

Struktur und Funktion des Adhäsionsrezeptors L-Selektin

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stefanie Wedepohl

aus Ahlen (Westf.)

2009

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Tauber / AG Dr. J. Dornedde, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Tauber
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger

Disputation am: 07.01.2010

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Immunität	1
1.2	Leukozytenextravasation	3
1.3	Selektine und Entzündung	5
1.4	Glykosylierung.....	6
1.4.1	Glykosylierung in der Biotechnologie	8
1.5	Selektinstruktur	10
1.6	Selektin-Ligand Interaktionen	11
1.6.1	Dynamische Selektin-Ligandinteraktion	12
1.7	L-Selektin	14
1.7.1	L-Selektin Liganden	15
1.7.2	Lösliches L-Selektin.....	16
1.7.3	N-Glykosylierung von L-Selektin	17
2	Zielsetzung	18
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Expression von L-Selektin (LE) in <i>Pichia pastoris</i>	20
3.2	Expression von L-Selektin (LE) in Insektenzellen (Sf9).....	21
3.3	Expression von L-Selektin in Säugerzellen	22
3.3.1	Expression von L-Selektin (LE) in CHO-Zellen	22
3.3.2	Expression von L-Selektin (LE) in HEK293F-Zellen.....	25
3.4	Optimierung und Anpassung des Expressionssystems.....	29
3.4.1	Wahl des L-Selektin Konstruktes und des Expressionssystems.....	29
3.4.2	Test verschiedener Transfektionsreagenzien	29
3.4.3	Optimierung der Sequenz von LEHis	30
3.4.4	Aufreinigung von LEHis mittels Aptamer-Affinitätschromatographie (AAC).....	31
3.4.5	Chromatographische Trennung.....	32
3.4.5.1	Gelfiltration über Sephadex 75 (10/30).....	32
3.4.5.2	Heparin-Chromatographie	33
3.5	Verminderung der N-Glykosylierung von LEHis	35
3.5.1	Enzymatische Deglykosylierung mittels PNGase F	35
3.5.2	Inhibition der Glykosylierung mittels Tunicamycin.....	37
3.5.3	Expression von N-Glykosylierungsmutanten.....	38
3.6	Auswahl des L-Selektin-Konstruktes für die Kristallisation	42
3.6.1	Funktioneller Test der L-Selektin Variante LEHis 010.....	42
3.6.2	Expression, Reinigung und Kristallisation von LEHis 010.....	43

3.7	Optimierung von LE 010 für die Kristallisation	44
3.7.1	Entfernen des Affinitätstags	44
3.7.2	Optimierung der Transfektion von LE 010 mit PEI	45
3.7.3	Untersuchung der Kulturbedingungen im Schüttelkolben	46
3.7.4	Optimierung der AAC.....	47
3.7.5	Reinheits- und Homogenitätsprüfung	50
3.7.6	Überprüfung der Primärsequenz mittels Massenspektrometrie	50
3.8	Kristallisation	51
3.8.1	Gelfiltration: „ <i>Polishing</i> “.....	51
3.8.2	Initiale Kristallisations-Screenings	51
3.8.3	Kristallisation mit Liganden	52
3.8.4	Verbesserung des Kristallwachstums durch Additive.....	54
3.9	Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten.....	55
3.10	Untersuchung der Struktur und Stabilität von LE 010 mittels CD-Spektroskopie.....	56
3.11	Expression von L-Selektin (LE) in CHO lec1 Zellen	57
3.12	Expression von L-Selektin Multimeren.....	60
3.13	Charakterisierung der LEHis Glykosylierungsmutanten	63
3.13.1	Expression und Aufreinigung von LEHis Glykosylierungsmutanten	63
3.13.2	Sekretion von LEHis Glykosylierungsmutanten	64
3.13.3	Bindungsaktivität der Glykosylierungsmutanten.....	65
3.14	Analyse der N-Glykane von LEHis.....	67
3.14.1	Monosaccharid-Analyse	68
3.14.2	Massenspektrometrische Untersuchung der N-Glykane von LEHis 100, 010, 100, 111 und AGP	69
4	Diskussion.....	79
4.1	Expression von rekombinantem L-Selektin für die Kristallisation	80
4.1.1	Expression in <i>Pichia pastoris</i> und Sf9- Zellen	80
4.1.2	Expression von L-Selektin in Säugerzellen	82
4.1.3	Aufreinigung von L-Selektin (LE)-Varianten	85
4.1.4	Trennung der Glykoformen von L-Selektin	86
4.1.5	Verminderung der Glykosylierung von L-Selektin	86
4.1.6	Optimierung des Expressionssystems und Anpassung an größere Kulturvolumina.....	88
4.2	Kristallisation der L-Selektin Variante LE 010.....	90
4.3	Charakterisierung der LEHis Glykosylierungsmutanten	93
4.3.1	Expression und Sekretion von LEHis Glykosylierungsmutanten.....	94
4.3.2	Bindungsfunktion der LEHis Glykosylierungsmutanten.....	96
4.3.3	Analyse der N-Glykane an N22, N66 und N139.....	98

5	Material und Methoden	104
5.1	Pufferlösungen	104
5.2	Molekularbiologische Methoden	104
5.2.1	Klonierungsvektoren	104
5.2.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	105
5.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	106
5.2.4	Colony-PCR	107
5.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	107
5.2.6	Plasmidpräparation	108
5.2.7	PCR (Polymerasekettenreaktion)	108
5.2.8	Mutagenese	109
5.2.9	Restriktionsverdau, Ligation, Dephosphorylierung	109
5.2.10	Sequenzierung	110
5.2.11	Oligonucleotide	111
5.2.12	L-Selektin-Expressionsplasmide	112
5.3	Zellbiologische Methoden	115
5.3.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>Pichia pastoris</i>	115
5.3.2	Zellfraktionierung	118
5.3.3	Solubilisierung von Proteinen aus der Membranfraktion	119
5.3.4	Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen: Sf9	119
5.3.4.1	Konstruktion von Baculovirus-DNA (Bacmid)	119
5.3.4.2	Kultivierung von Sf9-Zellen	121
5.3.4.3	Kryokonservierung von Sf9-Zellen	121
5.3.4.4	Transfektion von Sf9-Zellen	122
5.3.4.5	Baculovirus-Titerbestimmung	122
5.3.4.6	Proteinexpression in Sf9-Zellen	122
5.4	Expression rekombinanter Proteine in CHO-Zellen	123
5.4.1	Zellkultur	123
5.4.2	Kryokonservierung von CHO-Zellen	123
5.4.3	Transfektion von CHO-Zellen	123
5.4.4	Expression rekombinanter Proteine in HEK293F-Zellen	124
5.4.4.1	Kultur von HEK293F-Zellen	124
5.4.4.2	Bestimmung der Zellzahl	125
5.4.4.3	Kryokonservierung von HEK293F-Zellen	125
5.4.4.4	Transfektion von HEK293F-Zellen	125
5.5	Chromatographische Methoden	126
5.5.1	IMAC (<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>)	126

5.5.2	Affinitätschromatographie an Protein A	127
5.5.3	Ionenaustauschchromatographie	127
5.5.4	Affinitätschromatographie an sTyr/sLeX-PAA	128
5.5.5	Aptamer-Affinitätschromatographie (AAC)	128
5.5.6	Heparin-Affinitätschromatographie	129
5.5.7	Gelfiltration	129
5.6	Proteinbiochemische und Immunologische Methoden	130
5.6.1	Konzentrierung und Umpuffern aufgereinigter Proteine	130
5.6.2	Glykosidase-Verdau.....	130
5.6.3	Bradford-Proteinbestimmung.....	130
5.6.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	131
5.6.5	Coomassie Färbung von Polyacrylamid-Gelen	132
5.6.6	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	132
5.6.7	Western Blot	133
5.6.8	Immunodetektion	134
5.6.9	ELISA.....	134
5.6.10	Oberflächenplasmonresonanz	135
5.7	Glykananalytik.....	136
5.7.1	Monosaccharid-Analyse.....	136
5.7.2	Massenspektrometrische Analyse von <i>N</i> -Glykanen	136
5.8	Kristallographische Methoden.....	137
5.8.1	Kristallisationsscreenings.....	137
5.8.2	Kryoprotektion.....	138
5.8.3	Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten.....	138
5.8.4	CD-Spektroskopie.....	139
5.9	Internetanwendungen und Datenbanken.....	139
6	Zusammenfassung	141
7	Summary.....	143
8	Literatur	145
9	Anhang.....	157

1 Einleitung

1.1 Immunität

Es gibt zwei Arten der Immunität: die **angeborene** und die **adaptive** Immunität. Beide sind abhängig von weißen Blutkörperchen, den **Leukozyten**.

Leukozyten sind eine Gruppe verschiedenster Zellen, die im Blutgefäßsystem zirkulieren, wobei die **Makrophagen** und **Granulozyten** die **angeborene Immunität** vermitteln. Makrophagen sind phagozytotische Zellen („Freßzellen“), die sofort und ohne vorherigen Kontakt zu anderen Komponenten des Immunsystems in der Lage sind, Pathogene zu erkennen und durch Phagozytose zu eliminieren. Die Gruppe der Granulozyten wird in drei Untergruppen unterteilt: **Neutrophile**, **Eosinophile** und **Basophile**. Granulozyten werden auch polymorphnukleäre Leukozyten (**PMN**) genannt, da sie in ihrem Cytoplasma granuläre Strukturen zeigen und ihr Zellkern in unterschiedlichsten Formen erscheint. Neutrophile stellen die zahlreichsten und wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems dar.

Die **adaptive Immunität** wird durch **Lymphozyten** gewährleistet, die, nachdem sie einmal mit einem Krankheitserreger in Kontakt gekommen sind, eine lebenslange Immunität gegen diesen Krankheitserreger vermitteln können. In der Gruppe der Lymphozyten gibt es eine Reihe spezialisierter Zellen mit verschiedenen Aufgaben. Die beiden Hauptklassen, die **B-** und **T-Lymphozyten**, sind nach dem Ort ihrer Reifung benannt. B-Zellen reifen im Knochenmark (*bone marrow*), während T-Zellen im Thymus reifen. Knochenmark und Thymus werden als **zentrale** oder **primäre lymphoide Organe** bezeichnet. Aus diesen Geweben wandern die Lymphozyten in sekundäre oder **periphere lymphoide Organe** wie Lymphknoten, Darm-assoziierte muköse lymphatische Gewebe, Tonsillen, Peyersche Plaques und Appendix.

B- Zellen differenzieren nach Aktivierung zu Plasmazellen, die Antikörper sekretieren. T- Zellen differenzieren entweder zu **cytotoxischen T-Zellen**, die z.B. virenfizierte Zellen eliminieren, oder zu **Helfer T-Zellen**, die andere Zellen wie Makrophagen oder B Zellen aktivieren.

Alle Blutzellen entstehen im Knochenmark aus den so genannten **hämatopoietischen Stammzellen**. Diese pluripotenten Stammzellen werden zunächst zu weniger potenten Vorläuferzellen, die dann jeweils zu direkten Vorläufern von roten Blutkörperchen, Plättchen und zwei Hauptkategorien von Leukozyten differenzieren.

Innerhalb der hämatopoietischen Stammzellen unterscheidet man die **lymphoiden Vorläuferzellen**, die die Vorläuferzellen der Lymphozyten des adaptiven Immunsystems und **natürlichen Killerzellen (NK)** des angeborenen Immunsystems sind, und die **myeloiden Vorläuferzellen**, die die Vorläufer der Granulozyten, Makrophagen, **dendritischen Zellen** und **Mastzellen** sind. Makrophagen sind die gereifte Form der **Monozyten**, welche stets im Blutkreislauf zirkulieren und bei Eintritt in das Gewebe zu Makrophagen differenzieren. Dendritische Zellen sind phagozytotisch und darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen, in ihrem Innern zu prozessieren und daraufhin auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Im letzteren Differenzierungszustand werden sie daher **antigenpräsentierende Zellen (APC)** genannt, wandern zu den Lymphknoten und

präsentieren dort den T-Lymphozyten ihre prozessierten Antigene. Dendritische Zellen nehmen auch Selbst-Antigene auf, wodurch Toleranz gegen Selbst-Antigene aufrechterhalten wird.

