf gegen die Zeit. Du bist einfach das Hauptmotiv auf dem Gobelin meines Lebens.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse und Diskussion	5
3. Anhang.....	11

PUBLIKATION

„Characterization of the glycocalyx of the human chondrocyte cell lines

C-28/I2 and T/C-28a2 using lectins”

Toegel S, Hifnawy A, Plattner VE, Goldring MB, Unger FM, Viernstein H,

Gabor F, Wirth M

4. Abstract.....	13
5. Introduction	15
6. Materials and Methods	18
7. Results	21
8. Discussion.....	25
9. References	31
10. Figure captions.....	36

Einleitung und Problemstellung

Eines der größten Gesundheitsprobleme der Welt ist zweifellos die Osteoarthritis (OA). Die WHO schätzt, dass etwa 190 Millionen Menschen weltweit unter OA leiden. Die Arthrose oder der Gelenkverschleiß ist ein Gelenkschaden, der mit einem Abbau des Gelenkknorpels beginnt. In schweren Fällen kommt es schließlich zu Umbauprozessen im benachbarten Knochen und einer Zerstörung der Gelenkoberfläche. Als Folge der Erkrankung kommt es zu Schmerzen und Steifigkeit des Gelenks mit Bewegungseinschränkungen. Die Gelenke können sich verformen und schließlich ganz verknöchern. Die Arthrosebehandlung zielt darauf ab, die Schmerzen zu lindern, das Fortschreiten der Erkrankung zu verzögern sowie die Beweglichkeit zu verbessern. Dabei gibt es eine Reihe von Maßnahmen mit denen sich der Erkrankte selbst helfen kann. Dazu zählen unter anderem die Vermeidung von einseitigen Körperhaltungen und Bewegungen, der Abbau von Übergewicht und geeignete Sportarten, wie Schwimmen und Radfahren. Linderung der Symptome können physikalische Therapiemaßnahmen wie beispielsweise Wärmebehandlungen (Fangopackungen, Infrarotlicht) bringen. Medikamente aus unterschiedlichen Substanzgruppen werden zur Schmerzreduktion und Entzündungshemmung systemisch und/oder lokal eingesetzt. In Frage kommen Schmerzmittel (Analgetika), kortisonfreie Entzündungshemmer (NSAR'S), in entzündlichen Krankheitsphasen Kortisonpräparate oder lokale Betäubungsmittel (Gelenkinjektionen), Knorpelaufbaupräparate und „gelenkschmierähnliche“ Produkte (SYSADOA → Symptomatic Slow Acting Drugs in Osteoarthritis wie beispielsweise Chondroitinsulfat, Glukosaminsulfat, Diacerrhein, Hyaluronan und einige pflanzliche Extrakte [z.B. Artischockenextrakt]). Darüber hinaus gibt es eine Reihe von operativen Eingriffen bei der Arthrose. Mit am bekanntesten ist die Arthroskopie (Gelenkspiegelung). Dabei wird das Gelenk gespült, Knochen- und Knorpelreste können entfernt und raue Gelenkflächen geglättet werden. Durch Operationen, die Fehlstellungen korrigieren wie

beispielsweise die Osteotomie, können die Funktion der Gelenke oft über einen längeren Zeitraum erhalten werden. Der künstliche Gelenkersatz (Totalendoprothese) ist die endgültige Therapie der Arthrose.

Trotz der zunehmenden Thematik rund um das Krankheitsbild der Osteoarthritis, ist relativ wenig über die Strukturen des Knorpelgewebes bekannt. Das Knorpelgewebe ist ein festes sowohl druck- als auch biegungselastisches, gefäßloses Stützgewebe, das in der Entwicklung zudem die Anlage des knöchernen Skeletts bildet. Als Knorpelzellen kommen neben den Chondrozyten noch Chondroblasten und Chondroklasten vor. Als Chondroblasten („Knorpelbildner“) werden die Vorläuferzellen der Chondrozyten bezeichnet. Sie stammen von mesenchymalen Stammzellen ab und stellen die aktive Form der Knorpelzelle dar, da sie alle Komponenten der Knorpelmatrix synthetisieren können. Sobald sie diese Synthesefunktion eingestellt haben, differenzieren sie zu den Chondrozyten, den eigentlichen Knorpelzellen. Die Chondrozyten sind kleiner als die Chondroblasten, kugelig geformt und besitzen einen rundlichen Zellkern. Ihre Anzahl, Lage und Dichte ist für jede Knorpelart spezifisch. Als Chondroklasten bezeichnet man Fresszellen, die sich auf Knorpel spezialisiert haben. Sie sind wesentlich größer, entstehen durch Fusion mehrerer Monocyten und stellen somit meist mehrkernige Riesenzellen dar. Chondroklasten spielen eine Hauptrolle beim Abbau des frühen Knorpel-Knochen-Modells zum späteren Knochen bzw. in diesem Kontext auch bei der Heilung nach Knochenbrüchen.

Eine der wichtigsten Funktionen der Chondrozyten ist die Produktion der extrazellulären Matrix des Knorpelgewebes, in welcher sie eingebettet vorliegen. Die der Chondrozytenzellmembran direkt benachbarte perizelluläre Matrix oder Glycocalyx besteht aus Glykoproteinen, Glykolipiden und Proteoglykanen. Hyaluronketten spielen dabei in der Organisation der Glycocalyx eine Schlüsselrolle als Rückgrat-Strukturen für die Fixierung von Chondroitinsulfat-reichen Aggrecanen.

Wie in der vorliegenden Arbeit umgesetzt, können biorekognitive Proteine wie Lektine dazu dienen, Kohlenhydrat-Strukturen in der Glycocalyx zu spezifizieren. Lektine sind komplexe Proteine oder Glykoproteine, die spezifisch an Kohlenhydratstrukturen binden und dadurch in der Lage sind, spezifisch mit Zellen bzw. Zellmembranen zu interagieren. Sie besitzen jedoch keine enzymatische Aktivität. Ursprünglich wurden sie nur aus Pflanzenextrakten isoliert und zur Agglutination von Blutzellen (Erythrozyten) eingesetzt. Daher sprach man zunächst von Phytohaemagglutininen. Später stellte sich heraus, dass sie auch aus tierischen Organen (vornehmlich Invertebraten) gewonnen werden können und dass keineswegs alle an Erythrozyten binden. W. C. Boyd und E. Slapeigh führten daher 1954 den Begriff Lektin (lat: legere = auswählen) ein. Lektine besitzen oft zwei Zuckerbindungsstellen, sonst wäre ihr Agglutinations-/Präzipitationsvermögen nicht erklärbar. Tatsächlich bestehen die meisten von ihnen aus zwei, vier oder mehr meist gleichartigen Untereinheiten. Ihre Spezifität wird durch jenes Mono- bzw. Oligosaccharid definiert, das das Agglutinationsvermögen kompetitiv inhibiert. Die Affinität eines Lektins zu Zellen oder makromolekularen Liganden liegt zum Teil über der der Monosaccharide. Daraus ließe sich ableiten, dass bei Bindung dieser Liganden nicht nur die Kohlenhydratanteile eine Rolle spielen, sondern zusätzliche Protein-Protein-Wechselwirkungen die Bindung stabilisieren. Einen großen Einfluß übt aber auch die sterische Lage der Kohlenhydrate an der Molekül- bzw. Zelloberfläche aus, die natürlich für das Lektin zugänglich sein müssen. Lektine werden in den letzten Jahrzehnten in steigendem Umfang in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Sie eignen sich, um bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente (z.B. Membrantypen) zu charakterisieren, Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen, normale von Tumorzellen zu unterscheiden, die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu markieren und verschiedene Zelltypen affinitätschromatographisch voneinander zu trennen.

Für ein besseres Verständnis des Knorpelaufbaus und des Entstehens von degenerativen Gelenkserkrankungen wie beispielsweise OA könnten in-vitro Studien an Chondrozyten-

Zellkulturen einen wichtigen Beitrag leisten. Menschliche Primärzellen eines einzelnen Spenders sind aber in entsprechender Menge für groß angelegte Studienreihen nur schwierig zu erhalten und Zellkulturen unterschiedlicher Spender können in Abhängigkeit des Gesundheitszustandes und Alters der Spender sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Darüber hinaus besitzen primäre Zellen meist nur eine stark begrenzte Lebensdauer. Allerdings reagieren sie sehr viel ursprünglicher als immortalisierte Zelllinien und entsprechen daher eher den Verhältnissen im Organismus. Da primäre Zellen aber eine in-vivo-ähnliche Umgebung benötigen, ist ihre Kultivierung sehr komplex und erfordert zahlreiche Adaptionen, wie z.B. die der Medienzusammensetzung oder der entsprechenden Kultivierungsoberfläche. Aus all diesen Gründen sollten in der vorliegenden Arbeit immortalisierte Zelllinien eingesetzt werden. Diese Zelllinien haben den Vorteil, dass auf Grund der besseren Verfügbarkeit und Vergleichbarkeit die Durchführung standardisierter und reproduzierbarer Experimente wesentlich einfacher ist. Da aber über deren Charakteristika noch immer relativ wenig bekannt ist, lag das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit darin, die Glycocalyx der immortalisierten humanen Chondrozyten-Zelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 näher zu untersuchen. Dazu wurden Monolayer dieser Zellkulturen mit fluoreszenzmarkierten Lektinen definierter Bindungsaffinität für verschiedene Zuckerstrukturen inkubiert. Anschließend sollten anhand des gebundenen Anteils der Lektine spektrofluorimetrisch Rückschlüsse auf die Saccharid-Strukturen in der pericellulären Matrix gezogen werden.

Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte zur Publikation

„Characterization of the glycocalyx of the human chondrocyte cell lines C-28/I2 and T/C-28a2 using lectins”

von Toegel S, Hifnawy A, Plattner VE, Goldring MB, Unger FM, Viernstein H, Gabor F, Wirth M

(siehe Anhang) maßgeblich beigetragen werden.

Die Zusammensetzung der Glycocalyx stellt einen wichtigen Parameter dar, der die Anwendbarkeit von Chondrozyten-Zellkulturmodellen entscheidend beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Diplomarbeit die Lektinbindungskapazitäten, die Spezifität der Lektin-Chondrozyten-Interaktion und der Einfluss von Sialinsäurestrukturen auf die Interaktion der Lektine mit der Glycocalyx der Chondrozyten Zelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 näher charakterisiert.

