

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Teil der Arbeit wurde auf Grundlage der SPR-Technologie ein L-Selektin-abhängiger Bindungsassay entwickelt, etabliert und standardisiert. In Weiterentwicklung eines statischen ELISAs erfolgte die Immobilisierung eines Liganden, hier des artifiziiellen Selektinliganden SiaLe<sup>x</sup>-PAA-sTyr, auf der Oberfläche eines Sensor Chips. Unter dynamischen Flussbedingungen folgten anschließend Bindungsmessungen mit multivalentem L-Selektin. Im Rahmen der Standardisierung des Bindungsassays wurden verschiedene Bedingungen ausgetestet, wie die eingesetzten L-Selektin-Mengen, die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und der pH-Wert. Das Testsystem diente in den weiteren Teilen der Arbeit zur Untersuchung von L-Selektin-Inhibitoren und von Liganden dieses Adhäsionsrezeptors.

Im Kontext von Inhibitionsuntersuchungen konnte mit dem entwickelten SPR-Assay beispielsweise die Bedeutung der gleichzeitigen Präsentation von SiaLe<sup>x</sup> oder SiaLe<sup>a</sup> und Tyrosinsulfaten auf einem gemeinsamen Polyacrylamid-Trägermolekül aufgezeigt werden. Der neue Bindungsassay konnte auch dazu verwendet werden, um neue L-Selektin-Liganden zu ermitteln. So wurden Efomycin M und dendrimerartig verzweigte Polyglycerolsulfate (dPGS) als L-Selektin-spezifische Liganden identifiziert. In kompetitiven Bindungstests zeigten diese Substanzen stark inhibitorische Effekte. Zur weiteren Validierung der inhibitorischen Wirkung wurde deren Einfluss auch auf der Ebene der Zell-Zell-Interaktion untersucht: Im Rahmen von Flusskammermessungen wurde die Bindung von L-Selektin-exprimierenden NALM-6-Zellen an immobilisierte Endothelzellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  untersucht. Die inhibitorische Wirkung unterschiedlicher Substanzen wurde durch Vorinkubation der NALM-6-Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen getestet.

Im dritten Teil der Arbeit wurde ein Sequenzmotiv des in der Arbeitsgruppe als L-Selektin-Liganden identifizierten Hsc70 [Bernhard *et al.*, 2007] kloniert und in einem für die Expression von L-Selektin-Liganden besonders geeigneten Zellsystem exprimiert. Das rekombinante Protein zeigte in einem eigens hierfür entwickelten SPR-Bindungsassay starke L-Selektin-Bindung. Zum Vergleich wurde parallel ein Referenzligand entwickelt, der das Selektinbindungsmotiv des gut charakterisierten Liganden PSGL-1 trägt.

### 4.1 Etablierung und Standardisierung eines L-Selektin-abhängigen Bindungsassays

Ein Ziel dieser Arbeit war die Durchführung von Inhibitionsuntersuchungen unter annähernd physiologischen Flussbedingungen. Dazu war zunächst die Etablierung eines neuen Bindungsassays für die Untersuchung der L-Selektin-Ligand-Bindung auf molekularer Ebene erforderlich. Während ein bisher in der Arbeitsgruppe verwendeter ELISA die Bindung nur unter statischen Bedingungen erfasste, bestand durch die Verwendung der SPR-Technologie die Möglichkeit, die Rezeptor-Ligand-Interaktion unter dynamischen Bedingungen zu messen. Die Formation und Dissoziation von biomolekularen Komplexen wird hierbei auf einem Sensor Chip unmittelbar registriert, wenn eine Interaktion stattfindet. Der Ligand ist über kovalente Kopplungschemie auf einem Sensor Chip immobilisiert, während der Rezeptor sich in Lösung befindet. Unter kontinuierlichen Flussbedingungen war ein Ziel die direkte Messung einer Interaktion von L-Selektin mit Liganden auf molekularer Ebene bzw. es sollten Substanzen mit Potential zur Hemmung einer solchen Interaktion untersucht werden.

Für die Etablierung eines L-Selektin-abhängigen SPR-Bindungsassays wurde eine neue Klasse von synthetischen Selektinliganden verwendet. Diese Ligandenkonjugate, in der Literatur auch als Neoglykokonjugate bezeichnet, wurden von Bovin *et al.* entwickelt [Bovin *et al.*, 1993; Bovin, 1998] und waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits in einer Reihe von Untersuchungen in ihrem Bindungsverhalten zu E- und P-Selektin charakterisiert worden [Weitz-Schmidt *et al.*, 1996; Game *et al.*, 1998; Pochechueva *et al.*, 2002; Pochechueva *et al.*, 2003]. Sie bestehen aus einem linearen, auf Polyacrylamid (PAA)-basierenden Trägermolekül, welches einige vorteilhafte Eigenschaften besitzt. PAA ist wasserlöslich, stabil, flexibel und bindet nicht an Zelloberflächen [Galanina *et al.*, 1998]. Aufgrund der Flexibilität des Moleküls besitzt es gleichzeitig auch *Spacerfunktion*. Somit reichen kurze  $(\text{CH}_2)_2$ - oder  $(\text{CH}_2)_3$ -*Spacer* für die Kopplung von Liganden aus, um deren Zugänglichkeit für einen Rezeptor zu gewährleisten. Die Synthese erlaubt zudem die Kopplung weiterer Substituenten wie Biotin, Fluorescein, Allylgruppen, Digoxigenin,  $^3\text{H}$  oder radioaktives Iod.

Für den Aufbau eines L-Selektin-abhängigen Bindungsassays wurde der Selektinminimalligand Sialyl Lewis x ( $\text{SiaLe}^x$ ) zusammen mit Tyrosinsulfaten (sTyr) auf PAA-Trägermolekülen immobilisiert. Das molare Verhältnis zum PAA-Trägermolekül (30 - 40 kDa) betrug für  $\text{SiaLe}^x$  20 mol% bzw. 5 mol% für sTyr. Zusätzlich war dieser

artifizielle Ligand mit Biotinmolekülen (5 mol%) versehen, was die Immobilisierung auf der Oberfläche eines mit Streptavidin vorbeschichteten Sensor Chip ermöglichte.

#### 4.1.1 Aviditätssteigerung von L-Selektin

Aus Vorerfahrungen mit Testmessungen über SPR war bekannt, dass die Bindung der monovalenten Form von L-Selektin an den artifiziellen Liganden SiaLe<sup>x</sup>-PAA-sTyr bei nur vergleichsweise hohen Proteinkonzentrationen im mikro- bis millimolaren Bereich nachweisbar ist. Eine Möglichkeit Affinität und Avidität zu erhöhen, war die Anhebung von Bindungswerten. Bivalentes L-Selektin-IgG bindet beispielsweise bei Proteinkonzentrationen im nanomolaren Bereich (eigene Daten). Der IgG Fusionsanteil einer solchen Chimäre wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu genutzt, die Bindungswerten noch weiter zu erhöhen. Dies erfolgte über die Inkubation mit IgG-spezifischen Antikörpern zur Erzeugung oligomerer L-Selektin-Komplexe. Durch diese Oligomerisierung der Ligandenbindungsstelle von L-Selektin konnte eine deutliche Steigerung des Bindungssignals in Relation zur eingesetzten L-Selektin-Menge erzielt werden. In Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper wie auch von der eingesetzten Antikörpermenge war das Bindungssignal unterschiedlich stark (Abb. 5). Die Abhängigkeit der Signalstärke vom verwendeten Antikörper konnte auf unterschiedliche Lagerungszeiträume und zusätzliche Modifikationen (z. B. HRP-Kopplung) der Antikörper zurückgeführt werden.