Wenn fremde Mikroorganismen in den Körper gelangen, so treffen sie zuerst auf Makrophagen, die die angeborene Immunität vermitteln. Über Zelloberflächenrezeptoren sind Makrophagen in der Lage, charakteristische Strukturen bakterieller, pilzlicher, viraler oder parasitärer Oberflächen zu binden. Durch die Bindung werden die Makrophagen aktiviert und sezernieren **Cytokine** und **Chemokine**. Cytokine sind kleine Proteine, die durch Bindung an Rezeptoren bestimmte Reaktionen in anderen Zellen auslösen. Die Wirkung kann entweder autokrin (auf sich selbst wirkend) oder parakrin (auf andere wirkend) sein. Chemokine sind eine Klasse von Cytokinen, die eine gerichtete Chemotaxis in Zellen, die den passenden Rezeptor besitzen, induzieren. Durch Ausschüttung von Cytokinen wird die **Entzündungsreaktion** eingeleitet. An erster Stelle werden dann Neutrophile zum Ort der Entzündung rekrutiert, wo sie aus dem Blutgefäßsystem in das Gewebe auswandern (**Extravasation**). Kurz nach den Neutrophilen kommen Monozyten hinzu, die im Gewebe rasch zu Makrophagen differenzieren. Neutrophile und Makrophagen werden daher auch als **inflammatorische Zellen** bezeichnet. Später erst kommen auch die Lymphozyten zum Einsatz. Die Lymphozyten müssen erst in den Lymphknoten mit Antigen in Kontakt gekommen sein, das von Antigenpräsentierenden Zellen dorthin gebracht wurde. Sind die Leukozyten in den Geweben am Entzündungsherd angekommen, so eliminieren sie vor Ort fremde Mikroorganismen durch Phagozytose, sowie durch Sekretion von Antikörpern, Sauerstoffradikalen und cytotoxischen Substanzen.

Während der Immunüberwachung zirkulieren Lymphozyten mit dem Blutstrom und wandern aus dem Blutgefäßsystem in sekundäre lymphoide Organe aus; ein Vorgang, der auch als „**Homing**“ bezeichnet wird (Gowans, 1959; Gowans, 1959; Gowans and Knight, 1964). Hierbei gibt es eine hohe Gewebsspezifität; manche Gruppen von Leukozyten wandern zum Beispiel nur in periphere Lymphknoten, andere in Mukosa-assoziierte lymphoide Organe wie die Peyerschen Plaques oder die Appendix (Jalkanen *et al.*, 1987; Stevens *et al.*, 1982). Um aus dem Gefäßsystem auswandern zu können, sind eine Reihe von Zell-Zell-Interaktionen notwendig. Auf der Seite der Lymphozyten sind dafür die so genannten **Homing Rezeptoren** und auf der Seite des Endothels die Gruppe der **vaskulären Addressine** verantwortlich (Berg *et al.*, 1989; Butcher *et al.*, 1980). Die Austrittsstelle aus dem Blutgefäß in Lymphgewebe wird von spezialisierten Endothelzellen der postkapillären Venulen gebildet. Diese Endothelzellen sind nicht flach wie andere Endothelzellen, sondern von kuboidaler Gestalt; daher werden diese Venulen auch **hochendotheliale Venulen (HEV)** genannt (Girard and Springer, 1995; Stamper and Woodruff, 1976) (Gowans and Knight, 1964). HEV finden sich in allen sekundären lymphatischen Organen mit der Ausnahme der Milz, bei der Lymphozyten durch Blutgefäß-Sinusoide auswandern. Bei chronischen Entzündungen kann es vorkommen, dass sich um den Entzündungsort lymphoide Gewebestrukturen ausbilden und die Endothelzellen Adhäsionsmoleküle und Chemokine exprimieren, die für HEV der Lymphgewebe spezifisch sind (Hjelmstrom, 2001).

1.2 Leukozytenextravasation

Aus den im vorangegangenen Abschnitt grob umrissenen Aufgaben der Leukozyten lässt sich ersehen, dass es für ihre Funktion von zentraler Bedeutung ist, aus Gefäßen in Gewebe auszuwandern. Diese so genannte **Leukozytenextravasation** findet während der regulären Immunüberwachung sowie auch im Entzündungsfalle statt.

Den Befund, dass nur bestimmte Typen von Leukozyten in bestimmte Gewebe zu bestimmten Zeitpunkten auswandern, erklärt man sich durch die Kombination einer Reihe von Zelladhäsionsmolekülen und der dadurch erzeugten Signale in einer regulierten Abfolge. Nachdem von Andrian et al. 1991 ein Zwei-Stufen-Modell vorgeschlagen, wurde das heute als **klassische Adhäsionskaskade** bezeichnete Modell von E.C. Butcher 1991 und T.A. Springer 1994 in drei Schritte eingeteilt: **1. reversible Adhäsion** **2. Leukozytenaktivierung** **3. aktivierungsabhängige feste Bindung**. 2007 wurden neuere Erkenntnisse in das Modell der Adhäsionskaskade integriert und damit in nun 7 Schritte unterteilt: **1. initialer Kontakt**, **2. Rollen**, **3. langsames Rollen**, **4. feste Adhäsion**, **5. Verstärkung der Adhäsion**, **Abflachen des Leukozyten**, **6. Intravaskuläres Kriechen**, **7. parazelluläre oder transzelluläre Transmigration**. (Ley *et al.*, 2007) Eine schematische Darstellung dieses Vorganges ist in **Abb. 1** zu finden. Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte und die daran beteiligten Moleküle näher erläutert.

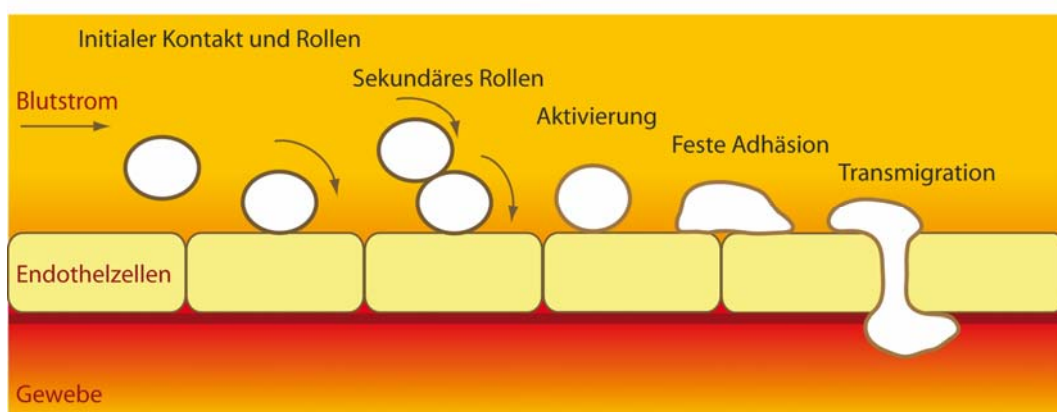


Abb. 1: Adhäsionskaskade; schematische Darstellung. Erläuterungen im Text.

Der erste Schritt der Adhäsionskaskade ist der initiale Kontakt. Dabei gehen die Leukozyten mit den Endothelzellen eine Reihe von transienten reversiblen Bindungen ein, wodurch es zum Rollen der Leukozyten entlang des Endothels kommt. Der initiale Kontakt und das Rollen wird durch Bindung transmembranärer Zelladhäsionsmoleküle vermittelt, den so genannten **Selektinen** und ihren Liganden. Die drei Mitglieder der Familie der Selektine sind **L-Selektin**, welches auf den Leukozyten exprimiert wird, sowie **E-** und **P-Selektin**, welche auf den Endothelzellen oder im Falle von P-Selektin auch auf Plättchen exprimiert werden. L-Selektin wird konstitutiv exprimiert und ist somit stets funktionsbereit. P-Selektin wird nach Induktion durch Entzündungsmediatoren aus intrazellulären Speichergranula, den so genannten Weibel-Palade-Körperchen (in Endothelzellen) oder α -Granula (in Plättchen), auf die Zelloberfläche gebracht. E-Selektin wird auf transkriptioneller

Ebene reguliert und erscheint ebenfalls nach Induktion, aber zeitlich als letztes nach den anderen beiden Selektinen. Selektine sind C-Typ Lektine, die Calcium-abhängig Kohlenhydratstrukturen binden, die auf Proteinen präsentiert werden. Bei den Kohlenhydratstrukturen handelt es sich um **sialylierte, fucosylierte** und **sulfatierte** Epitope, die sich von der Grundstruktur des Tetrasaccharides **sialyl Lewis X** ableiten (s Abschn. 1.4 und Abschn. 1.6).

Sobald die ersten Leukozyten auf dem Endothel rollen, können weitere Leukozyten sekundär an die rollenden Zellen adhären und auf diesen rollen, wodurch die Leukozyten am Ort der Entzündung akkumulieren (Alon *et al.*, 1996; Walcheck *et al.*, 1996). Bei diesem Vorgang ist die Bindung von L-Selektin an den Liganden P-Selektin Glykoprotein-Ligand 1 (**PSGL-1**) beteiligt (s. Abschn. 1.6)

Durch das Rollen bewegen sich die Leukozyten langsam an den Endothelzellen entlang und kommen in Kontakt mit Chemokinen und anderen Aktivierungssignalen. Die Effizienz der Leukozytenrekrutierung ist bei vielen Chemokinen von deren Präsentation auf Glykosaminoglykanen (**GAGs**) abhängig. Die Expression und Wirkung der Chemokine kann in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich sein, was eine weitere Regulationsmöglichkeit zur Erzeugung von Spezifität darstellt. Durch Bindung von Chemokinen an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (**GPCRs**) werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die zur Aktivierung des Leukozyten führen. Durch Aktivierung kommt es zu Degranulation, Aktindepolymerisation und Gestaltänderung des Leukozyten. Unter anderem wird dabei auch die Zusammensetzung seiner Oberflächenmoleküle verändert. L-Selektin wird nach Aktivierung durch Abspaltung, das so genannte „**Shedding**“, von der Zelloberfläche rasch herunterreguliert (Kishimoto *et al.*, 1989). Die Funktion der **Integrine** hingegen wird nach Aktivierung durch Konformationsänderung aus einem niedrigaffinen Zustand in einen hochaffinen Zustand hochreguliert. Diese Richtung der Signaltransduktion nennt man auch „**inside-out signalling**“.

Aktiviert Integrine vermitteln durch Bindung an ihre Liganden ein langsames Rollen, das schließlich die feste Adhäsion des Leukozyten am Endothel ermöglicht. Zum langsamen Rollen werden neben E-Selektin (Kunkel and Ley, 1996) vor allem **β_2 -Integrine** wie **LFA-1** oder **MAC-1** benötigt (Dunne *et al.*, 2002). Außerdem ist das **β_1 - Integrin VLA-4** von entscheidender Bedeutung für das Rollen und auch das Abstoppen des Leukozyten. Die feste Adhäsion wird dann durch Bindung von Integrinen an Mitglieder der **Immunglobulin-Superfamilie** wie **ICAM-1** und **VCAM-1**, die von den Endothelzellen exprimiert werden, vermittelt (Campbell *et al.*, 1998). Neben der Adhäsionsfunktion haben Integrine auch Signalfunktion. Nach Ligandbindung werden Signale ins Innere generiert, („**outside-in signalling**“), die Zellfunktionen wie Motilität, Proliferation und Apoptose regulieren (Giagulli *et al.*, 2006; Shattil, 2005).