Für die Bestimmung der Lektinbindungskapazität wurden die Chondrozyten-Zelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 zunächst in Zellkulturflaschen durchschnittlich 3 Tage lang kultiviert bis sie einen durchgehenden Zellrasen gebildet hatten. Nach Ablösen der Zellen von der Flaschenwand durch Trypsin wird durch Zentrifugieren das Zellpellet erhalten. Vor jedem Versuch wurde die Zahl der viablen Zellen mittels Trypanblau-Ausschlusstest in einem Bürker-Türk Hemocytometer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 3000 viablen Zellen/well in 96-well Mikroplatten ausgesät und in DMEM bis zur Konfluenz gezüchtet. Sobald die Zellen einen durchgehenden Rasen gebildet hatten, wurde der Zelllayer vor dem jeweiligen Versuch dreimal mit je 50 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Monolayer mit je 50 µl einer Lösung der fluoreszenzmarkierten Lektine (serielle

Verdünnung; 3,125 – 200 pmol in PBS) 60 min lang bei 4°C inkubiert. Um ungebundenes Lektin zu entfernen, wurde erneut dreimal mit je 50 µl PBS gewaschen. Die mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität (MFI) konnte danach spektrofluorimetrisch bestimmt werden. Alle Messungen wurden mit 50 µl PBS als Überstand durchgeführt. Um korrekte Werte zu erhalten, wurde die Autofluoreszenz unmarkierter Zellen von den Werten der mit Lektin inkubierten Zellen subtrahiert. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die MFI Werte darüber hinaus auf eine virtuelle Fluoreszenzbelegung von 1 Mol Fluorescein pro Mol Lektin bezogen.

Da die erhaltenen Sättigungskurven bei allen Lektinen in Abhängigkeit der Menge an zugesetztem Lektin anstiegen und zwischen 50 und 150 pmol abzuflachen begannen, kann von einer sättigbaren Bindung ausgegangen werden. Für WGA konnte bei beiden Zelllinien die höchste Bindungskapazität ermittelt werden. Steigende Mengen an zugesetztem WGA resultierten dabei in einer ansteigenden zellgebundenen Fluoreszenzintensität zwischen $44,5 \pm 16$ und $880,6 \pm 23,6$ bei C-28/I2 Zellen und zwischen $29,4 \pm 1,7$ und $844 \pm 5,9$ im Fall von T/C-28a2 Zellen. Bei einer Konzentration von 50 pmol war die gemessene Fluoreszenzintensität von WGA im Fall von C-28/I2 Zellen 1,9-, 2,5-, 2,9-, 3,5-, 3,9- bzw 14,3-fach höher als jene von STL, LCA, PNA, UEA, SNA bzw DBA. Diese Unterschiede waren dabei in jedem Fall statistisch signifikant ($p < 0,05$). Vergleichbare Verhältnisse wurden auch mit T/C-28a2 Zellen erzielt. Aus den erhaltenen Werten lässt sich ableiten, dass die Bindungskapazität von WGA auf beiden Zelllinien am stärksten ausgeprägt ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch, dass die Bindung von WGA, STL, SNA und LCA bei beide Zelllinien ähnlich hoch ist, wohingegen PNA, UEA und DBA auf T/C-28a2 Zellen signifikant niedrigere Werte zeigten. Von allen ausgewählten Lektinen wurden für DBA mit Werten $< 39,8$ auf beiden Zelllinien die geringsten MFI-Werte ermittelt.

Um die Spezifität der Lektin-Zell Interaktion zu überprüfen, wurde ein kompetitiver Verdrängungsassay mit unterschiedlich konzentrierten komplementären Zuckerlösungen durchgeführt. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die Bindung der Lektine an die Kohlenhydratstrukturen der Glycocalyx der Chondrozyten durch Zusatz löslicher Saccharidstrukturen inhibiert werden kann. Dazu wurden konfluente Monolayer nach dreimaligem Waschen mit je 50 µl PBS mit 100 µl einer Verdünnungsreihe des entsprechenden komplementären Zuckers und 50 µl der fluoreszenzmarkierten Lektinlösung (25 pmol) 60 min lang bei 4°C inkubiert. Vor der Analyse der zellgebundenen Fluoreszenzintensität wurden die Zelllayer erneut dreimal mit je 50 µl PBS gewaschen, um ungebundenes Lektin sowie gelöste Lektin-Kohlenhydrat-Komplexe zu entfernen. Für die Messung wurden wiederum jeweils 50 µl PBS als Überstand eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass bei gleich bleibender Lektinkonzentration und steigender Menge an zugesetztem komplementärem Zucker immer weniger Lektin an die Kohlenhydratstrukturen der Zelloberfläche bindet. Dies belegt die Spezifität der Interaktion zwischen Lektin und Glycocalyx. Für die weitere Bewertung wurde die Abnahme der zellgebundenen Fluoreszenzintensität in Prozent bezogen auf Kontrollwerte ohne Zucker (100%) berechnet. Um die Ergebnisse der Inhibitionsstudie vergleichen zu können, wurden darüber hinaus IC_{50} -Werte aus den Inhibitionskurven ermittelt. Der IC_{50} -Wert gibt jene Konzentration an komplementärem Zucker an, bei der die zellgebundene Fluoreszenzintensität um die Hälfte verringert ist. Da die Inhibitionskurven erst bei Werten zwischen 74,1% (PNA, C-28/I2 Zellen) und 94,7% (LCA, C-28/I2 Zellen) abflachten, kann für alle untersuchten Lektine von einem hohen Grad an spezifischer Bindung ausgegangen werden. Interessant ist, dass im Falle von STL die 8-fache Menge an N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) (128 µmol) nötig war, um ähnliche Ergebnisse wie für WGA zu erzielen, das bereits bei 16 µmol GlcNAc Inhibitionswerte von 91,7% bei C-28/I2 and 89,8% bei T/C-28a2 Zellen zeigte. Betrachtet man die IC_{50} -Werte, werden die Unterschiede noch deutlicher. Für GlcNAc und WGA lagen

die IC₅₀-Werte bei 1,75 µmol für C-28/I2 Zellen bzw. bei 1,1 µmol für T/C-28a2 Zellen. Für GlcNAc und STL hingegen konnte für C-28/I2 Zellen ein IC₅₀-Wert von 15 µmol und für T/C-28a2 Zellen ein IC₅₀-Wert von 30 µmol ermittelt werden. Um die Bindungscharakteristika von WGA und STL noch genauer spezifizieren zu können, wurden auch Versuche mit N,N',N''-Triacetyl-chitotriose als komplementärem Zucker durchgeführt. In diesen Testreihen konnten durch Zusatz von 0,03125 µmol bzw. 0,125 µmol N,N',N''-Triacetyl-chitotriose Inhibitionswerte von 96,1% bzw. 91,3% für WGA für C-28/I2 bzw. T/C-28a2 Zellen erzielt werden. Für STL lagen die maximalen Inhibitionsserte bei beiden Zelllinien im Bereich von 88%. Verglichen mit GlcNAc, waren die IC₅₀-Werte für WGA nach Zusatz von N,N',N''-Triacetyl-chitotriose bei den C-28/I2 Zellen 350-mal und bei den T/C-28a2 Zellen 220-mal niedriger. Dies deutet auf die bevorzugte Bindung von WGA an Oligosaccharidstrukturen hin. In einem weiteren Schritt wurde Hyaluronsäure mit Hyaluronidase enzymatisch abgebaut und die dabei hauptsächlich entstehenden Hyaluron-Tetrasaccharide als kompetitiver Zucker für WGA verwendet. Verglichen mit GlcNAc waren die erzielten IC₅₀-Werte mit diesen Oligosacchariden bei C-28/I2 Zellen 11,6-fach niedriger und bei T/C-28a2 Zellen 3,4-fach niedriger. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass WGA eine ausgeprägte Bindungskapazität für Hyaluron-Oligosaccharide besitzt. Für UEA und PNA konnten ebenfalls relativ hohe Inhibitionswerte im Bereich zwischen 74,1% und 80,5% bestimmt werden. Die korrespondierenden IC₅₀-Werte lagen hier zwischen 0,08 µmol and 0,325 µmol. Die für LCA analysierten Inhibitionswerte deuten mit 80,5% bei T/C-28a2 Zellen und 94,7% bei C-28/I2 Zellen ebenfalls auf eine hohe Spezifität der Interaktion des Lektins mit der Glycocalyx der Chondrozyten hin. Es soll allerdings darauf hingewiesen werden, dass für eine Inhibition über 80% bei C-28/I2 Zellen die 4-fache Menge (64 µmol) an Mannose benötigt wurde verglichen mit T/C-28a2 Zellen, bei denen eine Mannose-Konzentration von 16 µmol für eine Inhibition von 80,5% ausreichend war. Aufgrund der sehr geringen MFI Werte von DBA (<39,8) wurden mit diesem Lektin keine detaillierten

kompetitiven Inhibitionsassays durchgeführt. Allerdings wurde auch die Bindungsspezifität von DBA mit einem Überschuss an N-acetylgalactosamin bestätigt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass von allen untersuchten Lektinen WGA und STL die größten Bindungskapazitäten sowie -spezifitäten aufgewiesen haben.