Das Antigen-Antikörper-Mengenverhältnis hatte ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Signalstärke der Bindung. Diese Beobachtung war durch einen sog. Prozoneneffekt gekennzeichnet, den Heidelberger und Kendall bereits 1935 mehrfach beschrieben hatten („Heidelberger Kurve“) [Heidelberger *et al.*, 1935a-d]. Je nach Verhältnis von Antigen zu Antikörper stellt sich ein maximales Immunpräzipitat ein. Bei maximaler Präzipitation enthält der Überstand nach einer Sedimentation weder Antigen noch Antikörper, d. h. Antikörper und Antigen sind *in toto* kreuzvernetzt sedimentiert. Die Zone mit der maximalen Präzipitation wird als Zone der Äquivalenz bezeichnet, d. h. der Äquivalenz von Epi- und Paratop. Rechts und links von der Zone der Äquivalenz enthält die Lösung nach Sedimentation entweder Antikörper (Zone des Antikörperüberschusses) oder lösliches Antigen (Zone des Antigenüberschusses). „Die maximale Präzipitation ist bei Epi- und Paratop-Äquivalenz bei jedem Antigen-Antikörper-System verschieden und sowohl abhängig von der Valenz der Antigene als auch der Anzahl der in einem Antiserum enthaltenen spezifischen Paratope. Es ist

daher verständlich, dass der exakte Äquivalenzpunkt nicht über die Molarität der Reaktionspartner ermittelt werden kann [Linke, 1998 (S.78)]“.

Um die Bindungswerten noch weiter zu erhöhen und damit der physiologischen *Clustering* von L-Selektin möglichst nahe zu kommen [Picker *et al.*, 1991b; Erlandsen *et al.*, 1993; Hasslen *et al.*, 1995], wurde eine Immobilisierung von L-Selektin-IgG auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel getestet. Diese L-Selektin tragenden Goldnanopartikel konnten erfolgreich im SPR-Bindungsassay eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass mit einer vergleichsweise geringen Menge von L-Selektin-IgG sehr hohe Signalstärken erzielt werden konnten (Abb. 6). Diese Art der Valenzsteigerung wurde daraufhin für den zu etablierenden und standardisierenden SPR-Bindungsassay fortlaufend angewendet.

### 4.1.2 Bindungsparameter von L-Selektin

Eine verlässliche Standardisierung des Assays war erforderlich, um für Inhibitionsuntersuchungen reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Für die Standardisierung des Bindungsassays wurden weitere Parameter untersucht und festgelegt. Aufbauend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde eine Fließgeschwindigkeit von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  übernommen [G. Harms, Dissertationsschrift 2002]. Die Temperatur wurde auf 25°C eingestellt. Dies entsprach den Standardeinstellungen einer Vielzahl von SPR-Untersuchungen in der Literatur. Sowohl Fließgeschwindigkeit als auch Temperatur stellten sich auch bei den eigenen Voruntersuchungen als geeignet heraus, so dass eine Änderung mit Fortgang der Experimente nicht mehr vollzogen wurde. Weiterhin wurden unterschiedliche Probenvolumina und Proteinmengen verglichen, mit dem Ziel, bei möglichst geringem Materialverbrauch ausreichend starke Bindungssignale zu erhalten. Diese Untersuchungen zeigten, dass bei einer Proteinkonzentration von 0,6 ng/ $\mu\text{l}$  bei einem Probenvolumen von 35  $\mu\text{l}$  ausreichende Bindungssignale erreicht wurden (Abb. 12+13).

Weiterhin war bekannt, dass die Bindung von L-Selektin sowohl pH-Wert-abhängig als auch calciumabhängig ist. Dies wurde in weiteren Untersuchungen überprüft. So konnte für die Bindung ein pH-Optimum von pH 7,4 ermittelt werden (Abb. 14), während die Gegenwart von 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  im Puffer zu optimaler Bindungsaktivität führte (Abb. 15).

#### 4.1.3 Biologische Aktivität und Stabilität von rekombinantem L-Selektin

Für den SPR-basierten Adhäsionsassay wurde rekombinantes L-Selektin-IgG eingesetzt. Dieses rekombinante Protein wurde in unterschiedlichen Zelllinien hergestellt und verschieden lang gelagert. Im Zuge der Standardisierung des SPR-Bindungsassays wurde die biologische Aktivität und die Stabilität verschiedener Chargen von L-Selektin-IgG untersucht. Die Analyse mittels SPR-Bindungsassay (Abb. 7A), SDS-PAGE-Analyse mit Silberfärbung (Abb. 7B) und Western Blot (nicht gezeigt) zeigte deutliche Qualitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Chargen. Die Aufarbeitungen enthielten mit unterschiedlichem Anteil Degradationsbanden des L-Selektin-IgG Fusionsproteins. Die Stärke der Bindungsaktivität korrelierte dabei mit der Stärke der Proteinbande, die zwischen der 85 kDa und 100 kDa Markerbande lokalisiert war (Abb. 7B). Je stärker diese Proteinbande im SDS-Gel, desto höher war die Bindungsaktivität. Die weiteren im Gel stark gefärbten Proteinbanden (50 kDa und 80 kDa) stellen nicht funktionelles L-Selektin-IgG Fusionsprotein dar, welches sich im Western Blot zum Teil noch mit L-Selektin-spezifischem Antikörper oder aber *Fcy*-spezifischem Antikörper detektieren ließ. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde durchgehend eine Charge (07/2001) eingesetzt.

Da die Überprüfung der verschiedenen Chargen deutliche Qualitätsunterschiede offenbarte, wurde in einem Lagerungsexperiment die Haltbarkeit einer L-Selektin-IgG-Charge nach Zugabe verschiedener Proteasehemmer und Stabilisatoren über einen längeren Zeitraum beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass nach ca. 20 Wochen eine Abnahme der Intensität der 95 kDa großen L-Selektin-IgG Bande zu beobachten war. Die verwendeten Zusätze, sogenannte „chemische Chaperone“, hatten keinen stabilisierenden Einfluss, wohl aber ein Proteasehemmergemisch („*complete*“, Roche Diagnostics, Mannheim). Um proteolytische Degradationsprozesse möglichst gering zu halten, wurden für nachfolgende Untersuchungen L-Selektin-IgG-Chargen nach deren Herstellung sofort aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 4.1.4 Einfluss von Sialinsäuren auf die L-Selektin-Bindung

Neben L-Selektin-IgG exprimiert in der myeloiden humanen Zelllinie K-562 konnte auf L-Selektin-IgG exprimiert in CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*-Zelllinie) und auf

L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen (Maus-Myeloma-Zelllinie, kommerziell erhältlich bei R&D Systems, Wiesbaden) zurückgegriffen werden. Da mit der Expression in unterschiedlichen Zelllinien oftmals auch eine unterschiedliche Glykosylierung einhergeht, wurden die L-Selektin-Proben hinsichtlich ihrer Sialylierung untersucht. Sialinsäuren können Einfluss auf die Gesamtladung eines Proteins haben und somit dessen Bindungseigenschaften beeinflussen. Zum Nachweis einer Sialylierung wurden die L-Selektin-Proben mit einer  $\alpha$ 2-3,6,8 Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* inkubiert und anschließend sowohl mittels SDS-PAGE als auch im SPR-Bindungsassay untersucht. In der SDS-PAGE konnte für L-Selektin-IgG aus den Zelllinien K-562 und CHO nach Neuraminidaseverdau eine Abnahme des apparenten Molekulargewichts festgestellt werden, als Hinweis auf eine Desialylierung. Für L-Selektin aus der Zelllinie NS0 konnte nach einem Neuraminidaseverdau hingegen keine Veränderung des apparenten Molekulargewichts festgestellt werden. Dies deutete darauf hin, dass diese murine Zelllinie keine oder nur eine geringe Sialylierung durchzuführen vermag.

Anschließende SPR-Bindungsanalysen zeigten für L-Selektin-IgG aus K-562- und CHO-Zellen nach Neuraminidaseverdau eine Zunahme der Bindungsaktivität. Die Entfernung negativ geladener Sialinsäuren resultiert in einer positiveren Gesamtladung des Proteins und in der Folge wahrscheinlich in der stärkeren Bindung an negativ geladene Liganden wie SiaLe<sup>x</sup>. Für L-Selektin-IgG aus der Zelllinie NS0 wurde eine ähnliche Steigerung der Bindungsaktivität erwartet, war aber entgegen den Erwartungen schwächer als die aus K-562- und CHO-Zellen. In der SDS-PAGE-Analyse konnten proteolytische Fragmente beobachtet werden, die vermutlich die Abnahme der Bindungsaktivität zu Grunde legen (Abb. 9).