Der letzte Schritt in der Adhäsionskaskade ist die **Transmigration** (auch: **Diapedese**) durch die Gefäßwand. Bevor es dazu kommt, „kriecht“ der abgeflachte Leukozyt in MAC-1-ICAM-1-abhängiger Weise an der Gefäßwand entlang, um eine geeignete Stelle zur Transmigration zu finden (Phillipson *et al.*, 2006; Schenkel *et al.*, 2004). An der Transmigrationsstelle bilden die Endothelzellen kleine Fortsätze, die reich an ICAM-1 und/oder VCAM-1, cytoplasmatischen Molekülen wie **Ezrin**, **Radixin** und **Moesin (ERM-Proteine)** und cytoskeletalen Komponenten wie Vinculin, α -Actinin und Talin-1 sind (Barreiro *et al.*, 2002; Carman and Springer, 2004). Für die **parazelluläre** Route muß die

festen Bindung der Moleküle, die die Zell-Zellkontakte ausbilden, gelockert werden, so dass der Leukozyt zwischen den Endothelzellen hindurchwandern kann. Diese Zelladhäsionsmoleküle unterstützen die Transmigration abhängig von teils unterschiedlichen Aktivierungssignalen und Signaltransduktionswegen und bilden somit eine weitere Möglichkeit für die Selektivität für bestimmte Leukozyten-Subpopulationen. Neben der Transmigration auf dem parazellulären Wege gibt es für Leukozyten im zentralen Nervensystem noch die Möglichkeit, **transzellulär** zu migrieren (Feng *et al.*, 1998). Der genaue Mechanismus der transzellulären Migration ist unbekannt. Innerhalb der extrazellulären Matrix bewegen sich die Leukozyten unter anderem mithilfe von $\beta 1$ -Integrinen. Diese Migration wird vereinfacht durch leukozyteneigene Proteasen, die Matrixkomponenten abbauen können. Zusätzlich können durch selektive Spaltung von Matrixkomponenten chemotaktische Fragmente generiert werden (Adair-Kirk and Senior, 2008).

1.3 Selektine und Entzündung

In Abschnitt 1.2 wurde erläutert, dass Selektinen eine wichtige Rolle bei den ersten Schritten der Adhäsionskaskade zukommt, da ohne initialen Kontakt und Rollen keine Extravasation erfolgen kann. Leukozytenextravasation ist ein entscheidender Vorgang bei der Entzündungsreaktion und damit sind Selektine in die Entstehung und die Komplikation von akut- und chronisch-entzündlichen Krankheiten involviert. Diese Beteiligung wurde durch Antikörper-Studien und **knock-out-Modelle** bestätigt. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass sich die Extravasation von Neutrophilen in entzündetes Gewebe nach Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen L-Selektin stark verringern lässt (Jutila *et al.*, 1989). Auch in Selektin-*knock-out* Mäusen oder solchen, denen bestimmte Selektinliganden oder an der Ligandbildung beteiligte Enzyme fehlen, ist eine effektive Neutrophilen-Rekrutierung im Entzündungsfalle nicht möglich (Jung and Ley, 1999; Lowe, 2002; Robinson *et al.*, 1999). Außerdem können naive T Zellen aus L-Selektin-*knock-out* Mäusen nicht in periphere Lymphknoten auswandern, um dort von ihrem Antigen aktiviert zu werden (Catalina *et al.*, 1996).

Die Entzündungsreaktion hat zwei Seiten: Neben der erwünschten Funktion der Eliminierung von Fremdkörpern kann es durch überbordende Leukozyteninfiltration auch zu massiver Gewebeschädigung kommen. Dies ist der Fall in akut- und chronisch-entzündlichen Krankheiten wie **Allergie, Psoriasis, Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis** und bei **chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen**. Auch der **Ischämie-Reperfusionsschaden** basiert auf entzündlichen Reaktionen und spielt eine Rolle bei z.B. Organtransplantationen und Infarkt.

Einer der möglichen therapeutischen Angriffspunkte zur Eindämmung unerwünschter Leukozyteninfiltrationen ist die Hemmung der Extravasation. Hierbei bietet sich der selektinvermittelte initiale Schritt an, da Selektine eine kleine Gruppe einzigartiger Moleküle mit gut eingrenzbarer Funktion sind. Daher werden seit der Entdeckung der Selektine Möglichkeiten der Hemmung der Selektinfunktion zur **antiinflammatorischen Therapie** erforscht. Verschiedenste Inhibitoren aus dem Bereich der Antikörper, kleiner Moleküle, Glykomimetika, Glykokonjugate, rekombinanter Proteintherapeutika und der Naturstoffe sind dafür entwickelt worden und werden gegenwärtig auf ihre Einsetzbarkeit getestet (Ehrhardt *et al.*, 2004; Rossi and Constantin, 2008). Der

derzeit wohl vielversprechendste Pan-Selektin-Inhibitor ist das konjugierte Monosaccharid-Dimer **Bimosiamose** (TBC1269) (Aydt and Wolff, 2002), das in klinischen Studien seine Wirksamkeit unter Anderem bei der Behandlung von Psoriasis und Asthma zeigte (Beeh *et al.*, 2006; Friedrich *et al.*, 2006). Mithilfe von evolutionsbasierten Techniken (SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment) wurden Oligonukleotid-Aptamere, die spezifisch L-Selektin (Hicke *et al.*, 1996) und P-Selektin (Jenison *et al.*, 1998) binden, entwickelt.

Ein weiteres wichtiges Werkzeug bei der Suche nach Selektininhibitoren ist das computergestützte Modellieren artifizierlicher Liganden oder kleiner Moleküle mithilfe von **Kristallstrukturdaten**. Die Kristallstrukturen von E- und P-Selektin wurden bereits gelöst und für die Aufklärung der Ligandenbindung an sialyl Lewis X und das N-terminale Bindungsepitop von PSGL-1 genutzt (Graves *et al.*, 1994; Somers *et al.*, 2000) (vgl. Abschnitt 1.6). Mit diesen Einsichten in die strukturellen Grundlagen der Selektin-Ligandinteraktion können neue Liganden bzw. Inhibitoren modelliert werden. Die Kristallstruktur von L-Selektin war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht veröffentlicht. In Abschnitt 1.5 wird auf die Struktur der Selektine näher eingegangen.

1.4 Glykosylierung

Die meisten Transmembran- und sekretorischen Proteine sind **Glykoproteine**, sind also posttranslational mit Kohlenhydratstrukturen modifiziert. Glykosylierung spielt eine zentrale Rolle bei **Zell-Zellerkennungsprozessen** (Rezeptor-Ligandbindung, Wirt-Pathogenerkennung, Zelldifferenzierung und -entwicklung), bei der **Proteinfaltung, Zielstrukturfindung (Targeting), Sekretion** und der Regulation der **Serumhalblebenszeit**. Bei den in Abschnitt 1.2 dargestellten Abläufen bei der Leukozytenextravasation sind Glykanstrukturen bei der initialen Erkennung von Leukozyt und Endothelzelle beteiligt. Die dafür verantwortlichen Selektine sind Lektine, d.h. sie binden spezifisch an Glykane (vgl. Abschn. 1.6). Zusätzlich sind Selektine selbst auch glykosyliert (vgl. Abschn. 1.7.3)

Proteine, die **N-glykosyliert** werden, werden während der Translation im Endoplasmatischen Retikulum (**ER**) an der Aminosäure-Konsensussequenz **N-X-S/T** (X steht für eine beliebige Aminosäure außer P) mit einem präformierten Vorläuferglykan modifiziert. Dieses besteht aus einem Dolicholphosphat-verknüpften Oligosaccharid aus 2 N-Acetyl-Glucosamineinheiten (GlcNAc), 9 Mannoseresten (Man) und 3 Glucoseresten (Glc). Während der Passage durch die verschiedenen Bereiche des **Golgi-Apparates** spalten bestimmte **Glykosidasen** einzelne Kohlenhydratbausteine des Vorläuferglykans wieder ab („Trimming“), während durch **Glykosyltransferasen** unterschiedliche Glykanbausteine mit dem getrimmten N-Glykan wieder verknüpft werden. Dabei agieren die beteiligten Enzyme in einer regulierten Abfolge, so dass zu gewissem Grade gleiche Grundstrukturen gebildet werden. Je weiter jedoch die Kette verlängert wird, desto heterogener werden die Glykane.

Die endgültige Glykanstruktur hängt hauptsächlich von der Enzymausstattung der jeweiligen Zelle und von der Regulation dieser Enzyme durch z.B. metabolische, proteinimmanente oder andere teilweise noch unbekannte Faktoren ab. Manche Enzyme erzeugen bei der Oligomerisation der Kohlenhydrateinheiten eine Elongation, andere eine Verzweigung. Bei N-Glykanen werden drei Haupttypen unterschieden: „**high-mannose**“, „**Hybrid**“ oder „**Komplex**“ (**Abb. 2**). Allen N-

Glykanen gemein ist eine Basisstruktur („core“) aus zwei *N*-Acetyl-Glucosaminen (GlcNAc) und drei Mannoseeinheiten (Man). Bei *N*-Glykanen vom komplexen Typ können an jede der beiden endständigen Mannosereste der Basisstruktur 1-2 *N*-Acetyl-Glucosamineinheiten geknüpft werden, die jeweils den ersten Baustein der so genannten **Antennen** bilden. Eine Ausnahme bildet dabei das so genannte „*bisecting* GlcNAc“, an das keine weitere Verlängerung erfolgt. Ein Glykan, das mit einem „*bisecting* GlcNAc“ modifiziert ist, ist kein Substrat mehr für Transferasen, die die antennären GlcNAc anknüpfen. Wenn ein Glykan vor der Abspaltung der Mannosereste des Vorläuferglykans durch α -Mannosidase II mit einem *bisecting* GlcNAc versehen wird, entstehen Glykane vom hybriden Typ.

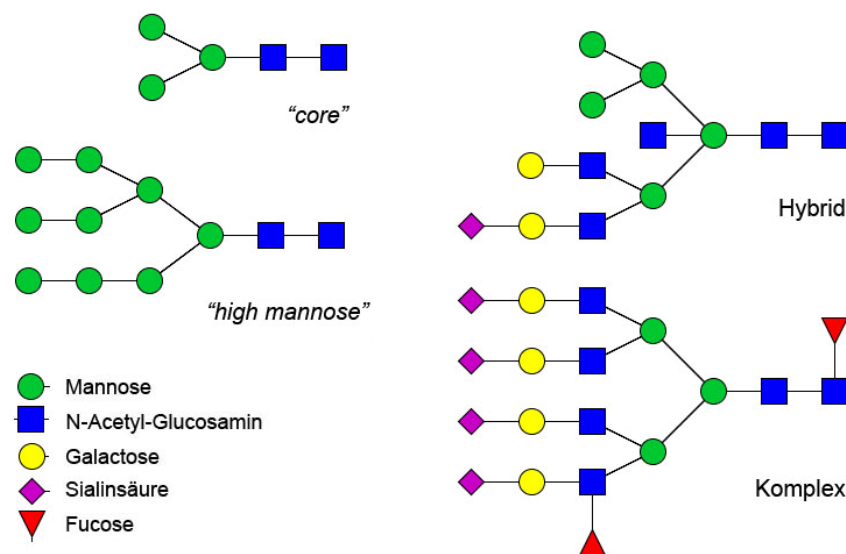


Abb. 2: Grundtypen der *N*-Glykane. Es werden „*high mannose*“, „*hybride*“ oder „*komplexe*“ *N*-Glykane unterschieden. Allen *N*-Glykanen gemein ist die „*core*“-Struktur aus 2 *N*-Acetyl-Glucosamin- und 3 Mannoseresten.

An den antennären GlcNAc-Resten kann jeweils in β 1,4- Verknüpfung ein Galactose-Rest (Gal) folgen, der zusammen mit dem GlcNAc eine **Lactosamin**-Einheit bildet, die sich einige Male unter Bildung eines Polylactosamins wiederholen kann. Am Ende der Antennen können Sialinsäuren in α 2,3 oder α 2,6-Verknüpfung gebunden an Galactose vorliegen. Am ersten GlcNAc der Basisstruktur findet man zudem häufig Fucose in α 1-6 Verknüpfung. Fucosereste können außerdem an den antennären GlcNAc verknüpft vorliegen.