Für eine weiterführende Charakterisierung der perizellulären Matrix der Chondrozyten sollte der Einfluss von Sialinsäurestrukturen auf die Interaktion der Lektine mit der Glycocalyx näher untersucht werden. Dazu wurden Monolayer der T/C-28a2 Zelllinie 60 min lang bei 37°C mit je 100 µl einer seriellen Verdünnung von Neuraminidase (0,025 U/ml – 0.1 U/ml) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einer konstanten Menge (50 pmol) der Lektine WGA, STL und PNA 60 min lang bei 4°C inkubiert. Die Messergebnisse wurden danach auf einen Vergleichswert, der mit enzymatisch unbehandelten Zellen erstellt wurde, bezogen. Neuraminidasen sind in der Lage terminale Sialinsäurereste von Glycoproteinen der Zelloberflächen abzuspalten. Nach Vorbehandlung mit Neuraminidase stieg die zellgebundene Menge an PNA in Abhängigkeit der eingesetzten Neuraminidase-Konzentration signifikant an. Bei PNA war dabei der Anstieg der Bindungskapazität in allen Verdünnungsstufen statistisch signifikant ($p < 0,05$). Es ist bekannt, dass PNA spezifisch an terminale 2-Acetamido-2-Deoxy-3-O-β-D-Galactopyranosyl-D-Galactose-Strukturen bindet, die Teilstrukturen von Keratansulfat darstellen und mit Sialylgruppen maskiert sind. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass die ECM der Chondrozyten eine große Anzahl an Galactosyl-Bindungsstellen enthält, die von Sialylgruppen abgeschirmt werden. Außerdem konnte durch den signifikanten Anstieg der Bindungskapazität von PNA die erfolgreiche Abspaltung der Sialylgruppen durch Neuraminidase bestätigt werden. Für WGA konnte in dieser Versuchsreihe nur ein äußerst geringfügiger Anstieg der Bindungsrate beobachtet werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass WGA in der Glycocalyx von Chondrozyten weniger mit Sialylsäure und mehr mit GlcNAc-Strukturen interagiert. Der beobachtete

Anstieg der Bindungskapazität von WGA ließe sich dadurch erklären, dass GlcNAc-Bindungsstellen nach der Entfernung der Sialylgruppen leichter zugänglich sind. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse der Versuchsreihe mit STL. STL, ein Lektin mit hoher Bindungsspezifität für GlcNAc und keiner Interaktion mit Sialylsäurestrukturen, zeigte einen signifikanten konzentrationsabhängigen Anstieg der Bindungskapazität nach Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase. Das lässt darauf schließen, dass auch GlcNAc-Bindungsstellen der ECM der Chondrozyten durch Sialylgruppen maskiert werden und deren Entfernung in einer erhöhten Bindungskapazität GlcNAc-spezifischer Lektine resultiert.

Abschließend lässt sich festhalten, dass in dieser Diplomarbeit die Expression verschiedener Oligosaccharid-Sequenzen in der Glycocalyx der humanen Chondrozyten-Zelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 detailliert analysiert werden konnte. Diese Oligosaccharid-Sequenzen können als spezifische Produkte der O- und N-Glykosylierungswege von Chondrozyten angesehen werden. Die zwischen den beiden Zelllinien beobachteten Unterschiede lassen sich dabei durch die unterschiedliche Charakteristik des molekularen Phänotyps erklären. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen darüber hinaus eine hohe Bindungsaffinität von WGA zu menschlichen Chondrozyten-Zelllinien, die in einer ausgeprägten Zytoadhäsion resultiert. So weist WGA von allen untersuchten Lektinen bei beiden Zelllinien die deutlich größte Zellinteraktion auf, wobei sowohl Bindungsstärke als auch Spezifität zu N-Acetyl-D-Glucosamin-Strukturen entsprechend ausgeprägt sind. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte ein Einsatz von WGA neue Möglichkeiten als bioadhäsives Agens im Bereich der zielgerichteten Arzneiformung eröffnen, die den gezielten Transport von Wirkstoffen zu Chondrozyten erlauben würde. Das Konzept der Bioadhäsion könnte aber auch im tissue engineering eingesetzt werden, um das Zellwachstum auf niedrig adhäsiven Oberflächen zu verbessern.

Anhang

PUBLIKATION

„Characterization of the glycocalyx of the human chondrocyte cell lines C-28/I2 and T/C-28a2 using lectins”

von Toegel S, Hifnawy A, Plattner VE, Goldring MB, Unger FM, Viernstein H, Gabor F, Wirth M

Characterization of the glycocalyx of the human chondrocyte cell lines C-28/I2 and T/C-28a2 using lectins

to be submitted to ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

Toegel S^{1,2,}, Hifnawy A², Plattner VE², Goldring MB³, Unger FM², Viernstein H²,
Gabor F², Wirth M²*

¹Medical University Vienna, Waehringer Guertel 18-20, A-1090 Vienna, Austria

²Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Althanstraße 14, A-1090 Vienna, Austria

³Laboratory for Cartilage Biology, Research Division, Hospital for Special Surgery, Weill College of Medicine of Cornell University, New York, USA

*Corresponding author

Stefan Toegel

Medical University Vienna

c/o Althanstraße 14 (2G 306)

A-1090 Vienna

Austria

phone: +43 1 4277 55461 ; fax: +43 1 4277 9554

email: stefan.toegel@univie.ac.at

Abstract

To date, little is known about the composition of carbohydrate residues present in the extracellular matrix (ECM) of cultured human chondrocytes. However, this information might be of relevance for studies on cartilage tissue engineering or drug targeting. Therefore, the present study was performed to evaluate the binding patterns and specificities of selected lectins with affinity for distinct carbohydrate structures on C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocyte monolayer cultures. Moreover, experiments involving enzymatic pre-treatment of the chondrocyte monolayers aimed at a further characterization of the cultured chondrocyte extracellular matrix. The bioadhesive properties of a panel of fluorescein-labelled lectins with specificities for different carbohydrate structures were investigated by spectrofluorometry. To ascertain the specificity of the lectin-cell interaction competitive inhibition assays using complementary carbohydrates were performed.

As compared to that of other lectins, highest binding capacity in both cell lines was yielded with wheat germ agglutinin (WGA), which indicates a notable presence of N-acetyl-D-glucosamine structures as contained in hyaluronan chains. To further specify the binding characteristics of the lectins to the chondrocyte ECM confluent T/C-28a2 cells were pretreated with neuraminidase for digestion of sialic acids prior to incubation with a constant amount of WGA, PNA and STL. After sialic acid digestion only the binding capacity of PNA significantly increased and remained constant upon elevation of neuraminidase concentration. This explicit increase in binding capacity of PNA indicates the successful enzymatic removal of sialic groups, since it is known that PNA is only specific for terminal 2-acetamido-2-deoxy-3-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactose residues which are known to be present in keratan sulfate and masked with sialic acid groups. As compared to PNA, the WGA binding capacity of the chondrocyte ECM only slightly increased. These findings suggest that N-acetylneuraminic acid, the predominant sialic acid, is involved only in low-affinity interactions of WGA. Using N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) as corresponding

carbohydrate in competitive assays high inhibition values were observed for both cell lines, indicating a high specificity of WGA for GlcNAc. The results of another assay using chitotriose as competitive inhibitor indicates that WGA seems to bind to internal GlcNAc residues in large oligosaccharides with high affinity. Due to this reason hyaluronidase-digested hyaluronic acid consisting mainly of hyaluronan tetrasaccharides was prepared and used for competitive inhibition. IC_{50} values observed with these oligosaccharides were several times lower in case of both cell lines as compared to the monosaccharide GlcNAc. We therefore hypothesize that hyaluronan might represent a target structure for WGA in the glycocalyx of cultured chondrocytes. In conclusion, this study could be used as a basis for a more detailed evaluation of the properties of the chondrocyte glycocalyx.

Introduction

Human cartilage is a type of dense connective tissue consisting of chondrocytes, that produce a large amount of extracellular matrix composed of collagen fibers, abundant ground substance rich in proteoglycan and elastin fibers. Chondroitin sulfate, heparan sulfate, keratan sulfate and hyaluronic acid are the major proteoglycans of cartilage [1]. Initial assembly of extracellular matrix occurs within a zone immediately adjacent to the chondrocyte cell surface termed the glycocalyx, cell- associated or pericellular matrix. The glycocalyx consists of large proteoglycane aggregates such as aggrecan or perlecan [1]. Hyaluronan chains play a key role in the organisation of the pericellular matrix serving as backbone structures for the fixation of chondroitin sulphate-rich aggrecans [2]. Cartilage is classified in three types, elastic cartilage, hyaline cartilage and fibro cartilage, which differ in the relative amounts of the three main components. Unlike other connective tissues, cartilage does not contain any blood vessels. Chondrocytes are fed by diffusion, helped by the pumping action generated by compression of the articular cartilage or flexion of the elastic cartilage. Thus, compared to other connective tissues, cartilage grows and repairs more slowly. Articular cartilage withstands high levels of mechanical stress and continuously renews its extracellular matrix. Despite this durability, mature articular cartilage is vulnerable to injury and disease processes that cause irreparable tissue damage. Native hyaline articular cartilage has poor regenerative capacity following injury, largely due to the tissue's lack of blood and lymphatic supply, as well as the inability of native chondrocytes to migrate through the dense extracellular matrix to the defect site [3].

N-acetylneuraminic acid is often found as a terminal residue of oligosaccharide chains of glycoproteins. The presence or absence of these sialic acids provides a crucial marker for the biokinetic fate of a glycoprotein. In addition, the sialic acid-rich regions contribute to creating a negative charge in the extracellular matrix of cartilage. As a polar molecule, water has a partial positive charge on both hydrogen molecules and thus is attracted to the cartilage ECM.

It has been shown that the negative charge of sialic acids can play a significant role in the retention of water [4] and that a substantial decrease in the density of sialic acids with age might be associated with the onset of osteoarthritic changes commonly seen in aging humans [5]. The pathogenesis of arthritis seems to require three crucial elements: loss of sulfated proteoglycans leading to a decrease of compressive stiffness; degradation and loss of type II collagen, which is responsible for the tensile strength of cartilage, with concomitant swelling of the fibrillated matrix; and dedifferentiation of the chondrocytes, which are in charge of maintaining the extracellular matrix. Osteoarthritis, a type of arthritis that is caused by the breakdown and eventual loss of the cartilage of one or more joints, is the most common, affecting over 190 million people worldwide as estimated by the WHO. Chondrocyte cell cultures are a useful in vitro model to study the chondrocyte phenotype as well as ECM assembly in health and disease [6, 7]. However, primary chondrocytes have a short lifespan and are subject to a rapid shift of the cellular phenotype when cultured in vitro [8, 9]. Therefore, immortalized chondrocytes of human origin have been developed to serve as reproducible models for studying chondrocyte function [10]. While the mRNA profiles of markers of the chondrocyte phenotype in these proliferating cell lines differ from those in primary chondrocytes [11], in particular the T/C-28a2 and C-28/I2 cell lines have become common tools in cartilage research. Although immortalized chondrocytes should not be considered as substitutes for primary chondrocytes, they proved to be useful tools for evaluating and further validating mechanisms relevant to cartilage biology.