Um die Annahme zu untersuchen, dass der Sialyierungsgrad rekombinanten L-Selektins Einfluss auf dessen Bindungsaktivität hat, wurde L-Selektin-IgG Fusionsprotein in der Zelllinie CHO in und ohne Gegenwart des Zuckervorläufers *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) exprimiert. Ein zusätzliches Angebot an ManNAc bewirkte eine letztendlich mehr als doppelt so hohe Sialylierung (Abb. 11) und damit eine stärkere negative Gesamtladung des Proteins. Im SPR-Bindungsassay zeigte sich anschließend eine schlechtere Bindungsaktivität dieses hypersialylierten L-Selektins. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Glykosylierung von L-Selektin die Bindungsaktivität dieses Adhäsionsrezeptors moduliert.

## 4.2 Untersuchung von Inhibitoren der L-Selektin-Ligand-Bindung

Die Entzündungsreaktion wird physiologischerweise durch Gewebsverletzungen, Invasion von Mikroorganismen oder anderen Gewebsschädigungen ausgelöst. Die dabei zugrunde liegenden Mechanismen treten in ähnlicher Weise bei Erkrankungen wie Hypersensitivitätsreaktion, Autoimmunerkrankung und Ischämie-Reperfusionsschäden auf [Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2001]. Im Fall solcher Erkrankungen ist die Aktivierung von Leukocyten, die das Ziel hat, Bakterien zu vernichten und geschädigtes Gewebe abzubauen, fehlgeleitet und verursacht eine Schädigung von gesunden Zellen und Matrixkomponenten. In der Therapie dieser Entzündungserkrankungen kommt antiinflammatorischer Pharmaka eine große klinische Bedeutung zu. Diese sind jedoch oft begrenzt effektiv und erzeugen unerwünschte Nebenwirkungen. Daher wird intensiv nach spezifischen und potenten Blockern der Entzündungsreaktion gesucht.

Die Rekrutierung von Leukocyten während einer Entzündungsreaktion erfolgt über ein koordiniertes Zusammenspiel verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Leukocyten einerseits und Endothelzellen postkapillarer Venolen andererseits. Aufgrund der zentralen Bedeutung von Leukocyten während einer Entzündungsreaktion erscheint das pharmakologische Blockieren der Funktion von „Schlüsselmolekülen“ bei der Rekrutierung von Leukocyten eine vielversprechende Strategie für die therapeutische Intervention bei inflammatorischen Erkrankungen.

Als ein solches „Schlüsselmolekül“ der Adhäsionskaskade gilt L-Selektin. Im Rahmen von Inhibitionsuntersuchungen wurde daher in der vorliegenden Arbeit versucht, die Wirkung von Oligosacchariden und Glykomimetika auf die Bindungsfunktion von L-Selektin zu charakterisieren. Die Durchführung der Inhibitionsuntersuchungen erfolgte sowohl auf der Ebene von Molekül-Molekül-Wechselwirkungen mittels SPR-Bindungsanalysen wie auch auf der Ebene von Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen von Flusskammermessungen.

### 4.2.1 L-Selektin-Inhibitoren auf der Basis kleiner Moleküle

Heutzutage gehört die große Mehrheit der klinisch verwendeten Wirkstoffe der Gruppe von Substanzen an, die ein Molekulargewicht von  $500 \text{ g mol}^{-1}$  oder weniger besitzen. Sie haben in der Regel eine kurze Halblebenszeit und besitzen hohe *Clearance*-Raten. Diese sog. *Small Molecules* können in großer Anzahl, oft aber nur in monovalenter Form mit einem Rezeptor interagieren. In ihrer Anwendung verteilen sie sich schnell in

gesundem Gewebe und gleichmäßig innerhalb des gesamten Körpers. So erreichen bereits geringe Mengen dieser Substanzen ihren Zielort. Die Identifizierung von niedrigmolekularen Substanzen, die antiinflammatorisch wirken könnten, stellt deshalb ein attraktives Ziel hinsichtlich der Entwicklung neuer antiinflammatorischer Therapeutika dar.

### 4.2.1.1 Efomycin M

Im Jahr 2002 wurden erstmals die aus *Streptomyces BS1261* isolierten Efomycine als neue Mitglieder selektiver *Small Molecule*-Inhibitoren von E- und P-Selektin identifiziert [Schön *et al.*, 2002]. Besonders Efomycin M (MW 722 g mol<sup>-1</sup>) zeigte hierbei einen selektiv inhibitorischen Effekt auf die E- und P-Selektin-vermittelte Adhäsion von Leukocyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Der Einfluss auf die Bindungsfunktion von L-Selektin war mangels geeigneter Untersuchungsmethoden nicht analysiert worden. Mit dem SPR-Bindungsassay zur Identifizierung von L-Selektin-spezifischen Inhibitoren konnte erstmals die inhibitorische Wirkung von Efomycin M auf L-Selektin-abhängige Bindungen geprüft werden. Dies erfolgte zum einen in Kooperation mit Prof. Dr. M. Schön (Universität Würzburg, Rudolf-Virchow-Zentrum) sowie in unabhängigen Messungen in Kooperation mit Dr. A. von Bonin (Schering AG Berlin). Von beiden Kooperationspartnern wurde jeweils unterschiedliche Chargen von Efomycin M zur Verfügung gestellt.

In kompetitiven Bindungsuntersuchungen wurde auf Protein A-Goldnanopartikel immobilisiertes L-Selektin-IgG mit verschiedenen Konzentrationen von Efomycin M vorinkubiert, anschließend wurde seine Bindung an SiaLe<sup>x</sup>-PAA-sTyr im standardisierten SPR-Bindungsassay gemessen. Hierbei zeigte sich ein deutlicher biphasischer, inhibitorischer Effekt auf die Bindungsfunktion von L-Selektin (Abb. 22). Dieser biphasische Verlauf wurde zunächst auf Effekte der begrenzten Löslichkeit von Efomycin M zurückgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass Efomycin M in hoher Konzentration (ab 300 µM) ausfällt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der „biphasische“ Verlauf sich nur mit der Efomycin M-Charge von Prof. M. Schön (Universität Würzburg), nicht aber mit einer zweiten Charge der Schering AG nachweisen ließ. Da beide Efomycin M-Chargen gemäß der vorliegenden Aussagen keine Verunreinigungen enthielten, beruht das unterschiedliche Verhalten möglicherweise auf Unterschieden im Efomycin M-Molekül, die wiederum auf

Unterschiede bei der Herstellung beruhen könnten. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden.

Der biphasische Verlauf der Hemmung durch eines der beiden Efomycin M-Chargen ist unklar; er könnte unter Berücksichtigung des symmetrischen Molekülaufbaus auf inhibitorische Aktivität zweier Bindungsstellen des Moleküls beruhen. Efomycin M besteht aus einem zentralen Ringmolekül, an dessen gegenüberliegenden Seiten sich zwei gleich aufgebaute Seitenketten anschließen [Schön *et al.*, 2002]. Aufgrund von computergestützten Strukturanalysen postulierten Schön *et al.* [2002], dass Efomycin M in den Übergangsbereichen vom Ringmolekül zur jeweiligen Seitenkette Strukturen ausbildet, die den relevanten Bindungsstrukturen von SiaLe<sup>x</sup> ähneln. Wäre dies zutreffend, so würden pro Efomycin M-Molekül zwei Bindungsstellen existieren. Bei Messungen im SPR-Bindungsassay liegt L-Selektin nach Immobilisierung auf Protein A-beschichteten Goldnanopartikel in multivalenter Form vor. Aufgrund der zwei potentiellen Bindungsstellen von Efomycin M bestünde die Möglichkeit, dass in einem kritischen Konzentrationsbereich die Efomycin M-Moleküle zu einer Vernetzung der mit L-Selektin-beschichteten Goldnanopartikel führen mit der Folge einer Signalverstärkung. Unter- und oberhalb eines solchen kritischen Konzentrationsbereichs wären nach dieser Hypothese inhibitorische Effekte zu beobachten. Bei Efomycin M der zweiten Charge (Dr. A. von Bonin, Schering AG), welches keinen biphasischen Verlauf zeigte, könnte eine dieser zwei postulierten Bindungsstellen sterisch nicht zugänglich sein und damit der Kreuzvernetzungseffekt nicht auftreten.