Neben der *N*-glykosidischen Bindung an Asparagin können Glykane auch O-glykosidisch an die Hydroxygruppe von Serin, Threonin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin gebunden sein. Diese Modifikation findet im Golgi-Apparat statt. **O-Glykane** spielen eine große Rolle für die Bildung von **Selektinliganden**, da große verzweigte O-Glykane ein Hauptcharakteristikum von **Muzinen** sind. So besitzen die muzinähnlichen L-Selektin-Liganden PSGL-1, GlyCAM-1 (Hemmerich *et al.*, 1995) und MAdCAM-1 viele O-Glykane, die im terminalen Bereich mit sialyl Lewis X und Sulfatresten versehen sind (vgl. Abschn.1.7.1).

O-Glykane vom Muzin-Typ kommen wohl am häufigsten auf O-glykosylierten Proteinen vor. Sie besitzen an ihrer Basis („core“) stets ein *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc). Es gibt allerdings noch weitere Typen von O-Glykanen, die andere initiale Zucker besitzen. O-Glykane sind zwar generell

eher linear und weniger verzweigt als *N*-Glykane, doch können sie in großer Menge und gebündelt auftreten und eine große Heterogenität erzeugen. Es werden 8 übliche core-Strukturen unterschieden. In **Abb. 3** sind die core-1 und core-2 Strukturen, die für die Bildung von Selektinliganden wichtig sind, gezeigt. Die Regulation der Bildung von Glykanstrukturen findet hauptsächlich auf der Ebene der verantwortlichen Enzyme statt, die gewebespezifisch exprimiert werden. Dadurch kann es sein, dass Proteine in zwei Formen vorkommen, von denen eine bindungsaktiv ist während die andere keine Aktivität zeigt (s. Abschn. 1.6 und 1.7.1). Eine wichtige terminale Struktur auf O-Glykanen ist das Tetrasaccharid sialyl Lewis X (sLeX, **Abb. 3**), seine Isomere sowie sulfatierte sLeX-Varianten.

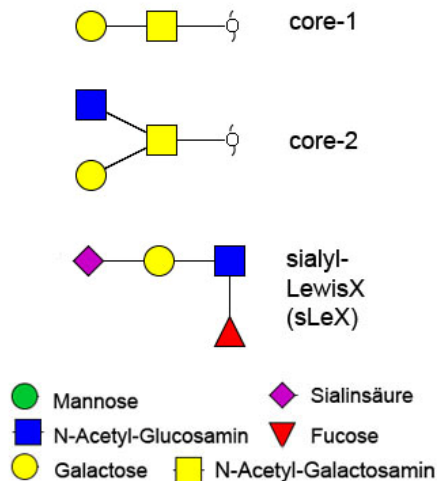


Abb. 3: Ausgewählte O-Glykan-Basisstrukturen. Die „core-1“ und „core-2“ Verzweigungen kommen bei Muzinen vor. Unten: Tetrasaccharid sialyl Lewis X (sLeX).

Glykosylierungsmuster können sich mit dem physiologischen Zustand der Zelle verändern. Das prominenteste Beispiel sind Tumorzellen, bei denen die Oberflächenexpression von sLeX und sLeA-Epitopen verändert ist. Diese Veränderung ist positiv korreliert mit

Tumorprogression und Metastasierung (Thurin and Kieber-Emmons, 2002), weshalb die therapiegerichtete Forschung Möglichkeiten zur Manipulation von Glykosylierungsenzymen untersucht.

1.4.1 Glykosylierung in der Biotechnologie

Um **rekombinante Proteine als Therapeutika** einsetzen zu können, müssen die Prozesse zur Herstellung und die Endprodukte genau regulierbar und charakterisierbar sein. Dies ist zum einen nötig, um gleich bleibende Qualität zu erhalten und zum Anderen, um **Immunogenität** und mögliche unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Bei Glykoproteinen ist es wegen der **Mikroheterogenität** der Glykanstrukturen besonders schwierig, das Endprodukt eines Herstellungsprozesses zu charakterisieren. Durch Veränderung im physiologischen Zustand der Zelle können sich Glykosylierungsmuster verändern, was es erschwert, Proteine bezüglich der Glykanstrukturen gleich bleibend zu produzieren.

Nicht alle Glykoproteine benötigen ihre Glykanstrukturen, um ihre Aufgabe als rekombinantes Therapeutikum zu erfüllen. Manche dieser Proteine können in Prokaryonten produziert werden, welche keine Glykanstrukturen ausbilden. Viele Glykoproteine hingegen benötigen Glykane für ihre Funktion oder auch für Ihre **Löslichkeit** und **Sekretion**. Bei der Herstellung solcher Glykoproteine, die ihre Glykosylierung für die Funktion als z.B. Selektinligand

benötigen, muß auch die Enzymausstattung der Wirtszelllinie beachtet werden. Sind die erforderlichen Glykosyltransferasen und Sulfotferasen in der Produktionszelllinie nicht enthalten, können sie jedoch zusätzlich transfiziert werden, um eine funktionelle Glykosylierung zu erhalten. So müssen z.B. CHO-Zellen mit *Core-2 GlcNAc-TI* und *FucT-VII* kotransfiziert sein, um rekombinantes PSGL-1 als Selektinligand funktionell zu glykosylieren (Huang *et al.*, 2000). Außerdem können Glykane die **Proteinfaltung** und Halblebenszeit im Serum beeinflussen. In der pharmazeutischen Industrie werden daher Anstrengungen unternommen, steuernd in die Ausbildung von Glykanstrukturen einzugreifen, um zum Beispiel die **Serumhalblebenszeit** zu verlängern. Werden rekombinante Proteintherapeutika zum Beispiel durch Expression in Insektenzellen nicht mit komplexen Glykanen modifiziert, werden sie mit hoher Wahrscheinlichkeit schneller durch den humanen Asialoglykoproteinrezeptor aus dem Serum entfernt (**clearance**), da ihnen endständige Sialinsäuren fehlen (Ashwell and Morell, 1974). Auch an diesen Stellen versucht man biotechnologisch einzugreifen, indem man Glykanstrukturen humanisiert und den Sialinsäurestoffwechsel modifiziert. Glykanstrukturen sind darüber hinaus immunogen. Bei Xenotransplantaten zum Beispiel wirken die Glykanstrukturen immunogen, die von dem einem Organismus gebildet werden können, von einem anderen hingegen nicht. Das gleiche gilt für Blutgruppenantigene bei der herkömmlichen Transplantation und für in anderen Organismen hergestellte rekombinante Glykoproteine (Conradt *et al.*, 1995). Glykane sind dennoch bei Weitem nicht ausschließlich technisch hinderlich, sondern für die Funktion mancher Glykoproteine essentiell.

Die **Strukturaufklärung** durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse ist bei Glykoproteinen deutlich erschwert. Einerseits können die Glykane den Kristallisationsprozeß an sich stören, andererseits können heterogene Glykanstrukturen die Auflösung der Röntgenbeugungsmuster herabsetzen. Wenn es nicht möglich ist, ein Protein ohne Glykane durch Expression in Prokaryonten herzustellen, versucht man zunächst, einen Expressionswirt zu nutzen, der nur einfache und homogene Glykane synthetisieren kann. Hier bietet sich die Expression in der methylotrophen **Hefe** *Pichia pastoris* an. Dieser Organismus ist einfach und kostengünstig ähnlich den Bakterien zu kultivieren, besitzt aber als Eukaryont die Ausstattung zu posttranslationaler Modifikation. Die Hefe erkennt Glykosylierungs-Konsensussequenzen und modifiziert diese mit einem einfachen Glykan aus sich wiederholenden Mannoseeinheiten (Blanchard *et al.*, 2007). Auch **Insektenzellen** haben sich durch hohe Produktivität und einfache Glykanstrukturen bewährt. Ist man dennoch darauf angewiesen, das zu kristallisierende Glykoprotein in **Säugerzellen** zu produzieren, kann man, sofern es die Löslichkeit des Proteins erlaubt, aufgereinigte Proteine nachträglich enzymatisch deglykosylieren. In manchen Fällen ist auch die Produktion in Anwesenheit eines Inhibitors der Glykosylierungsmaschinerie möglich. Immer öfter werden auch genetisch modifizierte Säugerzelllinien zur Proteinproduktion eingesetzt, denen bestimmte Schlüsselenzyme zur Glykosylierung fehlen. Solche Zelllinien wurden ursprünglich für die Aufklärung der Glykosylierungsmechanismen hergestellt, doch gewinnen sie mehr und mehr an Bedeutung für die Strukturbiologie (Chang *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 1993; Stanley *et al.*, 1975).

1.5 Selektinstruktur

Die 3 Mitglieder der Familie der Selektine haben eine gemeinsame Domänenstruktur (**Abb. 4**). *N*-terminal besitzen sie eine Calcium-abhängige, kohlenhydratbindende **C-Typ Lektindomäne**, gefolgt von einer **EGF-ähnlichen Domäne**. Daran schließen sich zwischen zwei und neun sogenannte „short consensus repeats“ (**SCR-Domänen**) an, die Homologien zu komplementbindenden Proteinen haben. Von diesen SCR Domänen besitzt humanes L-Selektin zwei, E-Selektin sechs und P-Selektin neun (Bevilacqua *et al.*, 1989; Johnston *et al.*, 1989; Lasky *et al.*, 1989; Siegelman *et al.*, 1989; Tedder *et al.*, 1989). C-terminal folgen den SCR Domänen eine **Transmembrandomäne** und ein kurzer **cytoplasmatischer Teil**.

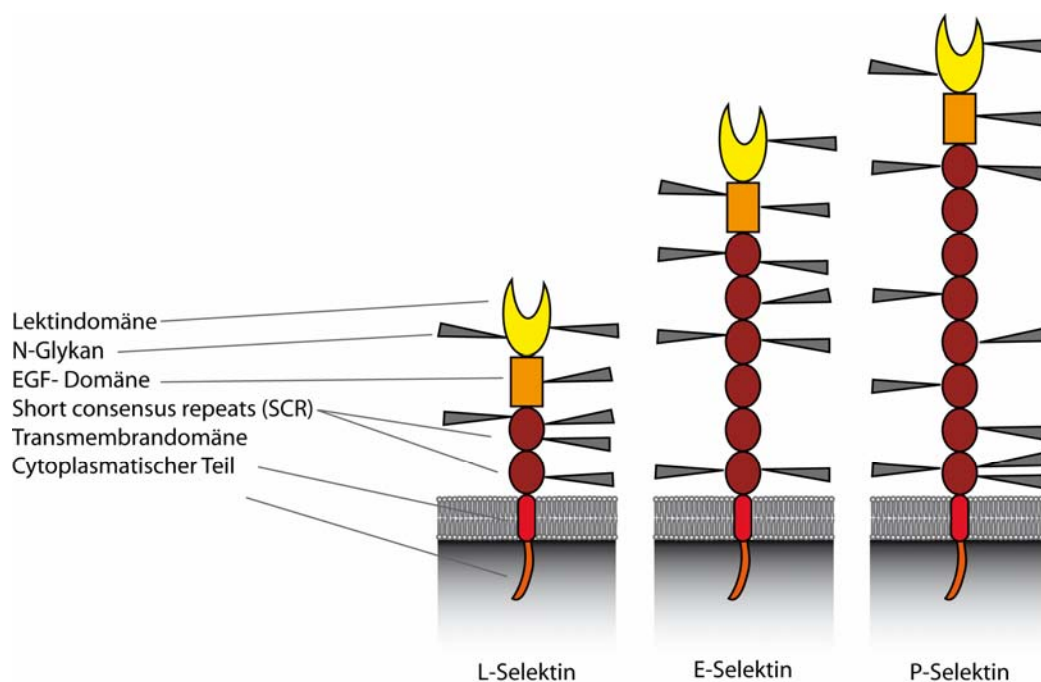


Abb. 4: Domänenstruktur der Familie der Selektine

Humanes L-Selektin ist mit seinen Homologen aus Maus und Ratte in den Lektin-EGF und SCR-Domänen zu 71-93% identisch (Watanabe *et al.*, 1992). Der Transmembran- und cytoplasmatische Teil von L-Selektin ist zwischen Maus, Mensch, Ratte und Rind hochkonserviert, jedoch gibt es innerhalb der Selektinfamilie, also zwischen E- P- und L-Selektin keinerlei Homologie in diesem Bereich (Chen *et al.*, 1995). Die Anzahl der SCR- Domänen ist für L-Selektin bei Maus, Mensch und Ratte gleich; bei E- und P-Selektin variiert die Anzahl zwischen den Spezies.