Lectins are non enzymatic proteins or glycoproteins that bind carbohydrates. All lectins have a carbohydrate recognition domain (CRD) which binds reversibly to specific mono- or oligosaccharides [12]. Due to these characteristics, lectins can be used as histochemical markers to demonstrate glycoconjugate distribution in tissue in order to gain more specific information on the localisation of carbohydrate moieties of macromolecules [13]. In a recent study [14], our group has applied this concept of lectin binding studies as a tool for the

characterization of the chondrocyte glycocalyx and investigated the binding patterns of several plant lectins on chondrocyte single cells using flow-cytometry. The predominant binding capacity of WGA indicated that trypsinised single cells were surrounded by N-acetyl-glucosamine residues indicating large amounts of hyaluronan in the pericellular space of chondrocytes. Regarding drug delivery to chondrocytes, the internalisation of surface-bound WGA into chondrocytes - presumably via the CD44 receptor mediated hyaluronan endocytosis pathway - and its accumulation within lysosomes was described. This physiological process could represent a feasible pathway to target WGA-functionalized drug delivery devices into chondrocytes. However, some studies have shown that trypsination might remove lectin-binding sites from the plasma membrane of cells [15] and thus conclusions regarding the sugar residue distribution in the ECM of an intact cell monolayer remain speculative.

In order to provide an improved model for the study of the chondrocyte glycocalyx the present study aimed to evaluate the glycophenotype of the two immortalized human chondrocyte cell lines C-28/I2 and T/C-28a2 when using monolayers. The results might provide a basis for a more precise evaluation of the interactions between the chondrocytes and its matrix environment.

Materials and Methods

Materials

The fluorescein labelled lectins from *Triticum vulgare* (WGA; molar ratio fluorescein/protein (F/P)=5.4), *Sambucus nigra* (SNA; F/P=6.9), *Solanum tuberosum* (STL; F/P=2.9), *Dolichos biflorus* (DBA; F/P=5.7), *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin (PNA); F/P=4.7), *Ulex europaeus* (UEA; Ulex europaeus isoagglutinin I, F/P=4.0) and *Lens culinaris* (LCA; F/P=6.0) were purchased from Vector laboratories (Burlingame, USA) and contained >98% active conjugate and no free fluorescein. N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), chitotriose, N-acetyl-D-galactosamine, D-galactosamine, α -L-fucose, D-mannose, Neuraminidase (*Clostridium perfringens*) and 0.25% Trypsin-EDTA solution were from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany) unless otherwise specified.

Cell culture

The chondrocyte cell lines C-28/I2 and T/C-28a2 were seeded on 96-well microplates (Iwaki, Japan) at a density of 3000 cells/well and cultivated to confluence in D-MEM cell culture medium (Gibco, Carlsbad, California) containing 10% fetal calf serum (Biochrom AG, Berlin), 50 μ g/ml ascorbic acid and 2 μ l/ml gentamycin. Throughout culture, cells were maintained in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C.

Cell viability tests

Prior to each experiment, viability of cells was determined by trypan blue exclusion and counting of viable cells using a Bürker-Türk hemocytometer.

Determination of the lectin binding capacity of chondrocytic cells

After reaching confluence, chondrocyte monolayers were washed with 50 µl PBS three times using a Columbus washer (SLT Lab Instruments, Salzburg, Austria). Washed cells were incubated with 50 µl of a serial dilution of the respective fluorescein-labelled lectin (3.125 – 200 pmol in PBS) for 60 min at 4°C. Afterwards, the monolayers were washed again three times with 50 µl PBS to remove any unbound lectin. The mean cell-bound fluorescence intensity (MFI) was determined using a Spectra Fluor fluorescence microplate reader (SLT Lab Instruments, Salzburg, Austria) equipped with Biolise software for data analysis. Fluorescence emission of the lectin-loaded cell monolayers was measured at 535 nm after excitation at 485 nm. 50 µl PBS were used as supernatant during all measurements. Each experiment was performed in quadruplicate and control samples consisting of unlabelled cells were included.

Specificity of the lectin-chondrocyte interaction

A competitive assay, in which the oligosaccharides forming the chondrocyte glycocalyx and an additionally added carbohydrate are allowed to compete for lectin binding, was performed to ensure the specificity of the lectin-cell interaction. Therefore, confluent cell monolayers were washed three times with 50 µl PBS using the Columbus washer. Then, 100 µl of a dilution series of the respective complementary carbohydrate and 50 µl of a solution containing 25 pmol fluorescein-labelled lectin were added and the plates were incubated for 60 min at 4°C. The amount of inhibitory carbohydrate used for each lectin are given in Table 2. To remove any unbound lectin and soluble lectin-carbohydrate complexes, the monolayers were washed three times with 50 µl PBS. 50 µl PBS were added as supernatant prior to determination of the cell-bound fluorescence intensity by fluorimetry. Each experiment was performed in quadruplicate and samples consisting of unlabelled cells were included as negative controls. A reference value accounting for the fluorescence maximum (0%

inhibition) was determined using 100 µl PBS instead of the carbohydrate solution. Hyaluronan oligosaccharides used to characterize the binding specificity of WGA were generated by a 24 h digestion of 20 mg hyaluronic acid (MW ~ 1500kD) with 439 U of bovine testicular hyaluronidase in 1 ml digestion buffer (0.1 M phosphate buffer, pH 5.3, 0.15 M NaCl) at 37°C. It is known from the literature that the final reaction product of this digestion consists mainly of tetrasaccharides [16].

Enzymatic digestion

For neuraminidase treatment, the glycocalyx of confluent T/C-28a2 monolayers were digested with 100 µl neuraminidase (0.025, 0.05 and 0.1 U/ml in 0.2 M acetate buffer, pH 5.5) for 60 min at 37° C. Afterwards, the monolayers were extensively washed as described above prior to labelling with 50 µl of a solution F-WGA, F-STL or F-PNA in PBS (50 pmol per well) for 60 min at 4°C. After another washing step, cell-bound fluorescence intensities were determined by fluorimetry. Each experiment was performed in triplicate and control samples consisting of unlabelled cells were included. Additional controls were performed by substituting the enzyme with PBS solution.

Statistics

Statistical analyses were performed using the Microsoft Excel[®] integrated analysis tool. Hypothesis tests among two data sets were made by comparison of two means from independent (unpaired) samples (t-test). A value of $p < 0.05$ was considered significant. Descriptive statistical analyses were performed using mean values and standard deviations (SD).

Results

Determination of the lectin binding capacity of chondrocytic cells

The fluorescence intensity of the cell monolayers representing the binding of the fluorescein-conjugated lectins was used to quantify the presence of specific carbohydrate structures in the glycocalyx of chondrocyte cell line cultures. The autofluorescence levels of C-28/I2 and T/C-28a2 monolayers resulting from control samples were in the range of 558.9 ± 27.2 MFI throughout the study. To yield correct data, the autofluorescence values were subtracted from all the binding values of the labelled cell layers. For comparison, the MFI values of each individual lectin were related to an apparent conjugation number of 1 mol fluorescein per mol lectin. The resulting saturation curves (Figure 1 and 2) increased as a function of the amount of lectin added. Levelling of the curves started between 50 and 150 pmol lectin indicating saturable binding processes. For both cell lines the highest binding capacity was yielded with WGA. Increasing the amount of WGA added resulted in increased cell-bound fluorescence intensities between 44.5 ± 1.6 and 880.6 ± 23.6 in case of C-28/I2 and between 29.4 ± 1.7 and 844.6 ± 5.9 in case of T/C-28a2 cells. At a concentration of 50 pmol WGA, the obtained fluorescence intensity was 1.9, 2.5, 2.9, 3.5, 3.9, and 14.3 fold higher as compared to STL, LCA, PNA, UEA, SNA and DBA in case of C-28/I2 cells (Figure 1). These differences were statistically significant in each case ($p < 0.05$). Figure 2 demonstrates that similar ratios were assessed also for T/C-28a2 cells. Binding of DBA was very low as demonstrated by MFI values below 39.8 in case of both cell lines. In addition, figures 1 and 2 illustrate that the cell-bound amount of WGA, STL, SNA and LCA was comparable between both cell lines, whereas the binding capacities of PNA, UEA, and DBA were significantly lower in case of T/C-28a2 cells.

Specificity of the lectin-chondrocyte interaction

To confirm the carbohydrate specificity of the lectin-cell interaction competitive inhibition assays were performed by adding a dilution series of the corresponding carbohydrate to a constant amount of lectin (25 pmol/well). Table 2 summarizes the results of these experiments indicating the percentage of decreasing fluorescence intensity as compared to a control sample representing 100% lectin binding. For comparison of the data obtained, IC_{50} values were calculated from inhibition curves (not shown) of each lectin. IC_{50} is defined as the amount of complementary carbohydrate which half-inhibits the binding of fluorescein-labelled lectins in the competitive binding assay. Inhibition curves leveling off between 74.1% (PNA, C-28/I2 cells) and 94.7% (LCA, C-28/I2 cells) indicate a high degree of specific binding in case of all lectins studied. Upon addition of 16 μ mol GlcNAc, the inhibition curves of WGA levelled off at 91.7% using C-28/I2 and 89.8% using T/C-28a2 cells, whereas the 8 fold amount of GlcNAc (128 μ mol) had to be added to achieve similar inhibition values for STL. Thus, the correspondent IC_{50} values were also considerably higher. While an IC_{50} value of 1.75 μ mol was obtained for GlcNAc and WGA on C-28/I2 cells, the half maximal inhibitory concentration of GlcNAc for STL on this cell line was 15 μ mol. This effect was even more pronounced in case of T/C-28a2 cells where 1.1 μ mol GlcNAc half-inhibited the WGA-binding, but an IC_{50} value of 30 μ mol was obtained with GlcNAc and STL. Noteworthy that the IC_{50} value of GlcNAc for WGA on C-28/I2 cells (1.75 μ mol) is higher than on T/C-28a2 cells (1.1 μ mol), whereas the characteristics of the IC_{50} values of GlcNAc for STL are vice versa. An IC_{50} value of 15 μ mol was obtained on C-28/I2 cells, but the 2 fold amount of inhibiting GlcNAc (30 μ mol) was needed for half-inhibition of STL on T/C-28a2 cells.