Aufgrund des inhibitorischen Effekts im SPR-Bindungsassay wurde die inhibitorische Wirkung von Efomycin M auch in der Flusskammer überprüft. L-Selektin-exprimierende NALM-6-Zellen wurden vor einer Messung mit einer bestimmten Konzentrationen Efomycin M vorinkubiert und anschließend deren Adhäsion auf entweder TNF- $\alpha$  stimulierten Endothel (HUVECs) (Abb. 36) oder in einem Alternativansatz auf mit Liganden beschichteten Deckgläschen (Abb. 38) gemessen. Hierbei konnte in beiden Ansätzen eine deutlich dosisabhängige Hemmung der Bindungsfunktion von L-Selektin gezeigt werden. Die Hemmwirkung von Efomycin M konnte somit auf der Ebene der Zell-Zell- bzw. der Zell-Ligand-Interaktion bestätigt werden.

In weiteren SPR-Analysen wurde die Hemmwirkung von Efomycin M auf die Bindungsfunktion von L-Selektin-IgG aus verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die L-Selektin-Bindung in Abhängigkeit von der Herkunft des Proteins unterschiedlich stark gehemmt wird. Die Unterschiede in der

Hemmwirkung stehen vermutlich in Zusammenhang mit posttranslationalen Modifikation, d. h. der Glykosylierung und eventuell des Faltungszustandes des Proteins. Getestet wurde die Hemmwirkung auf die Bindungsfunktion von L-Selektin-IgG aus K-562- und NS0-Zellen. Es zeigte sich, dass Efomycin M über den gesamten Messbereich stärkeren Einfluss auf die Bindung von L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen ausübte als auf die Bindung von L-Selektin-IgG aus K-562-Zellen. Wie gezeigt, wies L-Selektin-IgG aus K-562-Zellen einen höheren Grad an Sialinsäuren auf, was eine größere negative Gesamtladung des Proteins bedeutet. Aufgrund der negativen Eigenladung von Efomycin M fiel die Hemmwirkung auf die Bindungsfunktion von L-Selektin-IgG aus K-562-Zellen vermutlich deshalb geringer aus als auf die Bindungsfunktion von L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen. Die Wahl des Expressionssystems von Interaktionspartnern ist für Untersuchungen zur Hemmwirkung daher ein extrem wichtiger, aber generell oft eher vernachlässigter Aspekt.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Efomycin M zumindest für den gewählten Messbereich keine Hemmwirkung auf die Bindungsfunktion von E- und P-Selektin ausübte. Dieses Ergebnis steht im klaren Widerspruch zu den publizierten Ergebnissen von Schön *et al.*, wo gerade für diese beiden Mitglieder der Selektinfamilie eine bindungsbeeinflussende Eigenschaft von Efomycin M beobachtet werden konnte [Schön *et al.*, 2002]. Erklärbar wäre dies eventuell mit vermuteten sterischen Unterschieden zwischen Efomycin M-Chargen.

Aufgrund der vorliegenden Daten muss die Frage, ob Efomycin M die Bindungsfunktion der Selektine selektiv hemmt, als ungeklärt betrachtet werden. Auf der einen Seite konnten Schön *et al.* zeigen, dass Efomycin M die Interaktion von E- und P-Selektin mit SiaLe<sup>x</sup> tragenden Liganden wie CEA (*c*arcino-*e*mbyonic *a*ntigen) blockiert und in der Lage ist, durch diese Selektine vermitteltes Rollen von Leukocyten *in vivo* zu inhibieren. Die Wirkung von Efomycin M wurde zudem *in vivo* an zwei Psoriasis-Hautmodellen in der Maus bestätigt. Die dabei gezeigten inhibitorischen Effekte wurden auf eine Hemmung aller drei Selektine zurückgeführt [Schön *et al.*, 2002]. In dieser Original- und einer weiteren Veröffentlichung [Wienrich *et al.*, 2006a] zeigten Schön *et al.* einen computergestützten Vergleich von Efomycin M- und SiaLe<sup>x</sup>-Strukturen, die vermuten lassen, dass die mit SiaLe<sup>x</sup> vergleichbare Orientierung bindungsrelevanter Hydroxylgruppen von Efomycin M für die inhibitorische Aktivität von Efomycin M verantwortlich ist.

Der Hypothese eines auf alle Selektine wirkenden Inhibitors folgend, wurden durch von Bonin *et al.* [2006] weitere Untersuchungen zu Efomycin M durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten bestätigten eine antiinflammatorische Wirkung von Efomycin M *in vivo*, bestätigten jedoch nicht die Wirkung auf alle drei Selektine [von Bonin *et al.*, 2006]. Mit unterschiedlichen *in vitro* Assays, wie dem *Scintillation Proximity Assay* [Game *et al.*, 1998], einem selektinspezifischen Bindungs-ELISA, und mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten SPR-Bindungsassay, konnte eine Hemmung der Bindung von L-Selektin durch Efomycin M nachgewiesen, eine Hemmung der Bindung von E- und P-Selektin aber nicht bestätigt werden. Zudem kommen diese Autoren in weiterführenden Strukturuntersuchungen nicht zu dem Schluss, dass Efomycin M ein Glykomimetikum von SiaLe<sup>x</sup> darstellt [von Bonin *et al.*, 2006].

Während die Bindung von Efomycin M an P- und E-Selektin weiterhin kontrovers diskutiert wird, zeigten die SPR- und Flusskammer-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wie die Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Prof. M. Schön, Würzburg, und von Dr. A. von Bonin, Berlin, übereinstimmend, dass Efomycin M die Bindungsfunktion von L-Selektin hemmt. Dies wird durch andere Methoden bestätigt. So wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. M. Schön (Würzburg) intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluss von Efomycin M auf das L-Selektin-abhängige Rollen von Lymphocyten auf dem Gefäßendothel während des *Homings* in peripheres Lymphgewebe belegen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Efomycin M durch Blockade von L-Selektin in Versuchstieren T-Zell-vermittelte allergische Reaktion verhindern kann [Oostingh *et al.*, 2007]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest die L-Selektin-vermittelte Lymphocytenadhäsion durch das Makrolid Efomycin M sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* gehemmt werden kann. Die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus setzt die Aufklärung der Interaktion zwischen L-Selektin und Efomycin M auf der Ebene der Raumstrukturen voraus [Wienrich *et al.*, 2006b].

#### 4.2.1.2 Diadenosinpolyphosphate

Diadenosinpolyphosphate wurden erstmals 1966 beschrieben [Zamecnik *et al.*, 1966] und treten durchgängig innerhalb des gesamten Tierreichs auf. Die natürlich vorkommenden Diadenosinpolyphosphate der Struktur Ap<sub>n</sub>A (A=Adenosin; p=Phosphat; n=2-7) sind in die Klasse der *Small Molecule*-Substanzen einzuordnen

(MW 677-997 g mol<sup>-1</sup>) und konnten bisher in einer Vielzahl von Zellen, so in menschlichen Thrombocyten, Nebennieren, Hepatocyten, im ZNS, in der Plazenta, im Herzen und im Plasma nachgewiesen werden. Sie unterscheiden sich lediglich in der Anzahl der Phosphatgruppen. Diadenosinpolyphosphate zeigen eine Fülle physiologischer und pathophysiologischer Effekte. Hierzu zählen Wirkungen auf die Blutdruckregulation, die Stimulation der Proteinbiosynthese und Wirkungen auf Stoffwechselfunktionen wie die Gluconeogenese [Edgecombe *et al.*, 1997] und die Insulinsekretion [Ripoll *et al.*, 1996]. Weitere Wirkungen der Diadenosinpolyphosphate sind die Beeinflussung des Immunsystems [Gasmi *et al.*, 1996], der Thrombocytenaggregation [Luthje *et al.*, 1984] sowie der Zelldifferenzierung und der Apoptose [Vartanian *et al.*, 1997; Kisselev *et al.*, 1998].