Alle Selektine besitzen mehrere *N*-Glykosylierungsstellen im extrazellulären Bereich. Eine verkürzte Form von E-Selektin, die nur die Lektin- und EGF- Domänen umfaßt, konnte nach enzymatischer Deglykosylierung kristallisiert und die **Kristallstruktur** gelöst werden (Graves *et al.*, 1994). Es zeigte sich, dass die Struktur der Lektindomäne große Ähnlichkeit mit jener des Mannose-Bindeprotein (**MBP**) hat, welches ebenfalls ein C-Typ Lektin ist. Ebenso hat die EGF-Domäne die typische Struktur, die auch in anderen Proteinen mit EGF-ähnlichen Modulen zu finden ist (Weis,

1994). Die Interaktionen zwischen der Lektin- und EGF-Domäne sind begrenzt. Nur die Aminosäurereste 135-139 der EGF-Domäne haben durch einige Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Interaktionen Kontakt mit der Lektindomäne. In der Lektindomäne formt ein **Calcium-Ion** mit den Seitenresten von E80, N82, N105 und D106, sowie dem Hauptketten-Carbonyl von D106 und zwei Wassermolekülen eine pentagonale bipyramidale Koordinations-Sphäre (vgl. auch **Abb. 5**). Mithilfe der Kristallstruktur von E-Selektin, MBP und Sequenzvergleichen wurde ein Templat für die Modellierung von Selektinstrukturen und mit diesem ein Modell für L-Selektin erstellt (Bajorath and Aruffo, 1995). Die Kristallstrukturdaten von L-Selektin (ohne Ligand) wurden 2008 in die **RCSB Protein Data Base** eingepflegt. Die Analyse und Beschreibung dieser Struktur steht noch aus, sie wurde bislang nur als Grundlage für ein Modell der Ligandbindung an PSGL-1 verwendet (Klopocki *et al.*, 2008). Die Strukturen von E- und P-Selektin wurden im Komplex mit Liganden gelöst (Somers *et al.*, 2000), wodurch erstmals die strukturelle Basis der Ligandinteraktion untersucht werden konnte (s. Abschnitt 1.6)

1.6 Selektin-Ligand Interaktionen

Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt, sind Selektine C-Typ Lektine, die Calcium-abhängig Kohlenhydratstrukturen binden. Alle drei Selektine binden Glykane, die Lactosamineinheiten mit α 2,3-verknüpfter Sialinsäure und α 1,3- oder α 1,4-verknüpfter Fucose enthalten. Die Grundform dieser Strukturen ist das Tetrasaccharid **sialyl Lewis X**. Der Antikörper **HECA-452** definiert sialyl Lewis X bzw. sialyl Lewis A-ähnliche Kohlenhydrat epitope, die auf HEV, Monozyten, dendritischen Zellen und einem Teil von Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird (Duijvestijn *et al.*, 1988; Picker *et al.*, 1994). Trotz der gemeinsamen Grundstruktur unterscheiden sich die Ligandspezifitäten der Selektine bezüglich der Affinität, Avidität und physiologischen Relevanz. Für L- und P-Selektin, nicht aber für E-Selektin, bewirkt ein zusätzliches Sulfat an der sLeX-Struktur eine Erhöhung der Affinität (Koenig *et al.*, 1997). Auch binden P- und L-Selektin im Gegensatz zu E-Selektin an sulfatierte Glykanstrukturen wie Sulfatide und Heparansulfate (Foxall *et al.*, 1992; Imai *et al.*, 1990; Varki, 1997)

Ein wichtiger Ligand, an den alle drei Selektine binden können, ist das **PSGL-1** (*P-selectin glycoprotein ligand-1*). PSGL-1 ist ein transmembranäres, homodimeres muzinähnliches Glykoprotein, das auf fast allen Leukozyten exprimiert wird. Für die Bindung an Selektine sind ein mit sLeX dekoriertes **O-Glykan** und 1-3 benachbarte **sulfatierte Tyrosinreste** im N-terminalen Bereich wichtig (Cummings, 1999; Rodgers *et al.*, 2001; Sako *et al.*, 1995). Die Bindung von E-Selektin an PSGL-1 ist unabhängig von der Sulfatierung (Pouyani and Seed, 1995) und scheint im Gegensatz zur Interaktion mit P- und L-Selektin keine physiologische Relevanz bei der Extravasation zu haben (Yang *et al.*, 1999). Als Modell-Ligand wird oft nur das N-terminale Peptid von PSGL-1 (Sulfoglykopeptid, SGP) genutzt (Leppanen *et al.*, 2003). Die Bindungsepitope müssen nicht unbedingt von einem Peptidrückgrat präsentiert werden, es ist auch möglich, sie auf anderen Trägern zu immobilisieren. So wurde in der vorliegenden Arbeit für die Affinitätschromatographie und für Bindungsstudien ein auf einem Polyacrylamid-Polymer immobilisiertes sLeX in Nachbarschaft zu einem sulfatierten Tyrosin, kurz **sTyr/sLeX-PAA**, verwendet (Enders *et al.*, 2007). Bei diesem synthetischen Bi-Liganden spielt die Multimerisierung der Bindungsepitope eine wichtige Rolle.

Durch Multimerisierung erhöht sich die relativ geringe Affinität von monomerem sLeX an Selektine drastisch (Maaheimo *et al.*, 1995; Renkonen *et al.*, 1997; Toppila *et al.*, 1997).

Experimente mit **chimären** Molekülen geben Hinweise darauf, dass die Lektindomäne die Ligandenspezifität vermittelt. Die EGF-Domäne ist dennoch indirekt an der Bindung beteiligt (vgl. Abschnitt 1.6.1). Ein chimäres Molekül aus der Lektindomäne von L-Selektin und der EGF-Domäne von P-Selektin zeigte eine duale Ligandenspezifität (Kansas *et al.*, 1994). Der Austausch der SCR-Domänen hatte in diesen Studien keinen Einfluß auf die Bindungsspezifität. Die Bindung an Polyphosphomannan allerdings war bei L-Selektin, dem die SCR-Domänen fehlten, stark vermindert (Watson *et al.*, 1991).

Die Kristallstrukturen von E-Selektin und P-Selektin (jeweils bestehend aus der Lektin- und

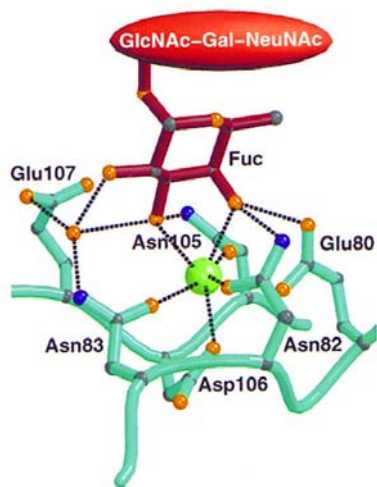


Abb. 5: Interaktionen von sialyl Lewis X mit der Ligandenbindungsstelle von E-Selektin. Der Ausschnitt fokussiert auf die Calcium-Koordination (Calcium-Ion grün). Aus Somers *et al.*, 2000.

EGF-Domäne) im Komplex mit sialyl Lewis X und dem N-terminalen Teil von PSGL-1 zeigten, dass die Struktur von P-Selektin bei Ligandbindung sehr ähnlich, doch nicht identisch mit der E-Selektin-Struktur ist (Somers *et al.*, 2000). Beim P-Selektin gibt es, ebenso wie bei E-Selektin, nur einen kleinen Bereich, in dem die Lektin- und EGF-Domänen intramolekular interagieren. Die Ligandenbindungsstelle für sLeX ist bei E- und P-Selektin hochkonserviert. Die Interaktion von sLeX mit der Lektindomäne ist hauptsächlich elektrostatischer Natur. Sowohl bei P- als auch bei E-Selektin wird das Calcium-Ion, das in der Lektindomäne gebunden ist, mit den Hydroxylgruppen in 3- und 4- Position des Fucoserestes von sLeX gebunden (**Abb. 5**). Die Aminosäureseitenketten von E- und P-Selektin sind dabei in jeweils unterschiedlicher Weise beteiligt, die bei E-Selektin eine

Konformationsänderung mit einschließt. In **Abb. 5** ist aus Gründen der Übersichtlichkeit die Interaktion der Bindungstasche mit den Galactoseresten von sLeX nicht zu sehen. Diese formen in beiden Selektinen Wasserstoffbrücken zum Y94 und E92. Die Carboxylatgruppen der Sialinsäure formen Wasserstoffbrücken zu Y48. Die Sialinsäure bindet E-Selektin im Gegensatz zu P-Selektin unter Einbeziehung einer Konformationsänderung mit einer größeren Zahl molekularer Interaktionen.

1.6.1 Dynamische Selektin-Ligandinteraktion

Selektin-Ligandbindungen finden im Blutstrom unter **Flußbedingungen** und unter Einwirkung von Scherkräften statt. Damit der Leukozyt auf dem Endothel rollen kann, müssen zahlreiche Bindungen zwischen den Rezeptoren und Liganden schnell aufgebaut und gelöst werden. Die Selektinstruktur und ihre Art der Ligandenbindung sind an diese Anforderungen angepaßt. Für L-Selektin wurde gezeigt, dass ein **Scherkraft-Schwellenwert** von etwa 0,7 dyne/cm benötigt wird, um die volle Bindungsstärke zu erhalten (Dwir *et al.*, 2003; Finger *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 2000). Zellen rollen bei gleicher Bindungsstärke deutlich schneller L-Selektin-vermittelt als über E- und P-Selektin, was eine Anpassung an die unterschiedlichen Positionen der Selektine innerhalb der

Adhäsionskaskade (vgl. Abschnitt 1.2) darstellen könnte (Puri *et al.*, 1997).

Rezeptor-Ligand-Bindungen, die unter Einwirkung mechanischer Kräfte eine verlängerte Lebensdauer zeigen, werden "**catch-bonds**" genannt. Bei "**slip-bonds**" hingegen verringert sich die Bindungsdauer mit steigender einwirkender Kraft. Für die L-Selektin-PSGL-1 Interaktion wurden beide Bindungsmodi und ein Übergangszustand mittels Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) und Flusskammeruntersuchungen experimentell gezeigt (Marshall *et al.*, 2003; Sarangapani *et al.*, 2004; Yago *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Zhu and McEver, 2005).

Die Kristallstrukturen von P-Selektin allein und gebunden an das Sulfoglykopeptid von PSGL-1 zeigen zwei Konformationen, bei denen der **Winkel** der Lektindomäne zur EGF-Domäne verändert ist (Somers *et al.*, 2000). In **Abb. 6** sind die beiden Strukturen graphisch überlagert zu sehen. Blau dargestellt ist die Struktur von P-Selektin ohne Ligand und rot jene mit Ligand. Deutlich zu sehen ist die Veränderung des Winkels zwischen der Lektin- und EGF-Domäne.