To study the binding characteristics of WGA and STL in more detail N,N',N''-triacetyl-chitotriose was applied as complementary sugar. In this case an inhibition of lectin binding amounting to 96.1% for the C-28/I2 cells and 91.3% for the T/C-28a2 cells could be

determined by using 0.03125 μmol N,N',N''-triacetyl-chitotriose, respectively. For STL, inhibition values of about 88.5% were found for both cell lines by using 0.125 μmol N,N',N''-triacetyl-chitotriose. Although both, WGA and STL, bind to similar structures, again the IC_{50} value of N,N',N''-triacetyl-chitotriose for STL was higher than that for WGA in both cell lines, but in particular on C-28/I2 cells (0.02 μmol), where the IC_{50} value was 2.86 fold higher than on T/C-28a2 cells (0.0078 μmol). As compared to GlcNAc, IC_{50} values for WGA resulting from N,N',N''-triacetyl-chitotriose addition were 350 times lower in case of C-28/I2 cells and 220 times lower in case of T/C-28a2 cells indicating the preferred binding of WGA to oligosaccharide structures.

Moreover, hyaluronidase-digested hyaluronic acid consisting mainly of hyaluronan tetrasaccharides was prepared and used as competitive sugar. IC_{50} values observed with these oligosaccharides were 11.6-fold lower in case of C-28/I2 cells and 3.4-fold lower in case of T/C-28a2 cells as compared to the monosaccharide GlcNAc. These data strongly suggest that WGA possesses a distinct binding capacity for hyaluronan oligosaccharides. Competitive binding assays performed with hyaluronan oligosaccharides and galactosamine also revealed high inhibition of UEA and PNA binding in the range between 74.1% and 80.5% and adequate IC_{50} values between 0.08 μmol and 0.325 μmol . Using free sialic acid as inhibitory sugar, inhibition of SNA interaction failed (not shown), indicating that 2,6-linked Gal residues are a prerequisite for specific SNA binding. Due to the very low MFI values of DBA (< 39.8) concentration-dependent inhibition experiments with this lectin were not performed. Thus, the binding specificity of DBA was only ascertained using excess amounts of N-acetylgalactosamine.

Enzymatic digestion

To further characterize the glycocalyx of chondrocytic monolayer cultures, sialic residues were enzymatically removed from the chondrocyte glycocalyx. Therefore, confluent T/C-

28a2 cells were treated with a dilution series of neuraminidase prior to incubation with a constant amount of F-WGA, F-STL and F-PNA (50 pmol) for 60 min at 4°C. Control samples without lectin revealed no significant change in the autofluorescence levels of chondrocyte monolayers after neuraminidase treatment. Figure 3 shows the change in binding capacities of WGA, STL and PNA after pre-treatment with neuraminidase. Regarding the fold-change in binding capacity after neuraminidase treatment, binding of PNA significantly increased (4.97-fold at 0.025 U/ml neuraminidase) and remained constant upon elevation of neuraminidase concentration. In contrast, WGA binding only slightly increased without reaching statistical significance ($p=0.14$). Therefore, the binding of WGA to sialic acid residues in the glycocalyx of cultured chondrocytes appears negligible in view of the relatively stable binding values of WGA following enzymatic removal of sialic acids. For STL, the increase of the binding capacity was found to be concentration dependent. A statistically significant increase of STL binding could be achieved after pre-treatment with 0.1 U neuraminidase ($p<0.05$).

Discussion

The attachment of oligosaccharide chains to asparagine (N-linked) or serine/threonine (O-linked) residues represents a common post-translational modification affecting folding, form and function of the respective proteins. It has been shown that changes in the cell surface glycosylation phenotype can influence cell surface functions such as cell adhesion, cell surface receptor activities and the induction of apoptosis [17-21]. Chondrocytes are known to synthesize numerous glycoproteins involved in chondrocyte biology and cartilage physiology, but little is known about the structures, biosynthesis and roles of glycoprotein-bound glycans. Lectin binding studies using primary human chondrocytes have shown that both O-glycans and N-glycans are exposed on cell surfaces [22, 23]. Moreover, Yang et al. have reported that the pro-inflammatory cytokine tumour necrosis factor α (TNF α) and the anti-inflammatory cytokine transforming growth factor β (TGF β) can alter cellular glycosylation as well as the expression of specific glycoproteins and glycosyltransferases [22]. This is of interest since chondrocytes are exposed to high levels of inflammatory cytokines under osteoarthritic conditions. Although immortalized chondrocyte cell lines represent accepted models in cartilage research, little information on the glycophenotype of such cell lines exist in literature [14]. Therefore, the glycophenotype of C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocyte monolayer cultures was evaluated in the present study. A panel of seven lectins (shown in Table 1) was used to probe for a range of oligosaccharide sequences determining specific products of the O-glycosylation and N-glycosylation pathways [12, 22, 24].

In the O-glycosylation pathways of most cell types, the primary GalNAc- epitope is converted to the core 1 structure Gal β 1-3GalNAc. These carbohydrate structures provide binding sites for DBA and PNA lectins, respectively [22]. Subsequently, the core 1 structure can be further

extended in different ways, e.g. by fucosylation reactions forming the Fuc α 1-2Gal β 1-4-GlcNAc- residue which can be specifically detected by UEA [24]. Table 2 shows that the C-28/I2 and the T/C-28a2 cell lines differ in their expression of O-linked carbohydrates. The binding capacities of DBA, PNA, and UEA were significantly lower for T/C-28a2 cells, indicating minor biosynthesis of GalNAc-epitopes, core 1 structures, and fucosylation products. This finding is in agreement with the observation that the T/C-28a2 cell line proliferates more rapidly than the C-28/I2 clonal line. Since the expression of a differentiated phenotype in chondrocytic cell lines appears to be inversely related to their proliferative capacity [10], the reduced lectin binding rate in T/C-28a2 cells may reflect a smaller amount of pericellular matrix accumulated around these cells during culture.

To account for N-linked oligosaccharide chains, the binding of LCA and SNA was assessed identifying the expression of high-mannose type oligosaccharides and sialyl α 2-6Gal termini capping some complex-type N-glycans, respectively [22]. No differences in the expression of these N-glycan structures were found between C-28/I2 and T/C-28a2 cells.

Due to the ubiquitous presence of GlcNAc moieties in the glycocalyx of cells, the target structures of WGA are difficult to specify. First, possible binding sites could be provided by N-linked glycans of the hybrid-type. It has been reported that the binding of WGA to the hybrid-type N-glycans was mediated by the N,N'-diacetylchitobiose core portion as well as a GlcNAc residue at the reducing end [25]. Also, an interaction of WGA with keratan sulfate in cultured human chondrocytes appears conceivable, considering the components of this sGAG. In contrast to STL, however, WGA has been shown to possess less binding capacity for keratan sulfate in its highly sulfated form [26]. Based on the observation that the binding of WGA to the chondrocyte glycocalyx was higher than that of STL throughout the study,

keratan sulfate might not contribute markedly to the interaction between WGA and cultured chondrocytes.

In order to further elucidate the lectin binding sites of immortalized human chondrocytic cell lines with respect to GlcNAc and sialic groups, two experimental setups were created. First, confluent T/C-28a2 cells were pretreated with neuraminidase for digestion of sialic acids prior to incubation with a constant amount of WGA, PNA and STL. PNA is only specific for terminal 2-acetamido-2-deoxy-3-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactose residues which are known to be present in keratan sulfate and masked with sialic acid groups [27]. The statistically significant increase ($p < 0.03$) of the PNA binding after sialic acid digestion confirms the successful removal of sialic acids from the chondrocyte glycocalyx and suggested the presence of keratan sulfate. Of note, the WGA binding capacity of the chondrocyte glycocalyx did not decrease after neuraminidase treatment. This indicates that sialic acid residues play a negligible role in the WGA binding process to chondrocyte cultures. The slight increase of the WGA binding capacity after sialic acid digestion may be explained by facilitated accessibility of GlcNAc binding domains. Due to the 4-fold higher binding affinity of WGA to GlcNAc as compared to sialic acids [12], lectin molecules initially bound to sialic groups may also be available for binding to GlcNAc after neuraminidase treatment. This explanation is further corroborated by the significant increase of cell-bound STL after neuraminidase treatment since STL represents a lectin which has no binding specificity for sialic acids but for GlcNAc.

Second, competitive inhibition assays were performed to confirm the carbohydrate specificity of the lectin-cell interaction. Using GlcNAc as competitive carbohydrate, high inhibition values were observed for both cell lines, indicating a high specificity of the interaction between WGA and the cellular glycocalyx (Table 2). For further characterization the binding of WGA was also inhibited with N,N',N''-triacetyl-chitotriose as complementary sugar. Compared to GlcNAc, IC₅₀ values resulting from N,N',N''-triacetyl-chitotriose addition were

350 times lower in case of C-28/I2 cells and 220 times lower in case of T/C-28a2 cells indicating the preferred binding of WGA to oligosaccharide structures. It has to be underlined that the binding capacity of WGA was among the highest of all tested lectins for both immortalized cell lines. This might indicate that the WGA binding sites at the chondrocyte glycocalyx are part of the basic repertoire of chondrocytes. Recently, it has been depicted that chondrocytes are surrounded by a several μm -thick hyaluronan coat with gel-like properties [28]. Given the components of hyaluronan, we hypothesized that hyaluronan might represent a target structure for WGA in the pericellular matrix of cultured chondrocytes. Therefore, hyaluronidase-digested hyaluronic acid consisting mainly of hyaluronan tetrasaccharides was prepared and used as competitive sugar. In spite of a previous study reporting that WGA does not interact with hyaluronic acid [29], our assumption was corroborated by a concentration-dependent inhibition of WGA binding to the cell monolayers using hyaluronan oligosaccharides. IC_{50} values observed with these oligosaccharides were 11.6-fold lower in case of C-28/I2 cells and 3.4-fold lower in case of T/C-28a2 cells as compared to the monosaccharide GlcNAc. These data suggest that binding of WGA partially occurs also via oligosaccharide structures of the chondrocyte hyaluronan coat.