Hinsichtlich ihrer negativen Ladung bedingt durch lineare Anordnung von bis zu sieben Phosphatgruppen besitzen die Diadenosinpolyphosphate Ähnlichkeit mit dem bekannten Selektinliganden Polyphosphomannanester (PPME) [Spertini *et al.*, 1991b]. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Diadenosinpolyphosphate ähnlich wie PPME die Bindungsfunktion von L-Selektin hemmen. Die Untersuchungen der Wirkung der Diadenosinpolyphosphate Ap<sub>2</sub>A bis Ap<sub>6</sub>A im standardisierten SPR-Assay zeigten in einer ersten Testreihe, dass durch 340 ng/μl der Diadenosinpolyphosphate Ap<sub>2</sub>A - Ap<sub>6</sub>A mit Ausnahme von Ap<sub>2</sub>A jeweils eine bis zu 50%ige Hemmung der Bindungsfunktion von L-Selektin erreicht werden konnte. Mit anderen Ap<sub>n</sub>A-Chargen ließen sich die Ergebnisse jedoch nicht eindeutig reproduzieren (nicht gezeigt). Gründe dafür sind möglicherweise Qualitätsunterschiede zwischen den Ap<sub>n</sub>A-Chargen, eine hohe Labilität und eine Kontamination mit abbauenden Hydrolasen. Für eine inhibitorische Wirkung anderer Substanzen innerhalb der ersten Ap<sub>n</sub>A-Charge gab es keine Hinweise. Die in Zusammenarbeit mit Prof. Schlüter getesteten Chargen stammen aus Filtraten von Dialysepatienten. Mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) waren in den Ap<sub>n</sub>A-Chargen keine Verunreinigungen nachgeweisbar.

Eine hohe Labilität der Ap<sub>n</sub>A's könnte verantwortlich sein für die Schwierigkeiten bei der Reproduktion der ersten vielversprechenden Ergebnisse. Hierfür spricht, dass die Wiederholung der Analysen mit Proben der ersten Charge nach drei Monaten zwar eine inhibitorische Wirkung der Ap<sub>n</sub>A's auf die Bindungsfunktion von L-Selektin bestätigten, jedoch erst bei deutlich höheren Konzentrationen. Für eine hohe Labilität der Ap<sub>n</sub>A's spricht die Beobachtung von Verspohl *et al.*, die für Ap<sub>4</sub>A eine Halblebenszeit von 12 min ermitteln konnten [Verspohl *et al.*, 1999].

Extrazelluläre Diadenosinpolyphosphate werden durch zelloberflächenassoziierte oder lösliche Enzyme schnell inaktiviert [Zimmermann, 2001]. Tatsächlich konnte in der eingesetzten L-Selektin-Charge eine spezifische Phosphodiesteraseaktivität nachgewiesen werden, die über einen Zeitraum von 24 h einen deutlichen Abbau von Diadenosinpolyphosphaten der Form  $Ap_nA$  zu AMP und  $Ap_{n-1}$  bewirkte (nicht gezeigt). Mehrere Phosphodiesterasen sind bekannt für die Hydrolyse von extrazellulären Diadenosinpolyphosphaten [Vollmayer *et al.*, 2003].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass Diadenosinpolyphosphate an L-Selektin binden und so einen inhibitorischen Effekt ausüben können. Aufgrund der vermutlich hohen Labilität dieser Verbindungen konnte diese Wirkung jedoch nicht sicher nachgewiesen werden. Der Versuch eines direkten Nachweises der spezifischen Interaktion zwischen L-Selektin und Diadenosinpolyphosphaten mittels SPR wurde nicht durchgeführt, da zu erwarten war, dass eine Bindung der kleinen Diadenosinpolyphosphat-Moleküle unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Da die ersten Ergebnisse nicht eindeutig reproduzierbar waren, und sich keine Strategie zur Hemmung der Hydrolyse anbot, wurde auf weitere Untersuchungen mit Diadenosinpolyphosphaten verzichtet. Jedoch sollte in zukünftigen Untersuchungen eingehend untersucht werden, ob Diadenosinpolyphosphate an L-Selektin binden und seine Funktion modulieren können.

### **4.2.2 L-Selektin-Inhibitoren auf Basis von makromolekularen Polymerstrukturen**

Es ist bekannt, dass bei der physiologischen Zell-Zell-Interaktion durch *Clusterung* von L-Selektin [Picker *et al.*, 1991b; Erlandsen *et al.*, 1993; Hasslen *et al.*, 1995] sowie durch Multivalenz der Ligandenepitope eine Aviditätssteigerung der Interaktion erreicht wird [Lasky *et al.*, 1992; Norgard *et al.*, 1993; Baumheter *et al.*, 1993; Berg *et al.*, 1993]. Bei der Entwicklung selektinspezifischer Wirkstoffkandidaten erscheint es daher naheliegend, eine Aviditätssteigerung der Bindung ebenfalls durch die Erhöhung von Bindungswerten zu erreichen. In der Praxis bieten sich hierzu polymere Trägermoleküle an, an die Ligandenepitope gekoppelt werden können. Diese makromolekularen Strukturen sollten idealerweise wasserlöslich, nicht toxisch und nicht immunogen sein und vom Organismus abgebaut und/oder ausgeschieden werden können. Hierfür stehen eine Reihe polymerer Molekülgerüste mit

monofunktional linearer, polyfunktional linearer, sternförmiger oder dendrimerartiger Architektur zur Verfügung. Zwei solcher Polymere, polyfunktional lineare, auf Polyacrylamid (PAA)-basierende Ligandenkonjugate und dendrimerartig verzweigte Polyglycerolsulfate, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihr inhibitorisches Potential gegenüber L-Selektin-vermittelten Bindungen untersucht. Während die PAA-Ligandenkonjugate hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf E- und P-Selektin-abhängige Bindungen bereits untersucht worden waren [Weitz-Schmidt *et al.*, 1996; Game *et al.*, 1998; Pochechueva *et al.*, 2002; Pochechueva *et al.*, 2003], lagen zu ihrer Wirkung auf L-Selektin keine Untersuchungen vor. Auch war der Scherstress-Einfluss entsprechend der Situation in Blutbahn *in vivo* noch nicht untersucht worden. Dendritische Polyglycerolsulfate waren bislang nicht untersucht worden.

### 4.2.2.1 PAA-basierte Ligandenkonjugate

Jedes der untersuchten Monoligand- und Biligandpolymere, d. h. SiaLe<sup>x</sup>-PAA, SiaLe<sup>a</sup>-PAA, sTyr-PAA (5 mol%), sTyr-PAA (20 mol%), SiaLe<sup>x</sup>-PAA-sTyr und SiaLe<sup>a</sup>-PAA-sTyr hemmte die L-Selektin-Bindung unter dynamischen Flussbedingungen mit einer mikro- bzw. nanomolaren Konzentrationen. Dies konnte sowohl auf molekularer Ebene mittels SPR als auch auf der Ebene von Zell-Zell-Interaktionen mittels Flusskammerexperimenten gezeigt werden [Enders *et al.*, 2007]. Multivalente PAA-Konjugate zeigten unter dynamischen Flussbedingungen eine deutlich stärkere Hemmwirkung als in früheren Untersuchungen unter statischen Bedingung ermittelt wurde [Weitz-Schmidt *et al.*, 1996; Game *et al.*, 1998; Pochechueva *et al.*, 2002; Pochechueva *et al.*, 2003; Ushakova *et al.*, 2005]. Die stärkere Hemmwirkung dieser Konjugate unter dynamischen Flussbedingungen spiegelt die Flussabhängigkeit der L-Selektin-Ligand-Interaktionen wider, d. h. die Tatsache, dass Selektine, insbesondere L-Selektin, bestimmte Scherstressbedingungen benötigen, um bei der Zelladhäsion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ihre Funktion auszuüben [Finger *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2005]. Die flussabhängige Adhäsion wird verursacht durch die Bildung von sogenannten *Catch Bonds* [Zhu *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 2003; Sarangapani *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2004]. Sowohl die Formierung als auch die Dissoziation einer Bindung werden reguliert durch allosterische Veränderungen an der Kontaktfläche der Ligandenbindung [Lou *et al.*, 2006]. Wie bereits für den P-Selektin:PSGL-1-Komplex demonstriert werden konnte, ergeben sich an der Kontaktfläche von Selektin zum Liganden neue Bindungen, sobald vorherige Interaktionen durch eine an den Komplex

angelegte Kraft gelöst wurden [Zhu *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 2003; Sangapani *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2004]. Die Entstehung neuer Interaktionen führt zu einer Verlängerung der Rezeptor-Ligand-Bindung, was zu einem Abbremsen und langsamen Rollen der Zellen führt [Zhu *et al.*, 2005].