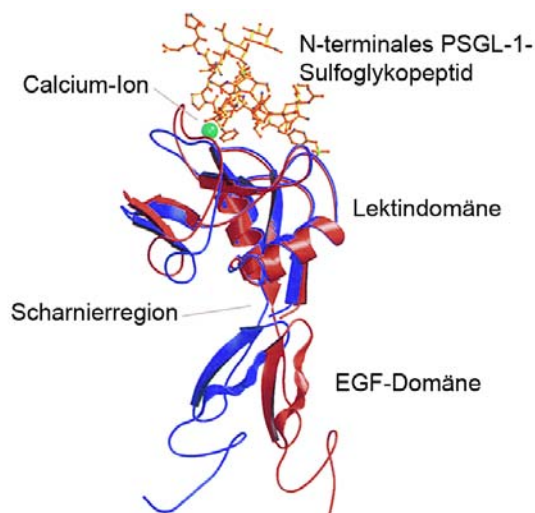


Abb. 6: Kristallstrukturmodelle von P-Selektin (Lektin- und EGF- Domäne) im Komplex mit dem N-terminalen Sulfoglykopeptid von PSGL-1. Gezeigt sind zwei überlagerte Strukturen: blau dargestellt ist P-Selektin ohne Ligand und rot P-Selektin mit Ligand. Das Calcium-Ion ist als grüner Ball dargestellt. Abbildung leicht verändert aus Somers *et al.*, 2000.

Es wird angenommen, dass die offenere Konformation durch mechanische Zugkräfte begünstigt ist und zu erhöhter Bindungsstärke unter Flussbedingungen führt. Um die Theorie zu bestärken, wurden die Affinitäten für beide Konformationen bei P-Selektin gemessen, indem die ausgeweitete Konformation künstlich durch Einführen eines *N*-Glykans als Keil zwischen der Lektin- und EGF-Domäne provoziert wurde (Phan *et al.*, 2006). Mit dieser Variante transfizierte Zellen zeigen in der Flusskammer und in FACS-Analysen eine höhere Adhäsivität. Für L-Selektin wurde umgekehrt die Mutation N138G eingeführt, die die Flexibilität zwischen den beiden Domänen erhöhen soll, so dass die offene Konformation leichter eingenommen werden kann. In der Flusskammer zeigten mit dieser Mutante transfizierte Zellen eine erhöhte Adhäsivität rollender Zellen und eine stärkere Resistenz gegen Ablösung durch Scherkräfte Diese Mutation wurde mithilfe von MD (*molecular dynamics*-) Simulationen im Vergleich zur offenen und geschlossenen Konformation von P-Selektin näher untersucht und bestätigt. Da sich die Ligandenbindungsstelle außerhalb der Interaktionsfläche der Lektin- und EGF Domäne befindet, wurde ein "**sliding-rebinding**"-Modell aufgestellt, das einen möglichen Mechanismus der Selektin-Ligandbindung durch Konformationsänderung der Domänen zueinander beschreibt. Die „offene“ Konformation führt demnach zu einer Ausrichtung der Ligandenbindungsstelle in Richtung der einwirkenden Kraft,

wodurch der Ligand "abgleiten" kann und die Möglichkeit hat, schneller eine neue Interaktion auszubilden (Lou *et al.*, 2006).

1.7 L-Selektin

L-Selektin wurde als **Homing Rezeptor** durch Einsatz des Antikörpers **MEL-14** entdeckt, der die Bindung von Lymphozyten an HEV peripherer Lymphknoten blockiert (Gallatin *et al.*, 1983). Nachdem das Antigen isoliert war, konnte dessen Bindung an HEV und die Fähigkeit, nachfolgende Lymphozytenbindung zu blockieren, bestätigt werden (Geoffroy and Rosen, 1989). Vor seiner systematischen Benennung als L-Selektin oder **CD62L** wurde es je nach Untersuchungsfokus und Spezies unter einer Reihe von Synonymen beschrieben: Mel-14-Antigen, Leu-8 Antigen, LAM-1, LEC.CAM-1, TQ-1Antigen, LNHR (*Lymph node homing receptor*), Ly-22 Antigen, DREG56 Antigen und LECAM-1 (Anderson *et al.*, 1991; Kansas *et al.*, 1985; Spertini *et al.*, 1991; Tedder *et al.*, 1989). Durch Antikörperstudien und Klonierung der cDNA konnte gezeigt werden, dass LAM-1, TQ1 und Leu-8 dieselben Antigene sind (Tedder *et al.*, 1990). Aufgrund der **Lektinfunktion** des Rezeptors (Rosen *et al.*, 1985; Stoolman and Rosen, 1983), die auch nach der Klonierung durch Sequenzanalyse gefunden wurde (Lasky *et al.*, 1989; Siegelman *et al.*, 1989), wurde das MEL-14 Antigen einheitlich zu L-Selektin umbenannt. Homologe Moleküle der Maus, die bereits unabhängig untersucht wurden, konnten identifiziert werden (Bowen *et al.*, 1989; Tedder *et al.*, 1989). Schließlich wurde die Funktion von L-Selektin beim Rollen der Leukozyten und beim *Homing* in **knock-out**-Modellen bestätigt (Arbones *et al.*, 1994; Frenette and Wagner, 1997). L-Selektin wird konstitutiv auf der Oberfläche der meisten Leukozyten exprimiert; dazu gehören Lymphozyten, Neutrophile, Monozyten, Eosinophile, hematopoietische Vorläuferzellen und unreife Thymozyten (Gallatin *et al.*, 1983; Griffin *et al.*, 1990; Tedder *et al.*, 1990; Tedder *et al.*, 1995). Auf der Zelloberfläche liegt L-Selektin gebündelt an der Spitze der Mikrovilli vor (Bruehl *et al.*, 1996; Erlandsen *et al.*, 1993; Hasslen *et al.*, 1995; Picker *et al.*, 1991). Durch die Bündelung („**clustering**“) wird offenbar die Affinität zu den Bindungspartnern erhöht.

Nicht nur das Rollen von Lymphozyten auf HEV der peripheren Lymphknoten (Gallatin *et al.*, 1983; Kishimoto *et al.*, 1991; Spertini *et al.*, 1991; Tedder *et al.*, 1990) wird von L-Selektin vermittelt, sondern auch die Rekrutierung der Leukozyten bei Entzündungsreaktionen (Hallmann *et al.*, 1991; Jutila *et al.*, 1989; Lewinsohn *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1991; Spertini *et al.*, 1992; Spertini *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1991) (vgl. Abschnitt 1.3). L-Selektin **knock-out** Mäuse zeigen eine stark verminderte Immunantwort in einem Kontakt-Hypersensitivitäts-Modell. Im **knock-out** Modell zeigt sich außerdem die besondere Beteiligung von L-Selektin an der Rekrutierung von Neutrophilen an Nieren- und Lungenendothelien (Brady *et al.*, 1992; Doyle *et al.*, 1997).

Neben der mechanischen Funktion, das Rollen der Leukozyten zu vermitteln, besitzt L-Selektin über seinen cytoplasmatischen Teil die Fähigkeit zur **Signaltransduktion**. Über den cytoplasmatischen Teil ist L-Selektin mit dem Aktincytoskelett verbunden und ist in die cytoskeletale Reorganisation und die Ausbildung von Membranprotrusionen involviert (Brenner *et al.*, 1997; Pavalko *et al.*, 1995). Nach Quervernetzung des Rezeptors durch Sulfatide oder Antikörper kommt es zu einem Anstieg intrazellulären Calciums und der Induktion von mRNA für die Cytokinproduktion

(Laudanna *et al.*, 1994). Weiterhin kommt es zu Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von MAPK (Waddell *et al.*, 1995) sowie des Ras Signalweges (Brenner *et al.*, 1996). Die Lck Kinase phosphoryliert Y372 von L-Selektin und bildet mit c-Abl und ZAP-70 einen Signalkomplex (Xu *et al.*, 2008). Die PKC Isozyme α , ι und θ binden an den serinphosphorylierten cytoplasmatischen Teil von L-Selektin und können diesen phosphorylieren (Kilian *et al.*, 2004). Bei Neutrophilen führen L-Selektin-Signale zu Degranulation und Produktion von Superoxidradikalen (Waddell *et al.*, 1994). Eine weitere Signalwirkung von L-Selektin ist die Erhöhung der β 2-Integrin-Adhäsivität (Crockett-Torabi *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1999). Auf Ebene der Transkriptionsfaktoren werden NFAT und NF- κ B aktiviert (Brenner *et al.*, 2002; Turutin *et al.*, 2003).

1.7.1 L-Selektin Liganden

Für L-Selektin ist eine Reihe von Liganden beschrieben (Lowe, 2002; McEver, 2005; Rosen, 2004). Wie alle Selektine bindet L-Selektin an das prototypische Tetrasaccharid sLeX, dies jedoch mit relativ geringer Affinität *in vitro*. Für jedes Selektin gibt es spezifische Liganden *in vivo*. In seiner Funktion als Lymphozyten-Homing-Rezeptor bindet L-Selektin Liganden auf HEV der peripheren Lymphknoten. Ein Großteil der Liganden wird von dem Antikörper **MECA-79** definiert und zu der Gruppe der so genannten **PNAd** (*peripheral node addressins*) zusammengefasst. Die Bindung von MECA-79 und L-Selektin ist abhängig von Sulfaten (Hemmerich *et al.*, 1994). Aus der Gruppe der PNAd sind die Sialomuzine **GlyCAM-1**, **CD 34** und **Podocalyxin** am besten charakterisiert (Imai *et al.*, 1991; Lasky, 1995; Puri *et al.*, 1995; Sasseti *et al.*, 1998). Von diesen Liganden gibt es jeweils auch Varianten, die bei gleichem Proteingerüst nicht an L-Selektin binden, da sie nicht mit den zur Bindung nötigen Glykanstrukturen modifiziert sind. Es ist also notwendig, dass die an der Ligandbildung beteiligten Enzyme jeweils reguliert an bestimmten Orten exprimiert werden.

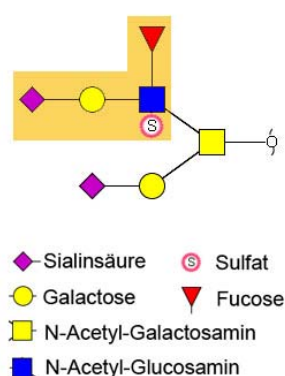


Abb. 7: Der L-Selektin Ligand 6-sulfo-sLeX (orange hinterlegt) auf core-2-verzweigtem O-Glykan.

Durch die detaillierte Analyse der Glykanstrukturen auf GlyCAM-1 konnte die für die spezifische L-Selektin-Bindung erforderliche Glykanstruktur, ein am C6-Atom des *N*-Acetyl-Glucosamin sulfatiertes sLeX, kurz **6-sulfo sLeX**, identifiziert werden (Hemmerich *et al.*, 1995). Dieses 6-sulfo sLeX sitzt als Endstruktur auf einem **core-2**-verzweigten O-Glykan (**Abb. 7**) oder auf beiden Antennen eines erweiterten **core-1** O-Glykan. Ein weiteres Sialomuzin aus dieser Gruppe ist das **Endomucin** (Samulowitz *et al.*, 2002). Von mesenterialen Lymphknoten konnte das **MAdCAM-1** als L-Selektin Ligand isoliert werden, welches nicht auf HEV der peripheren Lymphknoten exprimiert wird (Berg *et al.*, 1993). Auf HEV der Tonsillen gibt es allerdings auch noch einige wenig charakterisierte Liganden, die keine Muzineigenschaften zeigen und nicht das MECA-79-Epitop

tragen (Clark *et al.*, 1998). In jüngster Zeit wurden auf HEV auch *N*-Glykane gefunden, die mit 6-sulfo-sialyl Lewis X dekoriert sind und das Rollen durch L-Selektin auf HEV vermitteln können (Mitoma *et al.*, 2007). Als gänzlich neuartige Liganden konnten Nucleolin und Hsc70 identifiziert

werden (Harms *et al.*, 2001) (Harms, 2002), deren physiologische Relevanz jedoch bislang nicht nachgewiesen wurde. Ebenso gibt es nichtvaskuläre L-Selektin-reaktive Moleküle, z.B. in der weißen Substanz des Hirns, deren physiologische Relevanz aufgrund der Erreichbarkeit des Expressionsortes fraglich ist (Kawashima *et al.*, 1998).