The concept of bioadhesion has been applied in drug delivery systems to target a substance of interest to the intended site of action. In this context, the potential of lectins as mediators of bioadhesion for pharmaceutical drug delivery systems has been intensively outlined [12, 30, 31]. In recent studies, the enhancement of cytoadhesion, cytoinvasion as well as transcellular transport of WGA-grafted nanospheres was demonstrated using Caco-2 single cells and monolayers [32,33]. Moreover, our group recently demonstrated that WGA might be internalized into chondrocytes together with hyaluronan via the CD44 receptor-mediated endocytosis pathway followed by accumulation within lysosomes [14]. To explore the potential utility of lectins as bioadhesive tools for drug delivery to chondrocyte cells, the

present study was also aimed to evaluate the binding characteristics of selected lectins with affinity for distinct carbohydrate structures on human chondrocyte cell lines T/C-28a2 and C-28/I2. Given the presented binding characteristics of WGA to the chondrocyte glycocalyx, we suggest WGA to be a promising candidate as a bioadhesive tool for drug delivery to chondrocyte cells.

Powerful developments in the multidisciplinary field of tissue engineering have yielded a novel set of tissue replacement parts and implementation strategies. Scientific advances in biomaterials, stem cells, growth and differentiation factors and biomimetic environments have created unique opportunities to fabricate tissues in the laboratory from combinations of engineered extracellular matrices ("scaffolds"), cells and biologically active molecules. Among the major challenges for the clinical applicability of tissue engineering, the combination between providing a suitable environment for cellular growth as well as providing biomechanical stability appears crucial. In this context, despite some advantageous characteristics, candidate scaffolds such as chitosan, nylon or polyglycolic acid provide very limited cell attachment as compared to native fibres such as collagen [34-37]. Recently, Wang et al. demonstrated that cell attachment of fibroblasts on chitosan films was improved by the conjugation of WGA onto the chitosan surface [37]. That way, cell densities on the scaffold were increased and biocompatibility was improved as determined by mRNA expression analysis of HSP 90 heat shock protein. In agreement with these observations, the results of the present study indicate remarkable cytoadhesion as well as high binding affinity of WGA towards the human chondrocyte cell lines C-28/I2 and T/C-28a2. These findings suggest that WGA might also be a promising candidate to mediate bioadhesion to low-adhesive scaffolds in cartilage tissue engineering approaches.

In summary, the present study demonstrated that the human chondrocyte cell lines C-28/I2 and T/C-28a2 express several oligosaccharide sequences determining specific products of the O-glycosylation and N-glycosylation pathways. Differences between the cell lines could be related to well known differences in their molecular phenotype. Moreover, we brought evidence that WGA might bind to oligosaccharide structures of the chondrocyte hyaluronan coat. This specific cytoadhesion as well as high binding affinity of WGA towards the human chondrocyte glycocalyx might provide a basis for future applications of lectin-mediated drug targeting and tissue engineering strategies in cartilage research.

References

- 1 C.B. Knudson, W. Knudson, Cartilage proteoglycans, *Semin. Cell Dev. Biol.* 12 (2001) 69-78
- 2 Q. Hua, C.B. Knudson, W. Knudson, Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor mediated endocytosis, *J. Cell Sci.* 106 (1993) 365-375
- 3 J.A. Buckwalter, H.J. Mankin, Articular cartilage repair and transplantation, *Arthritis Rheum.* 41 (1998) 1331-1342
- 4 N.J. Berner, R.L. Ingermann, Role of sialic acid in exogenous protein accumulation and water retention by the egg jelly of the salamander *Ambystoma macrodactylum*, *Journal of Experimental Zoology* 256 (1990) 38-43
- 5 Z. Laver-Rudich , M. Silbermann, Cartilage surface charge. A possible determinant in aging and osteoarthritic processes, *Arthritis Rheum.* 28 (1985) 660-670
- 6 T. Tallheden, C. Karlsson, A. Brunner, J. Van der Lee, R. Hagg, R. Tommasini, A. Lindahl, Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes, *Osteoarthr. Cartilage* 12 (2004) 525-535
- 7 I. Martin, M. Jakob, D. Schaefer, W. Dick, G. Spagnoli, M. Heberer, Quantitative analysis of gene expression in articular cartilage from normal and osteoarthritic joints, *Osteoarthr. Cartilage* 9 (2001) 112-118
- 8 K. Von der Mark, V. Gauss, H. Von der Mark, P. Muller, Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture, *Nature* 267 (1977) 531-532
- 9 D.G. Stokes, G. Liu, I.B. Coimbra, S. Piera-Velazques, R.M. Crawl, S.A. Jimenez, Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 402-419

- 10 M.B. Goldring, J.R. Birkhead, L.F. Suen, R. Yamin, S. Mizuno, J. Glowacki, J.L. Arbiser, J.F. Apperley, Interleukin-1 β -modulated gene expression in immortalized human chondrocytes, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 2307-2316
- 11 F. Finger, C. Schoerle, A. Zien, P. Gebhard, M. B. Goldring, T. Aigner, Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4 and C-28/I2, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 3395-3403
- 12 I.E. Liener, N. Sharon, I.J. Goldstein, *The lectins, Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, Academic Press, Orlando, FA, 1986
- 13 M. Schuenke, U. Schumacher, B. Tillmann, Lectin-binding in normal and fibrillated articular cartilage of human patellae, *Virchows Arch. A* 407 (1985) 221-231
- 14 S. Toegel, N. Harrer, V.E. Plattner, F.M. Unger, H. Viernstein, M.B. Goldring, F. Gabor, M. Wirth, Lectin binding studies on C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes provide a basis for new tissue engineering and drug delivery perspectives in cartilage research, *J. Control. Release* 117 (2007) 121-129
- 15 K.A. Nizheradze, Binding of wheat germ agglutinin to extracellular network produced by cultured human fibroblasts, *Folia Histochem Cytobiol.* 38 (4) (2000) 167-173
- 16 K. Takagi, T. Nakamura, J. Izumi, H. Saitoh, M. Endo, Characterization of hydrolysis and transglycosylation by testicular hyaluronidase using ion-spray mass spectrometry, *Biochemistry* 33 (1994) 6503-6507
- 17 K. Hiraishi, K. Suzuki, S. Hakomori, M. Adachi, Le y antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death), *Glycobiology* 3 (1993) 381
- 18 O.T. Keppler, M.E. Peter, S. Hinderlich, G. Moldenhauer, P. Stehling, I. Schmitz, R. Schwartz-Albiez, W. Reutter, M. Pawlita, Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus, *Glycobiology* 9 (1999) 557

- 19 S. Minamide, H. Naora, M. Adachi, A. Okano, H. Naora, Apoptosis as a mechanism of skin renewal: Le(y)-antigen expression is involved in an early event of a cell's commitment to apoptosis, *Histochem. Cell Biol.* 103 (1995) 339
- 20 N.L. Perillo, K.E. Pace, J.J. Seilhammer, L.G. Baum, Apoptosis of T cells mediated by galectin-1, *Nature* 378 (1995) 736
- 21 E. Rapaport, J. Le Pendu, Glycosylation alterations of cells in late phase apoptosis from colon carcinomas, *Glycobiology* 9 (1999) 1337
- 22 X. Yang, J. Yip, T. Anastassiades, M. arrison, I Brockhausen, The action of TNF α and TGF β include specific alterations of the glycosylation of bovine and human chondrocytes, *Biochem. Biophys. Acta* 1773 (2007) 264-272
- 23 T.J. Lyons, R.W. Stoddart, S.F. McClure, J.M. McClure, Lectin and other histochemical studies of the articular cartilage and the chondro-osseus junction of the normal human knee joint, *J. Mol. Hist.* 38 (2007) 13-23
- 24 S.E. Baldus, J. Thiele, Y.O. Park, F.G. Hanisch, J. Bara, R. Fischer, Characterization of the binding specificity of *Anguilla anguilla* agglutinin (AAA) in comparison to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I), *Glycoconjugate J.* 13 (1996) 585-590
- 25 K. Yamamoto, T. Tsuji, I. Matsumoto, T. Osawa, Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides to immobilized wheat germ agglutinin. *Biochemistry* 20 (1981) 5894-5899
- 26 N. Toda, A. Doi, A. Jimbo, I. Matsumoto, N. Seno, Interaction of sulphated glycosaminoglycans with lectins, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5345-5349
- 27 S. Hoedt-Schmidt, A. Scheid, D.A. Kalbhen, Histomorphological and lectin-histochemical confirmation of the antidegenerative effect of diclofenac in experimental osteoarthritis, *Arzneimittelforschung* 39 (1989) 1212-1219

- 28 M. Cohen, E. Klein, B. Geiger, L. Addadi, Organization and adhesive properties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells, *Biophys. J.* 85 (2003) 1996-2005
- 29 H.E. Carlsson, J. Lonngren, I.J. Goldstein, J.E. Christner, G.W. Jourdian, The interaction of wheat germ agglutinin with keratan from cornea and nasal cartilage, *FEBS Letters* 62 (1976) 38-40
- 30 F. Gabor, M. Stangl, M. Wirth, Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on enterocyte-like cell lines Caco-2, HAT-29 and HCT-8, *J. Control. Release* 55 (1998) 131-142
- 31 F. Gabor, E. Bogner, A. Weissenboeck, M. Wirth, The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 459-480
- 32 A. Weissenboeck, E. Bogner, M. Wirth, F. Gabor, Binding and uptake of wheat germ agglutinin-grafted PLGA-nanospheres by caco-2 monolayers, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1917-1923
- 33 A. Weissenboeck, M. Wirth, F. Gabor, WGA-grafted PLGA-nanospheres: preparation and association with Caco-2 single cells, *J. Control. Release* 99 (2004) 383-392
- 34 D.A. Grande, C. Halberstadt, G. Naughton, R. Schwartz, R. Manji, Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts, *J. Biomed. Mater. Res.* 34 (1997) 211-220
- 35 V.F. Sechriest, Y.J. Miao, C. Niyibizi, A. Westerhausen-Larson, H.W. Matthew, C.H. Evans, F.H. Fu, J.K. Suh, GAG-augmented polysaccharide hydrogel a novel biocompatible material to support chondrogenesis, *J. Biomed. Mater. Res.* 49 (2000) 534-541

- 36 W. Xia, C. Liu, W. Zhong, D. Liu, J. Wu, K. Chua, Y. Cao, Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan –gelatine complex scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res., B Appl. Biomater.* 71B (2004) 373-380
- 37 Y.C. Wang, S.H. Kao, H.J. Hsieh, A chemical surface modification of chitosan by glycoconjugates to enhance the cell-biomaterial interaction, *Biomacromolecules* 4 (2003) 224-231

Figure captions

Figure 1. Saturation analysis of lectin-binding sites on C-28/I2 chondrocyte monolayers with fluorescein-labelled *Wheat Germ* agglutinin (WGA), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Solanum tuberosum* lectin (STL), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Ulex europaeus* isoagglutinin-I (UEA), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and *Peanut* agglutinin (PNA) related to an apparent fluorescein/protein ratio of 1 (mean $\pm$ SD, n=4). Confluent cell monolayers were incubated with a dilution series of the respective fluorescein-labelled lectin (3.125 – 200 pmol in PBS) for 60 min at 4°C. The significant difference (p<0.05) between WGA and other lectins at 50 pmol is marked with an asterisk.