Die starke Hemmwirkung der PAA-Konjugate kann mit der Annahme erklärt werden, dass multivalente Inhibitoren unter Scherstressbedingungen die Formierung neuer Interaktionen an der L-Selektin-Liganden-Kontaktfläche sehr effektiv stören. Das bedeutet, dass Substanzen, die unter statischen Bedingungen keine starke Hemmwirkung besitzen, unter dynamischen Flussbedingungen sehr effektive Inhibitoren der L-Selektin-vermittelten Adhäsion sein können. Die Ergebnisse belegen die Wichtigkeit von Flussbedingungen beim Versuchsaufbau, um Selektininhibitoren zu untersuchen.

Weiterhin bestätigen die Ergebnisse frühere Veröffentlichungen, dass Multivalenz und *Clusterung* der Bindungspartner die Avidität der Bindung zwischen Selektinen und Liganden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erhöhen [Seppo *et al.*, 1996; Renkonen *et al.*, 1997; Bovin, 1998; Stahn *et al.*, 1998]. Somit könnte die multivalente Präsentation von Selektininhibitoren die Hemmwirkung für eine therapeutische Anwendung verstärken. PAA-Trägermoleküle sind im Allgemeinen für vorklinische Untersuchungen von Multivalenz gut geeignet. Sie sind wasserlöslich, flexibel, nicht-toxisch und nicht-immunogen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass PAA-Konjugate starke Inhibitoren der L-Selektin-vermittelten Bindung unter Scherstressbedingungen in der Blutbahn sein könnten. Unglücklicherweise kann PAA vom Körper weder abgebaut noch ausgeschieden werden. Für die Realisierung eines biokompatiblen antiinflammatorisch wirkenden Inhibitors sollten daher andere Trägermoleküle verwendet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen das hohe Potential von SiaLe<sup>x</sup>, SiaLe<sup>a</sup> und/oder sTyr auf makromolekularen Trägermolekülen als effektive Inhibitoren der L-Selektin-Bindung unter dynamischen Flussbedingungen.

#### 4.2.2.2 Dendritische Polyglycerolsulfate (dPGS)

Polyglycerol ist ein chemisch synthetisierbares, hyperverzweigtes Polymer. Es besteht aus einem stabilen, biokompatiblen Polyethergerüst, welches mit endständigen funktionellen Gruppen ausgestattet werden kann und insgesamt eine kompakte, dendrimerartig verzweigte Architektur besitzt [Frey *et al.*, 2002]. Diese Eigenschaften eignen sich hervorragend für die Entwicklung eines neuartigen Typs von Polymer,

der an seinen endständigen Gruppen sulfatiert ist. Diese sogenannten dendritischen Polyglycerolsulfate (dPGS) stellen aussichtsreiche Verbindungen für die Verwendung als Heparinanaloga dar.

Heparine sind Polysaccharide, die mit einer Monosaccharidkettenlänge von fünf bereits gerinnungshemmend wirken. Den Kettenbausteinen entsprechend (D-Glucosamin und Uronsäure) besitzen Heparine viele negative Ladungen. Sie werden mit Kettenlängen von fünf bis siebzehn als niedermolekulare Heparine (NMH), mit Kettenlängen ab 18 als unfraktionierte Heparine (UFH) bezeichnet. Da die Heparine tierischen Ursprungs in ihrer Zusammensetzung chargenabhängig variieren und eine Mischung aus Molekülen von unterschiedlicher Kettenlänge sind [Linhardt *et al.*, 1990; Capila und Linhardt, 2002], gibt es seit längerem Bestrebungen chemisch synthetisierte Heparinanaloga zu entwickeln. Erste Untersuchungen zur biologischen Wirkung der dPGS zeigten sowohl antikoagulierende wie auch komplementinhibierende Aktivität [Türk *et al.*, 2004].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten dPGS zeigten im SPR-Bindungsassay eine deutlich über den Erwartungen liegende Hemmwirkung auf die Bindungsfunktion von L-Selektin. Die Polyglycerolsulfatverbindungen 2b, 2c und 2d hemmten die L-Selektin-Bindung mit einer Konzentration von teilweise unter 10 nM. Ähnlich stark wirkende Inhibitoren sind bisher nicht bekannt. Dieser Effekt könnte mit zwei Grundeigenschaften der dPGS zusammenhängen. Zum einen besitzen dPGS eine große Anzahl endständiger Sulfatgruppen, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe eine starke Lokalkonzentration bewirken. Zum anderen besitzen die dPGS eine globuläre Struktur, die für eine koordinierte Bindung möglicherweise förderlich ist.

Weitere Untersuchungen zur Spezifität der Hemmwirkung zeigten eine gezielte Interaktion der dPGS mit P- und L-Selektin, während die Bindung von E-Selektin unbeeinflusst blieb. Dieses Ergebnis stimmte mit Beobachtungen aus der Literatur überein, die zeigen, dass P- und L-Selektin, nicht aber E-Selektin, negative Ladungen binden [Nelson *et al.*, 1993]. Erklärbar ist dies mit zwei für P-Selektin gezeigten und für L-Selektin vermuteten unabhängigen Bindungsepitopen innerhalb der Lektindomäne. E-Selektin bindet primär SiaLe<sup>x</sup>-haltige Glykanstrukturen und dies mit höherer Affinität als P- und L-Selektin [Somers *et al.*, 2000], besitzt aber nicht das positiv geladene Epitop zur Bindung anionischer Gruppen [Somers *et al.*, 2000].

In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit konnte zudem eine Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Sulfatierungsgrad der dPGS nachgewiesen werden. Mit einem Sulfatierungsgrad von 76% konnte eine 60%ige Hemmwirkung gemessen werden, während mit einem Sulfatierungsgrad von 10% kein inhibitorischer Effekt zu

beobachten war. Ein umgekehrter Versuchansatz, d. h. die Immobilisierung von L-Selektin-IgG auf einem Sensor Chip und die Messung der direkten Interaktion mit dPGS in Lösung, zeigte, dass das dPGS mit höchstem Sulfatierungsgrad am stärksten band, während dPGS mit dem niedrigsten Sulfatierungsgrad kaum Bindung zeigte (nicht gezeigt).

Untersuchungen in der Flusskammer bestätigten eine Hemmwirkung der dPGS auf die L-Selektin-Bindung. In einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 µM hemmten dPGS die L-Selektin-vermittelte Adhäsion von NALM-6-Zellen in Abhängigkeit vom Scherstress. Eine dosisabhängige Wirkung war allerdings nicht nachvollziehbar. Vielmehr bewegte sich die Zahl adhärerender Zellen in einem von der Inhibitorkonzentration nicht weiter zu beeinflussenden Bereich. Da bereits mit der niedrigsten dPGS-Konzentration maximale Inhibitionswirkung erreicht werden konnte, bewegte sich der Bereich, in dem eine Dosisabhängigkeit hätte gezeigt werden können, zum einen wahrscheinlich deutlich unterhalb von 1 nM und zum anderen vermutlich in einem solch engen Bereich, dass eine wesentlich enger gesetzte Messreihe Voraussetzung für eine Detektion gewesen wäre.

Die Ergebnisse deuten ein hohes antiinflammatorisches Potential für dPGS an. Sie besitzen Eigenschaften, um auch *in vivo* in größerem Umfang erfolgreich eingesetzt werden zu können. Durch chemische Synthese können dPGS in großen Mengen mit definierter Größe und Sulfatierungsgrad kostengünstig und ohne nachteilige Verunreinigungen hergestellt werden. Das vergleichsweise große Molekulargewicht bei gleichzeitig globulärer Gestalt zeigte in den *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit keine sterischen Nachteile. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse werden weiterführende Analysen sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* folgen. Ergänzend besteht zudem die Möglichkeit, das Polyglycerolgerüst vergleichbar zu den PAA-Konjugaten für die Kopplung anderer Strukturen wie SiaLe<sup>x/a</sup> und/oder Tyrosinsulfat zu nutzen, um nach vergleichenden Untersuchungen den effizientesten Selektininhibitor ggf. auch mit panselektin-inhibitorischer Wirkung zu entwickeln. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollte ein als Biligand entwickeltes Polyglycerol, das endständig SiaLe<sup>x</sup> und Sulfatreste als funktionelle Gruppen trägt, eine effiziente panselektin-inhibitorische Wirkung zeigen, wobei SiaLe<sup>x</sup> für die Bindung von E-Selektin und SiaLe<sup>x</sup> in Kombination mit Sulfatgruppen für die Bindung von P- und L-Selektin wirksam sein sollten.