Bei der Leukozyt-Leukozyt-Interaktion durch Bindung von L-Selektin an PSGL-1 sind Sulfate beteiligt, doch werden sie im Falle von PSGL-1 nicht am sialyl Lewis X des O-Glykans, sondern an benachbarten Tyrosinen präsentiert (Leppanen *et al.*, 2003; McEver, 2005) (siehe auch Abschn. 1.6). Sulfate sind auch auf anderen Molekülen wahrscheinlich für die L-Selektin-Bindung entscheidend. So werden unter Anderem eine Reihe von sulfatierten Glykolipiden (Imai *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1993) und sulfatierte Proteoglykane (Watanabe *et al.*, 1999) gebunden. Sulfatreste sind auch eine L-Selektin-bindende Determinante bei artifiziellen Inhibitoren. So konnte gezeigt werden, dass multimerisierte sulfatierte Tyrosine auch ohne einen Kohlenhydratanteil eine inhibitorische Wirkung auf die P- und L-Selektin-Bindung haben (Enders *et al.*, 2007; Pochechueva *et al.*, 2003).

1.7.2 Lösliches L-Selektin

Nach Aktivierung durch physiologische Signale (Ligandbindung oder chemotaktische Faktoren) oder durch den nichtphysiologischen Stimulator PMA (*Phorbol 12-myristat 13-acetat*) wird L-Selektin durch Abspaltung von der Zelloberfläche rasch herunterreguliert (Griffin *et al.*, 1990; Jung and Dailey, 1990; Kishimoto *et al.*, 1989; Kishimoto *et al.*, 1990; Spertini *et al.*, 1991; Tedder *et al.*, 1990). Diese Abspaltung wird als „**Shedding**“ bezeichnet und wird auch in der Zellkultur oder bei längerer Inkubation von Lymphozyten bei 4°C beobachtet (Schleiffenbaum *et al.*, 1992; Spertini *et al.*, 1992). Das für die Abspaltung verantwortliche Enzym wurde in Thymozyten als **TACE/ADAM17** (*Tumor necrosis factor alpha converting enzyme/a disintegrin and metalloproteinase*) identifiziert (Peschon *et al.*, 1998). Die meisten Zelllinien scheinen in der Lage zu sein, das *Shedding* von heterolog exprimiertem L-Selektin zu bewirken. Für das *Shedding* scheinen mehrere Mechanismen verantwortlich zu sein, und so wurde auch ein nichtproteolytisches, mechanisches *Shedding* beschrieben, das in Abhängigkeit von Scherkräften erfolgen kann (Lee *et al.*, 2007). **Calmodulin**, welches konstitutiv an den cytoplasmatischen Teil von L-Selektin bindet, ist an der Regulation des *Sheddings* beteiligt. Wird die Bindung von Calmodulin inhibiert, so wird das *Shedding* hochreguliert (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 1998; Matala *et al.*, 2001).

Nach dem *Shedding* bleibt die lösliche Form von L-Selektin (genannt „sL-Selektin“ (*soluble*)) funktionell aktiv zu ca. 1-3 µg/ml im Blutplasma erhalten (Donnelly *et al.*, 1994; Schleiffenbaum *et al.*, 1992; Spertini *et al.*, 1994; Spertini *et al.*, 1992). Die genaue physiologische Funktion des sL-Selektin ist nicht bekannt. Da es jedoch in hohen Konzentrationen in der Lage ist, die Leukozytenadhäsion an das Endothel zu inhibieren (Schleiffenbaum *et al.*, 1992), geht man davon aus, dass es als kompetitiver Regulator der Leukozyten-Endothel- oder Leukozyten-Leukozyten-Interaktion dienen könnte. Auch rekombinante lösliche L-Selektin-IgG-Fc-Chimären haben eine inhibitorische Wirkung auf die Migration (Ley *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1991). Daher werden rekombinante Selektine in verschiedenen Formen entwickelt und auf ihre Eignung als Inhibitoren der Selektinfunktion getestet. Auf der Seite der Diagnostik werden die Serumspiegel von löslichem L-Selektin und ihre mögliche Assoziation mit verschiedenen Krankheitsbildern untersucht. In der Literatur werden Korrelationen

zwischen dem sL-Selektin-Plasmaspiegel und Allergie, HIV Infektion, Insulin-abhängigem Diabetes mellitus, meningealer Leukämie, multipler Sklerose und Sepsis beschrieben (Ehrhardt *et al.*, 2004).

1.7.3 N-Glykosylierung von L-Selektin

Zur N-Glykosylierung von L-Selektin gibt es nur wenige Untersuchungen. Nach Klonierung der cDNA wurden die 7 potentiellen N-Glykosylierungsstellen identifiziert (Lasky *et al.*, 1989; Siegelman and Weissman, 1989). Humanes L-Selektin wird je nach Zelltyp unterschiedlich glykosyliert, was sich bei gleich bleibendem Proteingerüst in einer unterschiedlichen relativen Molekülmasse von 95-105 kDa auf Neutrophilen und 74 kDa auf Lymphozyten zeigt (Griffin *et al.*, 1990; Kishimoto *et al.*, 1990; Tedder *et al.*, 1990) L-Selektin von Neutrophilen, jedoch nicht von Lymphozyten, ist mit sLeX dekoriert und bindet spezifisch an mit E-Selektin transfizierte Zellen. Anti-L-Selektin Antikörper inhibieren die Bindung von PMN an E-Selektin-Transfektanten um bis zu 70% (Picker *et al.*, 1991). Ähnlich konnte gezeigt werden, dass eine rekombinante E-Selektin-IgG Chimäre spezifisch an L-Selektin auf humanen Neutrophilen, nicht aber auf murinen Neutrophilen, bindet (Zollner *et al.*, 1997). Diese Bindung war Calcium-abhängig, konnte durch Sialidase-Behandlung aufgelöst werden, war jedoch nicht Endoglykosidase F-sensitiv.

In einer anderen Studie zeigte L-Selektin aus Lymphozyten von Patienten mit chronischer lymphozytärer Leukämie ein um ~3,7 kDa verringertes apparentes Molekulargewicht gegenüber L-Selektin von gesunden Menschen. Dieser Unterschied war Sialidase-sensitiv und klar auf eine posttranslationale Modifikation zurückzuführen. Eine veränderte Funktion konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Prystas *et al.*, 1993). In dieser Untersuchung wurde L-Selektin aus verschiedenen Quellen mit großen Unterschieden im apparenten Molekulargewicht im Western Blot gezeigt.

Die Glykanstruktur von rekombinant hergestelltem L-Selektin aus BHK- Zellen wurde untersucht wobei unter Anderem die **H (0) Blutgruppenderminante** gefunden wurde (Gohlke *et al.*, 1999; Gohlke *et al.*, 2000). Untersuchungen zur Ladungsverteilung und Bindungsstärke von unterschiedlich glykosyliertem L-Selektin aus BHK- und K562- Zellen wiesen darauf hin, dass die Sialylierung die Bindungsaktivität von L-Selektin beeinflusst (Fieger *et al.*, 2001). Bislang unbekannt ist die detaillierte Glykanstruktur von löslichem L-Selektin aus dem Serum, sowie von membranassoziiertem L-Selektin auf verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen. Des Weiteren war unklar, ob alle potentiellen N-Glykosylierungsstellen genutzt werden und ob es Unterschiede in der Glykosylierung an den einzelnen Positionen gibt.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst eine Methode zu entwickeln und zu optimieren, mit der sich L-Selektin in großen Mengen gewinnen läßt. Das rekombinant exprimierte L-Selektin sollte in Kristallisationsansätzen getestet werden, um schließlich Kristalle herzustellen und die Kristallstruktur von L-Selektin zu lösen. Die Kristallstruktur sollte dann einzeln und im Komplex mit Liganden gelöst werden.

Neben der Struktur des Proteinanteils von L-Selektin sollte ebenfalls die Struktur und Funktion der Glykane aufgeklärt werden. Hierzu sollten die einzelnen *N*-Glykosylierungsstellen der Lektin- und EGF-Domänen durch gerichtete Mutagenese ausgeschaltet und die Bindungsaktivität der verschiedenen Glykosylierungsmutanten verglichen werden. Weiterhin sollen verschiedene Ansätze zur Modulation der Glykosylierung und deren Einfluß auf die Bindungsaktivität untersucht werden, wobei die 3 *N*-Glykosylierungsstellen der Lektin- und EGF-Domäne wegen ihrer Nachbarschaft zur Ligandenbindungsstelle im Mittelpunkt des Interesses standen. Schließlich sollte die Struktur der *N*-Glykane dieser Abschnitte von L-Selektin aufgeklärt werden.

Für die vorgenannten Ziele war es notwendig, verschiedene Expressionssysteme zu testen und auf ihre Verwendbarkeit für die Kristallisation eines funktionell aktiven, homogenen L-Selektin zu prüfen. Da je nach Expressionssystem unterschiedliche Anforderungen an das Expressionskonstrukt gestellt werden, müssen die Konstrukte im Einfluß mit den Erfahrungen aus den Expressionsversuchen an die Erfordernisse angepaßt werden. Geplant waren daher die Klonierung von geeigneten Expressionsplasmiden, Mutagenesen zur Sequenzoptimierung, Tests verschiedener Aufreinigungsmethoden und Affinitätstags, die Wahl des geeigneten Expressionssystems sowie die Optimierung des Expressionssystems, der Transfektionsmethode und der Kulturbedingungen.

Sobald ein geeignetes Expressionssystem etabliert war, sollte dieses dann auch für die Expression von anderen L-Selektin-Konstrukten genutzt werden. Die Bindungsaffinität von rekombinantem L-Selektin sollte durch Multimerisierung seiner Bindungsdomänen verstärkt werden. Dazu sollte eine dimere, eine pentamere und eine decamere Form von L-Selektin durch Fusion mit Multimerisierungsdomänen anderer Proteine konstruiert werden. Die Expression, Aufreinigung und Bindungsaktivität dieser Konstrukte sollte anschließend untersucht werden.

3 Ergebnisse

Für eine Strukturaufklärung müssen Kristalle gezüchtet werden, die der Röntgenstrukturanalyse unterzogen werden können. Für initiale Kristallisations screenings wird eine größere Menge Protein (> 1 mg) benötigt. Das Protein muß dabei so rein wie möglich, monodispers und hoch konzentriert sein, und nicht zuletzt in einer funktionell aktiven Form vorliegen.

Mit dem Ziel der Gewinnung von rekombinantem L-Selektin für die Kristallisation waren in der Arbeitsgruppe bereits verschiedene Expressionssysteme getestet worden. Zunächst war versucht worden, das Protein nicht-glykosyliert in Prokaryonten zu exprimieren, da Glykane den Kristallisationsprozeß stören können. Es konnte jedoch nur eine geringe Menge nicht-funktionellen und nicht dauerhaft löslichen Proteins aus bakteriellen Expressionssystemen erhalten werden. Anschließend war die Expression in eukaryontischen Expressionssystemen untersucht worden. In Insektenzellen und verschiedenen Säugerzelllinien konnte für Kristallisationsversuche ausreichend L-Selektin gewonnen werden. Allerdings konnte bisher mit keiner dieser rekombinanten L-Selektin-Formen eine Kristallisationsbedingung gefunden werden. Bei diesen Versuchen wurde mit einer sekretierbaren Variante von L-Selektin gearbeitet, die den gesamten extrazellulären Bereich umfaßt, bei der jedoch der Transmembran- und der cytoplasmatische Abschnitt fehlten.