Figure 2. Saturation analysis of lectin-binding sites on T/C-28a2 chondrocyte monolayers with fluorescein-labelled *Wheat Germ* agglutinin (WGA), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Solanum tuberosum* lectin (STL), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Ulex europaeus* isoagglutinin-I (UEA), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and peanut agglutinin (PNA) related to an apparent fluorescein/protein ratio of 1 (mean $\pm$ SD, n=4). Confluent cell monolayers were incubated with a dilution series of the respective fluorescein-labelled lectin (3.125 – 200 pmol in PBS) for 60 min at 4°C. The significant difference (p<0.05) between WGA and other lectins at 50 pmol is marked with an asterisk.

Figure 3. Fold increase of fluorescence intensities of WGA, STL and PNA (50 pmol) on confluent T/C-28a2 monolayers following neuraminidase treatment (mean $\pm$ SD, n=3) as compared to untreated control samples. Significantly increased values (p<0.05) are marked with an asterisk.

Table 1. Sources, specificities and possible target structures at chondrocyte cultures of lectins used.

Table 2. Competitive inhibition of lectin binding (25 pmol) to confluent C-28/I2 or T/C-28a2 cell monolayers by addition of increasing amounts of complementary carbohydrate. Results are presented as percent inhibition (mean $\pm$ SD, n=4) as compared to control samples without sugar representing 100% lectin-binding. IC₅₀ values represent the amount of complementary carbohydrate necessary for a 50% inhibition of the lectin-binding (25pmol) to confluent cell monolayers.

Lectin	Source	Binding specificity	Target structure
WGA	<i>Triticum vulgare</i> /wheat germ	N,N',N"- triacetylchitotriose > GlcNAc > sialic acid	hybrid-type N-glycans, keratan sulfate, hyaluronan
STL	<i>Solanum tuberosum</i> /potato	N-peracetylated chito-oligosaccharides	keratan sulfate
LCA	<i>Lens culinaris</i> /lentil	D-mannose	high-mannose type N-glycan
SNA	<i>Sambucus niger</i> /elder	sialic acid α 2-6Gal-	sialic acid caps of complex-type N-glycan
DBA	<i>Dolichus biflorus</i> /horse gram	GalNAc-	first step of O-glycosylation pathway
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> /peanut	Gal β 1-3GalNAc-	unmodified O-glycan core 1
UEA	<i>Ulex europaeus</i> /gorse	Fuca1-2Gal β 1-4GlcNAc-	fucosylated O-glycan

Table 1. Sources, specificities and possible target structures at chondrocyte cultures of lectins used.

Lectin + inhibiting sugar	C-28/I2			T/C-28a2		
	Sugar [c] in μmol/reaction	% inhibition	IC ₅₀	Sugar [c] in μmol/reaction	% inhibition	IC ₅₀
WGA + GlcNAc	1	32.1±13.5	1.75	1	48.7±6.6	1.1
	2	52.7±8.0		2	63.0±16.4	
	4	70.9±4.4		4	80.1±15.1	
	8	79.1±3.7		8	85.6±13.0	
	16	91.7±1.6		16	89.8±14.6	
WGA + chitotriose	0.00195	14.7±2.2	0.005	0.00195	15.3±9.4	0.005
	0.00391	35.3±4.6		0.00391	39.7±11.7	
	0.00781	74.3±4.7		0.00781	74.3±9.6	
	0.01563	88.2±1.9		0.01563	83.5±12.1	
	0.03125	96.1±1.3		0.03125	91.3±12.6	
WGA + Hyaluronan oligosaccharides	0.021	31.1±3.1	0.15	0.0412	7.2±2.5	0.32
	0.0412	37.5±3.4		0.083	28.9±5.4	
	0.167	52.0±12.5		0.167	38.9±2.9	
	0.33	66.8±1.8		0.33	50.6±3.4	
	1.33	79.7±0.1		1.33	78.3±5.9	
STL + GlcNAc	8	27.4±4.8	15	8	29.6±4.4	30.0
	16	54.7±6.2		16	43.4±11.7	
	32	56.3±16.4		32	52.0±8.3	
	64	78.4±6.5		64	69.3±1.6	
	128	93.2±5.1		128	89.8±6.7	
STL + chitotriose	0.0078	28.5±7.4	0.02	0.0078	50.6±2.0	0.0078
	0.0156	44.8±5.2		0.0156	64.3±1.1	
	0.03125	62.7±8.6		0.03125	78.0±5.7	
	0.0625	79.4±7.0		0.0625	81.6±2.9	
	0.125	88.6±3.1		0.125	88.3±3.3	
LCA + mannose	4	54.6±2.2	2.5	4	26.8±1.7	15.3
	8	70.2±7.3		8	35.3±1.6	
	16	76.2±2.9		16	52.8±5.9	
	32	85.8±3.8		32	70.7±1.5	
	64	94.7±0.4		64	80.5±2.8	
UEA + fucose	0.0625	33.6±6.6	0.1	0.0625	38.2±9.9	0.08
	0.125	54.8±8.3		0.125	61.2±5.4	
	0.25	66.3±14.1		0.25	67.2±11.3	
	0.5	72.2±6.9		0.5	77.3±7.9	
	1	80.5±2.7		1	79.9±2.6	
UEA + Hyaluronan oligosaccharides	0.021	-	-	0.0412	17.8±4.3	-
	0.0412	25.7±4.7		0.083	18.7±9.9	
	0.167	9.3±1.7		0.167	-	
	0.33	-		0.33	37.1±18.3	
	1.33	40.0±14.1		1.33	-	
PNA + Galactosamine	0.0625	39.0±2.7	0.18	0.0625	5.5±1.8	0.325
	0.125	43.7±3.0		0.125	31.0±15.9	
	0.25	55.7±7.0		0.25	41.4±6.8	
	0.5	61.2±4.1		0.5	65.8±14.6	
	1	74.1±5.5		1	80.2±6.8	

Table 2. Competitive inhibition of lectin binding (25 pmol) to confluent C-28/I2 or T/C-28a2 cell monolayers by addition of increasing amounts of complementary carbohydrate. Results are presented as percent inhibition (mean±SD, n=4) as compared to control samples without sugar representing 100% lectin-binding. IC₅₀ values represent the amount of complementary carbohydrate necessary for a 50% inhibition of the lectin-binding (25pmol) to confluent cell monolayers.