### 4.2.3 L-Selektin-Inhibitoren auf Proteinbasis

Neben der chemischen Synthese niedrig- und makromolekularer Substanzen gewinnen biotechnologisch erzeugte Wirkstoffe auf Proteinbasis eine immer größere pharmakologische Bedeutung. Daher bestehen gegenwärtig auch Ansätze zur Entwicklung selektinspezifischer Inhibitoren auf Basis von Antikörpern und bekannter Selektinliganden wie PSGL-1. Allerdings verfehlte beispielweise der monoklonale L-Selektin-spezifische Antikörper „aseulizumab“ (Scil Technology) den Sprung in die nächste Prüfungsphase [Seekamp *et al.*, 2004]: In einer Phase II Studie war dieser Antikörper nicht in der Lage bei Traumapatienten einen statistisch signifikanten antiinflammatorischen Effekt zu erzielen. Es ist derzeit offen, ob dieser Antikörper für andere Indikationen zum Einsatz kommen wird. Die Weiterentwicklung einer rekombinanten löslichen Form des Selektinliganden PSGL-1, TSI (Wyeth Pharma) [Kumar *et al.*, 1999], wurde nach enttäuschenden Ergebnissen in Phase II Untersuchungen bei Patienten mit Herzmuskelinfarkt ebenfalls abgebrochen. Eine Anwendung bei Patienten mit anderer Indikation bleibt aber denkbar. Hingegen konnten Anti-TNF- $\alpha$ -basierte Wirkstoffe („etanercept“ und „infliximab“) bei einigen chronischen inflammatorischen Erkrankungen sehr vielversprechend eingesetzt werden [Lorenz *et al.*, 2002].

Um den in der vorliegenden Arbeit entwickelten SPR-Assay auch für die Identifizierung von L-Selektin-Inhibitoren auf Proteinbasis verwenden zu können, wurde ein vom Liganden PSGL-1 abgeleitetes Referenzglykoprotein entwickelt, erstmals in der hämatopoetischen Zelllinie KG1a rekombinant hergestellt und im SPR-Assay untersucht. Gleichzeitig sollte ein potentielles Bindungsepitop eines vormals in der Arbeitsgruppe identifizierten, physiologischen L-Selektin-Liganden, des konstitutiv exprimierten Hsc70 [Harms, Dissertationsschrift 2002], analysiert werden.

#### 4.2.3.1 Entwicklung eines Transfektionsprotokolls für KG1a-Zellen

Ein wichtiges Kriterium für die Herstellung hochaffiner L-Selektin-Liganden auf Proteinbasis sind posttranslationale Modifikationen, insbesondere die Glykosylierung und Sulfatierung. Die hämatopoetische Zelllinie KG1a konnte als eine eukaryontische Zelllinie identifiziert werden, die in idealer Weise die für eine L-Selektin-Bindung notwendigen Modifikationen vollständig durchführt [Harms, Dissertationsschrift 2002]. Allerdings wurden bisher KG1a-Zellen nicht für die rekombinante Herstellung von Proteinen genutzt, weil diese Zelllinie vergleichsweise hohe Ansprüche an die

Kultivierung stellt. Die Zellen reagieren in Kultur schnell auf Veränderungen der Zelldichte. Diese sollte nicht unterhalb von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml und oberhalb von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml liegen. Andernfalls schränken die Zellen ihre Proliferation und Proteinexpression stark ein.

Da ein effizientes Transfektionsprotokoll zur Generierung stabil transfizierter KG1a-Zellen fehlte, die für die Produktion ausreichender Proteinmengen über einen langfristigen Zeitraum angestrebt wurde, wurde zunächst eine geeignete Methode gesucht, mit der sich KG1a-Zellen mit ausreichend hoher Effizienz transfizieren lassen. Die Testung verschiedener Methoden schloss Versuche zur Elektroporation ein, analog zum Transfektionsprotokoll der Zelllinie NALM-6 [C. Fieger, Dissertationsschrift 1997]. Diese insbesondere für Suspensionszellen empfohlene Methode zerstört über einen kurzen elektrischen Puls kurzfristig das Membranpotential der Zelle, wodurch Membranporen entstehen, durch die DNA ins Cytoplasma gelangen kann. Ein großer Nachteil dieser Methode ist jedoch die hohe Mortalität (meist über 50%) der Zellen. Das Ergebnis der Versuche zeigte eine geringe Überlebensrate (30% Vitalität nach 24 h), verbunden mit einer sehr geringen Transfektionseffizienz (<1%) der KG1a-Zellen (Tab. 24). Nach zwei bis drei Tagen waren sämtliche Zellen tot.

Es folgten daher Transfektionsversuche mit Reagenzien (jetPEI, ExGen 500,  $\text{Ca}^{2+}$ -Phosphat), die die Zellen weniger stark zerstören sollten. Die Versuche wurden mit einem GFP (*Green Fluorescent Protein*)-Markerprotein durchgeführt. Die Viabilität der Zellen war während der Transfektionsversuche durchgängig hoch, es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt der Versuche eine erfolgreiche Zelltransfektion beobachtet werden (Tab. 24). Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass KG1a-Zellen vermutlich besonders effiziente Schutzmechanismen besitzen, die fremd eingeschleuste DNA zeitnah erkennen, abbauen und/oder wieder ausschleusen. So scheint auch erklärbar, dass 24 h nach Durchführung einer normalerweise relativ effizienten Elektroporation nur vereinzelte Zellen eine erfolgreiche Transfektion erkennen ließen (Tab. 24).

Daraufhin wurde als Transfektionsmethode die Nukleofektion getestet, für die bei Findung geeigneter Parameter vergleichsweise hohe Effizienzen und Überlebensraten der Zellen berichtet worden waren. Die DNA gelangt bei dieser Methode durch die Verwendung spezieller Lösungen vom Cytoplasma direkt in den Zellkern, so dass bereits innerhalb weniger Stunden nach Transfektion die Expression des gewünschten Proteins einsetzt und mittels Antibiotikum ein Selektionsdruck aufgebaut werden kann. So sollten die vergleichsweise schnell greifenden Schutzmechanismen der

KG1a-Zellen umgangen werden. Nach einem weit angelegten *Screening* verschiedener Transfektionslösungen und -programme erfolgte die Erarbeitung eines Transfektionsprotokolls, mit dem erstmals die stabile Transfektion der Zelllinie KG1a durchgeführt werden konnte. Die Erarbeitung eines Protokolls zur Generierung stabiler Transfektanten war Voraussetzung für die rekombinante Herstellung von PSGL-1- und Hsc70-IgG. Beide Proteine sollten, jeweils auf einen kurzen Sequenzabschnitt reduziert, als IgG Fusionsprotein in den Kulturüberstand sezerniert werden.

### **4.2.3.2 Die Entwicklung peptidbasierter L-Selektin-Ligand-IgG-Minimalkonstrukte**

Für die rekombinante Herstellung und die Charakterisierung funktioneller Ligandenformen, die auf langfristige Sicht als spezifische Inhibitoren in L-Selektin-abhängigen Bindungsassays eingesetzt werden können, wurde ein Referenzligand benötigt. Als Referenzligand sollte ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Selektinbindungsepitop des bekannten Liganden PSGL-1, fusioniert mit dem *Fc*-Anteil von humanem IgG, hergestellt und getestet werden. Analog dazu sollte das potentielle Bindungsepitop des physiologischen Liganden Hsc70, ebenfalls fusioniert mit dem *Fc*-Anteil von humanem IgG, konstruiert und auf eine L-Selektin-spezifische Bindungsaktivität hin untersucht werden. Zellen der Zelllinie KG1a wurden zunächst nach dem neu erarbeiteten Transfektionsprotokoll mittels Nukleofektion mit beiden Konstrukten stabil transfiziert. Anschließend wurden beide Proteine rekombinant hergestellt, gereinigt und vergleichende Messungen im SPR-Bindungsassay durchgeführt.

#### **4.2.3.2.1 Die rekombinante Herstellung von Fc $\gamma$ -Fusionsproteinen von L-Selektin-Liganden**

Nachdem die stabile Transfektion der Zelllinie KG1a sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene erfolgreich nachgewiesen werden konnte (Abb. 42 + 43), musste zunächst ein geeignetes Verfahren zur Reinigung der rekombinanten Proteine aus dem Zellkulturüberstand gefunden werden. Bei ersten Reinigungsversuchen über Protein A-Sepharose wurden neben PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG auch weitere Proteine angereichert. Über Immunodetektion konnte diese Verunreinigung als Rinder-IgG identifiziert werden (Abb. 43), das aus dem zugesetzten FCS des Zellkulturmediums

stammte. Diese zusätzlich isolierte Proteinfraction konnte weder mittels Gelfiltration (Abb. 44) noch durch eine affinitätschromatographische Reinigung über immobilisiertes L-Selektin-IgG abgetrennt werden (Abb. 45). Mit letzterem Verfahren konnte allerdings die Interaktion zwischen PSGL-1-IgG und L-Selektin erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 45). Die Einsetzbarkeit von PSGL-1-IgG als Referenzligand war damit bestätigt. Für eine erfolgreiche Reinigung des Fusionsproteins reichte die Haltbarkeit der Säulenmatrix aus immobilisiertem L-Selektin-IgG nicht aus, diese verlor bereits nach vier Durchgängen ihre biologische Aktivität. Zum einen könnte dies durch eine proteolytische Aktivität der Eluate bedingt sein. Zum anderen besitzt das L-Selektin-IgG Fusionsprotein einen scheinbar strukturell fragilen Bereich, was, wie in früheren Untersuchungen bereits beobachtet, dazu führt, dass das Fusionsprotein zeitabhängig in einen L-Selektin- und einen *Fcy*-Anteil zerfällt.

Ein Nachweis der spezifischen Interaktion zwischen dem potentiellen Bindungsepitop von Hsc70 und L-Selektin war an dieser Stelle der Untersuchungen nicht möglich (Abb. 45). Aus dem Zellkulturüberstand von KG1a-Zellen konnten nur geringe Mengen Hsc70-IgG isoliert werden. Für einen Interaktionsnachweis waren daher entweder die Proteinmengen nicht ausreichend und lagen unterhalb der Nachweisgrenze, oder die Elutionsbedingungen (Glyzin-HCl, pH 2,5) waren für Hsc70-IgG nicht geeignet, um genügend Protein oberhalb der Nachweisgrenze zu eluieren.

In einem weiteren Ansatz wurde daher versucht, Rinder IgG über einen  $\alpha$ -Rind IgG, *F(ab')<sub>2</sub>* spezifischen Antikörper zu entfernen. Mittels dieses Verfahrens konnte PSGL-1-IgG von Rinder IgG getrennt werden (Abb. 46). Das Referenzprotein PSGL-1-IgG war somit für SPR-Untersuchungen einsetzbar.

Da dieses Vorgehen aber weder für die Reinigung des in wesentlich geringeren Mengen zur Verfügung stehenden Hsc70-IgG, noch langfristig für die Reinigung des PSGL-1-IgG als Referenzprotein geeignet war, wurde die Expression daraufhin alternativ in Gegenwart von *Ultra Low* IgG FCS zur Vermeidung von zusätzlichen IgG-Verunreinigungen durchgeführt. Damit war eine Möglichkeit gefunden, die Fusionsproteine in ausreichenden Mengen ohne zusätzliche Verunreinigungen zu exprimieren und zu isolieren (Abb. 47).

#### 4.2.3.2.2 Untersuchung der L-Selektin-Bindung von PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG

Hsc70 konnte in Biotinylierungsexperimenten von G. Harms [Dissertationsschrift 2002] auf der Zelloberfläche sowohl leukocytärer Zelllinien als auch von aus dem Blut

aufgearbeiteter Leukocyten isoliert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass Hsc70 vermutlich als membranassoziiertes Protein an der homotypischen Leukocytenadhäsion beteiligt ist. Ob Hsc70 über seine C-terminale Substratbindungsdomäne chaperontypisch oder über Modifikationen wie O-Glykosylierung und Tyrosinsulfatierung an L-Selektin bindet, war unbekannt. Weiterführende Untersuchungen ergaben deutliche Hinweise auf eine O-Glykosylierung von Hsc70 [Harms, Dissertationsschrift 2002]. Im Sequenzvergleich mit dem Selektinbindungsepitop von PSGL-1 zeigte sich überraschenderweise eine gewisse Ähnlichkeit der Sequenzposition 279-299 von Hsc70. Eine Interaktion dieses Motivs mit L-Selektin würde auf eine neuartige Funktion des Hsc70-Proteins hindeuten. Für die SPR-Bindungstests wurde zunächst L-Selektin-IgG Fusionsprotein nach einer gezielten Biotinylierung in der *Hinge*-Region des IgG-Anteils (Abb. 48) auf einem Sensor Chip SA immobilisiert. Es kam nur L-Selektin-IgG Fusionsprotein zum Einsatz, dessen biologische Aktivität zuvor mittels Ligandenaffinitätschromatographie nachgewiesen wurde (Abb. 49). Die Immobilisierung des L-Selektin-IgG Fusionsproteins über Streptavidin-Biotin-Bindung hatte den Vorteil, dass sie gerichtet erfolgte, keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des Proteins hatte und nahezu irreversibel war. Des Weiteren wurden aufgrund der guten Vorerfahrungen mit Protein A-beschichtete Goldnanopartikel zur Aviditätssteigerung sowohl Hsc70-IgG als auch der Referenzligand PSGL-1-IgG in vergleichbaren Mengen auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel gekoppelt. In den SPR-Bindungstests zeigte sich eine gute Bindungsaktivität gegenüber dem immobilisierten L-Selektin, nicht nur für PSGL-1-IgG, sondern auch für das Hsc70-IgG-Konstrukt. Die Stärke des Bindungssignals beider Proteine war ähnlich stark, mit einem leicht stärkeren Bindungssignal für Hsc70-IgG (Abb. 50). Mit diesen Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass der gewählte Sequenzabschnitt von Hsc70 in der Tat L-Selektin binden kann. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass dieses Sequenzmotiv ein physiologisches Bindungsmotiv von L-Selektin darstellen könnte.

Da Hsc70 kein Adhäsionsmolekül darstellt, bleibt die Frage nach der potentiellen Bedeutung im physiologischen Kontext. Hsc70 ist ein Mitglied der Hsp70 Hitzeschockproteinfamilie. Neben intrazellulären Funktionen als Hitzeschockprotein im Cytosol der Zelle wurden für Vertreter dieser Familie (Hsc70 und Hsp70) auch extrazelluläre Funktionen beschrieben [Tsuboi *et al.*, 1994; Hirai *et al.*, 1998]. Das *Shedding* von Exosomen scheint hierbei an deren Translokation an die Zelloberfläche beteiligt zu sein [Wubbolts *et al.*, 2003]. Im Rahmen der

Entzündungsantwort wird Hsc70 möglicherweise auf die Zelloberfläche transloziert, wo es an der homotypischen Leukocytenadhäsion beteiligt sein könnte.

Weiterführende Analysen zur physiologischen Bedeutung des untersuchten Hsc70-Sequenzmotivs können zum Verständnis des komplexen Geschehens bei der Entzündungsantwort beitragen. Wegen der essentiellen Chaperonfunktion sind Experimente mit Hsc70-Knockout-Mäusen oder RNAi-Experimente nicht durchführbar. Alternativ könnte ein sequenzmotivspezifischer Antikörper eingesetzt werden, um durch Blockade des Sequenzmotivs die physiologischen Bedeutung während der Entzündungsreaktion zu untersuchen. Die vergleichbare Bindungsaktivität von PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG im SPR-Assay weist auf die biologische Bedeutung dieser und weiterer ähnlicher Bindungsmotive hin, die auch bei Endoglykan gefunden wurden [Fieger *et al.*, 2003]. Späteren Untersuchungen bleibt es vorbehalten zu prüfen, ob eine erfolgreiche Entwicklung eines therapeutischen Wirkstoffes auf Basis eines L-Selektin-Bindungsmotivs möglich ist.