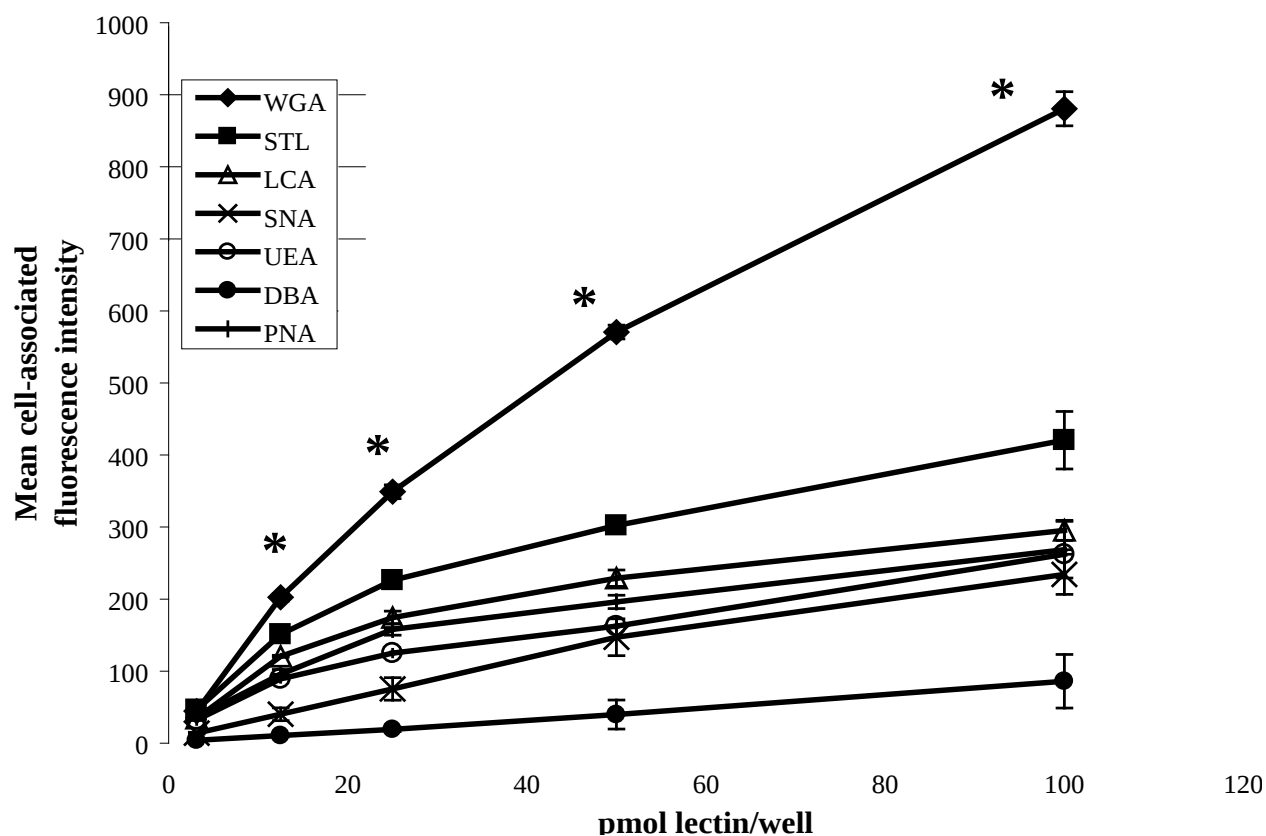


Figure 1. Saturation analysis of lectin-binding sites on C-28/I2 chondrocyte monolayers with fluorescein-labelled *Wheat Germ* agglutinin (WGA), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Solanum tuberosum* lectin (STL), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Ulex europaeus* isoagglutinin-I (UEA), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and peanut agglutinin (PNA) related to an apparent fluorescein/protein ratio of 1 (mean $\pm$ SD, n=4). Confluent cell monolayers were incubated with a dilution series of the respective fluorescein-labelled lectin (3.125 – 200 pmol in PBS) for 60 min at 4°C. The significant difference ($p<0.05$) between WGA and other lectins at 50 pmol is marked with an asterisk.

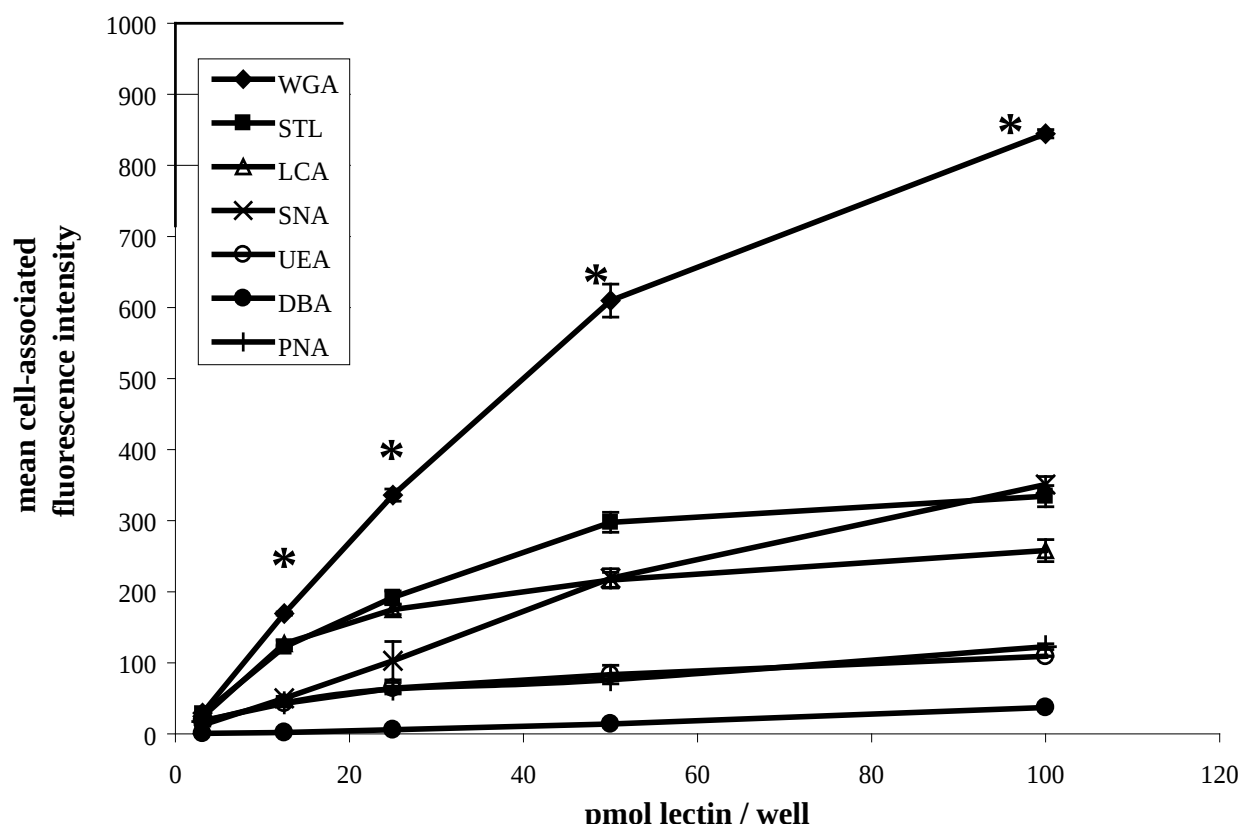


Figure 2. Saturation analysis of lectin-binding sites on T/C-28a2 chondrocyte monolayers with fluorescein-labelled *Wheat Germ* agglutinin (WGA), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Solanum tuberosum* lectin (STL), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Ulex europaeus* isoagglutinin-I (UEA), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and peanut agglutinin (PNA) related to an apparent fluorescein/protein ratio of 1 (mean $\pm$ SD, n=4). Confluent cell monolayers were incubated with a dilution series of the respective fluorescein-labelled lectin (3.125 – 200 pmol in PBS) for 60 min at 4°C. The significant difference ($p < 0.05$) between WGA and other lectins at 50 pmol is marked with an asterisk.

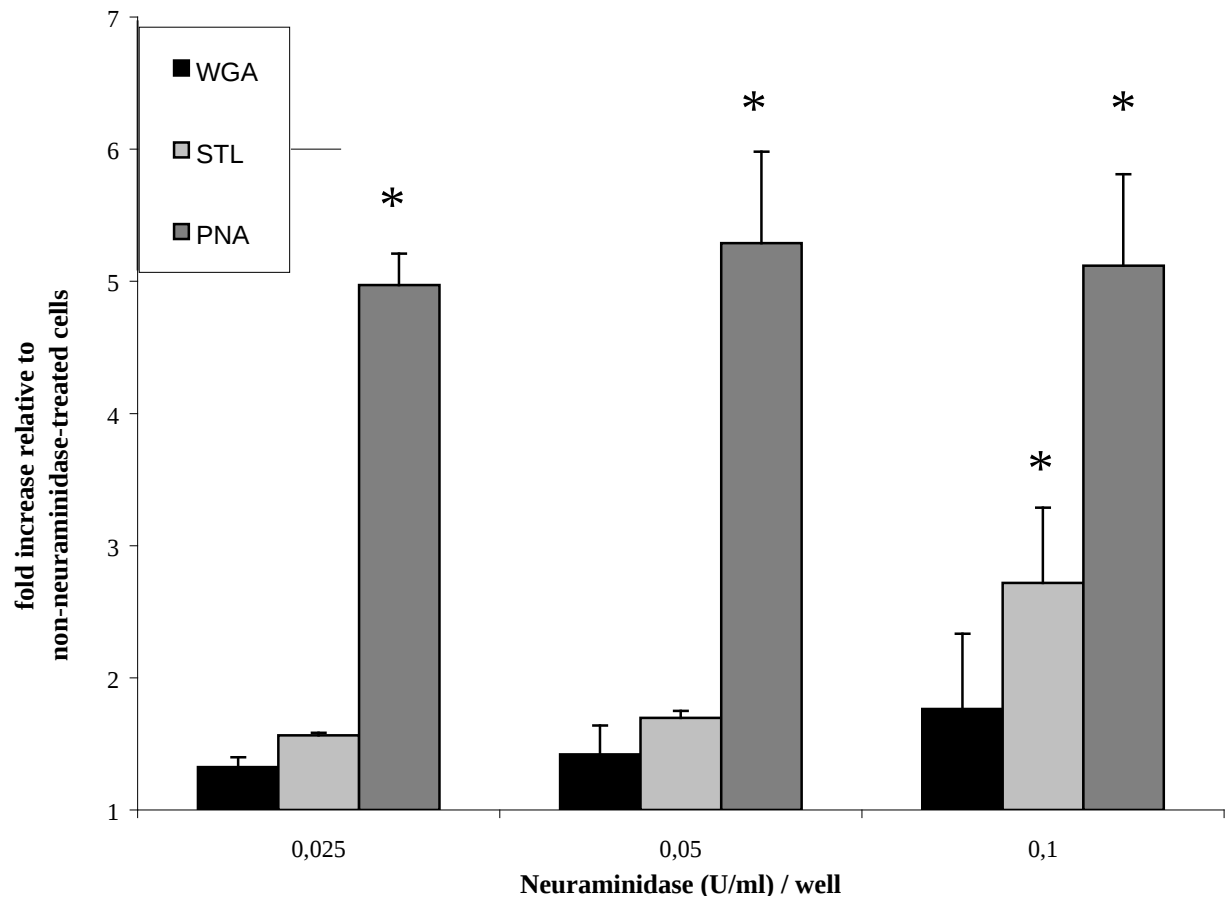


Figure 3. Fold increase of fluorescence intensities of WGA, STL and PNA (50 pmol) on confluent T/C-28a2 monolayers following neuraminidase treatment (mean $\pm$ SD, n=3) as compared to untreated control samples. Significantly increased values ($p < 0.05$) are marked with an asterisk.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alexander Hifnawy

Eltern: Mag. pharm. Lieselotte Maria Hifnawy, geb. Prochaska

Mag. pharm. Mustafa Nabih Elsayed Hifnawy

Geburtsdatum: 05.02.1977

Geburtsort: Linz, Oberösterreich

Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

1988-1992: Internes Stiftsgymnasium Kremsmünster

1992-1996: Bundesrealgymnasium Schloss Wagrain in Vöcklabruck

1997-2008: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Beschäftigungen

1995: Tätigkeit bei Hestag Arzneiwarengroßhandlung Ges.m.b.H. (1 Monat)

2001-2008: Geringfügig beschäftigt in der Apotheke z.Hl. Barbara Ampflwang

WS 2006: Tutorium für Galenische Übungen