An diese Vorarbeiten anknüpfend, wurde in der vorliegenden Arbeit eine weiter verkürzte Variante von L-Selektin konstruiert, die nur noch die Lektin- und die EGF-Domäne umfaßt (**Abb. 8**). Dieses trunkierte L-Selektin wird im Folgenden als „LE“ bezeichnet. Die für die Bindung von Liganden relevanten Abschnitte sind in der Lektin- und EGF-Domäne lokalisiert und somit in dem verkürzten Konstrukt enthalten (Bowen *et al.*, 1990; Kansas *et al.*, 1991).

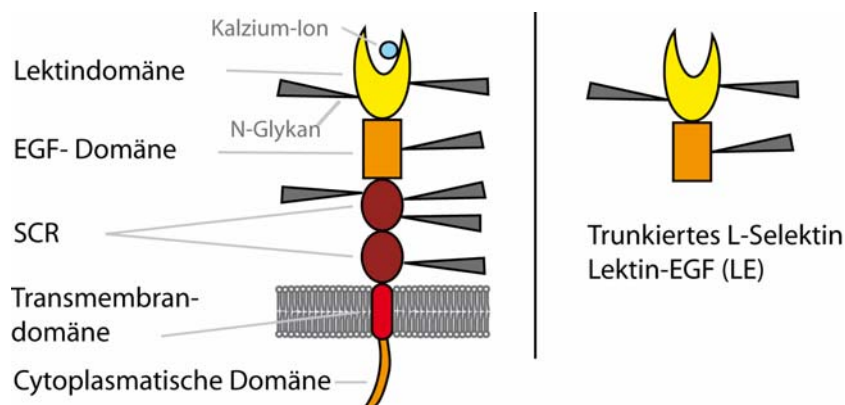


Abb. 8: Aufbau des vollständigen Rezeptors L-Selektin und der trunkierten Variante („LE“)

3.1 Expression von L-Selektin (LE) in *Pichia pastoris*

Zunächst wurde die Expression von C-terminal His-getagtem, trunkiertem L-Selektin (LEHis) in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* untersucht. LEHis wurde in die Expressionsvektoren pHIS-1 und alternativ in pPicZ α und pPic9 kloniert. Dabei wurde das native L-Selektin Signalpeptid gegen das hefeeigene „ α -factor“-Signalpeptid ausgetauscht. Dadurch sollte erreicht werden, dass LEHis in das Kulturmedium sekretiert wird. Zwei Varianten von LEHis wurden getestet: die Wildtyp-Variante und nicht-glykosyliertes LEHis. Bei nicht-glykosyliertem LEHis waren die drei vorhandenen N-Glykosylierungs-Konsensussequenzen (N-X-S/T) durch die Mutationen N22Q, N66Q und N139Q ausgeschaltet worden, wodurch die N-Glykosylierung an diesen Stellen nicht mehr möglich ist. Die verschiedenen Plasmide wurden in die Hefestämme KM71 bzw. GS115 eingebracht. Die Expression wurde im Kulturüberstand und in den Zellen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Wie in **Abb. 9A** zu sehen, konnte LEHis nicht im Kulturüberstand detektiert werden. Im Zellysate hingegen konnte LEHis nachgewiesen werden.

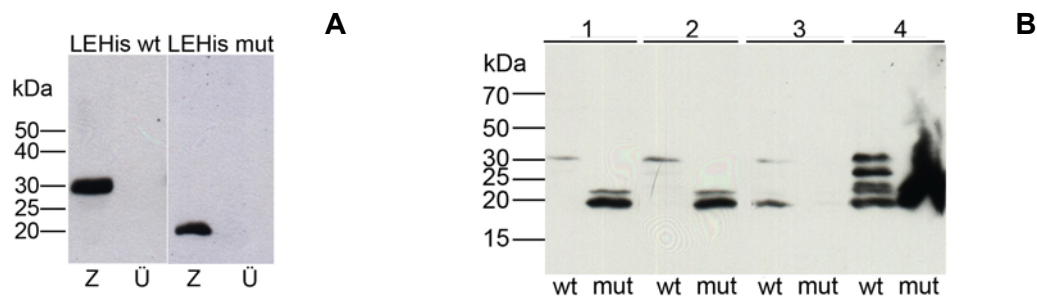


Abb. 9: Nachweis der Expression von LEHis (wt) und LEHis mit mutierten Glykosylierungsstellen (mut) in *P. pastoris*. Kulturüberstände; Zellysate oder Zellfraktionen wurden nach Transfektion mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Detektion im Western Blot mit monoklonalem Maus-anti-His-Antikörper. **A:** Zellysate (Z) und Kulturüberstände (Ü) von LEHis (wt) und LEHis (mut) transfizierten Zellen. **B:** Aufgeschlossene und fraktionierte Zellysate 1: Lysat nach French Press-Aufschluss; 2: Überstand nach Zentrifugation bei 1000g; 3: Überstand nach Zentrifugation bei 20800g; 4: Pellet nach Zentrifugation bei 20800g

Zellen, die mit der Wildtyp-Form von LEHis transfiziert worden waren, exprimierten Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ~30 kDa. Dagegen wanderte nichtglykosyliertes LEHis im SDS-Gel bei ~20 kDa. Die Erhöhung des apparenten Molekulargewichtes von etwa 10 kDa entspricht der Modifikation der Wildtypform mit 3 N-Glykanen. Nach einem Aufschluss der Zellen und Fraktionierung in Cytosol- und Membranfraktion zeigte sich, dass sich das exprimierte LEHis in der Membranfraktion befand (**Abb. 9B**). Die feine Bande in der Membranfraktion, die um ca. 1 kDa größer ist als LEHis, entspricht wahrscheinlich dem Vorläuferprotein mit ungespaltenem Signalpeptid. Bei der Wildtyp-Form sind bei Auftragung größerer Proteinmengen zusätzlich vier Banden zwischen 20 und 30 kDa nachweisbar, die vermutlich Glykosylierungsstufen mit 0, 1, 2, und 3 N-Glykanen repräsentieren (**Abb. 9B**, Reihe 4 (wt)).

Die Verwendung verschiedener Expressionsvektoren und Expression in unterschiedlichen

Hefestämmen hatten keinen Einfluß auf die Sekretion. Versuche, die Sekretion von LEHis bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten zu induzieren, hatten keinen Erfolg. Daher wurde versucht, das nicht-sezernierte Protein aus den Membranen mit konzentrierter Salzlösung (4 M MgCl_2) oder dem milden, nicht-ionischen Detergenz n-Octyl- β -D-Maltosid zu solubilisieren. Die so solubilisierten Proteine wurden gegen TBS dialysiert und einer Ni-NTA-Chromatographie unterzogen. In den Fraktionen konnten im Western Blot Proteinbanden in der dialysierten Probe vor der Chromatographie, im Durchlauf, zum Teil in der Waschfraktion und im Eluat detektiert werden (**Abb. 10**). Im Gegensatz zu den erwarteten 20 kDa wanderte das dialysierte Membranextrakt hierbei in der SDS-PAGE zwischen ~90 und ~120 kDa. Dieses Verhalten weist darauf hin, dass die Proteine nach Dialyse aggregierten. Trotzdem konnte ein Teil des Solubilisates an Ni-NTA gebunden werden, wie in der Eluatfraktion zu sehen.

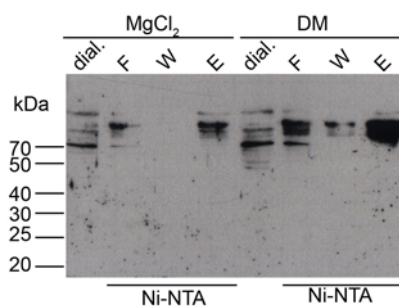


Abb. 10: Solubilisierung von LEHis (wt) aus der Membranfraktion von transfizierten *P. pastoris*.

Fraktionen einer Ni-NTA Chromatographie von mit 4M MgCl_2 oder n-Octyl- β -D-Maltosid (DM)-extrahierten Membranfraktionen LEHis (wt) transfizierter Zellen. dial: dialysiert; F: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Eluatfraktion

Da das in *P. pastoris* exprimierte Protein nicht sekretiert wurde und nur in Gegenwart von Detergenz solubilisiert werden konnte, scheint das Hefesystem nicht für die Expression von L-Selektin für die Kristallisation geeignet zu sein. Daher wurde dieses Expressionssystem nicht weiter verfolgt.

3.2 Expression von L-Selektin (LE) in Insektenzellen (Sf9)

Zur Expression von L-Selektin in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda* Zellen, Sf9) wurde ein rekombinantes Baculovirus hergestellt, das His-getaggttes L-Selektin Lektin-EGF (LEHis) enthielt. LEHis sollte unter der Kontrolle des viruseigenen Polyhedrin-Promotors in den Kulturüberstand sekretiert werden. 3 Tage nach Infektion wurden Zellkulturüberstand und Zellen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (**Abb. 11A**).

Im Überstand konnten zwei schwache Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 20 kDa detektiert werden, die im Überstand untransfizierter Zellen nicht nachweisbar waren. Im Zellysat fanden sich eine Vielzahl von Proteinbanden, die mit dem anti-L-Selektin-Antikörper reagieren, wobei die stärksten Banden auch hier im Bereich um ~20 kDa zu finden sind. Um LEHis aus dem Kulturüberstand zu isolieren, wurde dieser einer Ni-NTA-Chromatographie unterzogen.

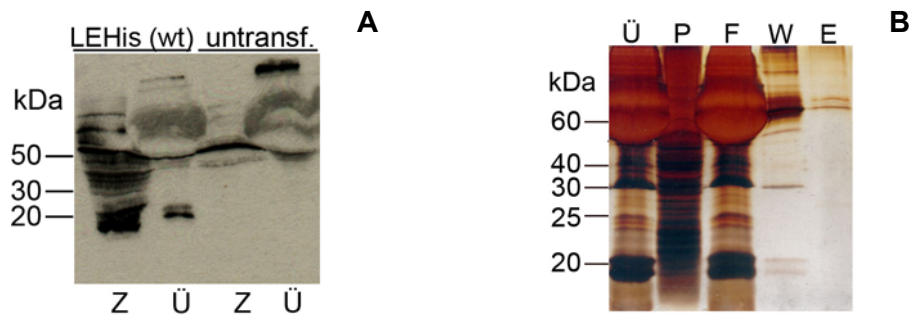


Abb. 11: Nachweis der Expression von LEHis (wt) in Insektenzellen (Sf9) **A:** Kulturüberstand (Ü) und Zelllysate (Z) von mit LEHis-Baculovirus infizierten und untransfizierten Sf9-Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Nach Immunodetektion mit polyklonalem anti-L-Selektin-Antikörper konnte LEHis im Kulturüberstand mit einem apparenten Molekulargewicht von ~20kDa nachgewiesen werden. **B:** Kulturüberstand von mit LEHis-Baculovirus infizierten Zellen wurde über Ni-NTA aufgereinigt. Die Fraktionen der Chromatographie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. Ü: Überstand; P: Zellpellet; F: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Eluatfraktion.

Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert (**Abb. 11B**). Während im Kulturüberstand und in der Durchlaufraktion zwei Banden zwischen 19 und 21 kDa nach Silberfärbung gut nachweisbar waren, fehlten diese in der Eluatfraktion. Die dominanten Proteinbanden bei ~60 kDa stammen von Rinderserum-Albumin, das als Supplement im Kulturmedium vorhanden ist.

Im Insektenzell-Expressionssystem wurden zwei Formen von LEHis gebildet, die mittels Ni-NTA-Chromatographie nicht isoliert werden konnten. Daher war die Expression in Insektenzellen offenbar nicht geeignet, LEHis für die Kristallisation zu produzieren, und wurde nicht weiter verfolgt.

3.3 Expression von L-Selektin in Säugerzellen

Da die getesteten Expressionssysteme nicht geeignet waren, ausreichende Mengen funktionellen Proteins herzustellen, wurde die Expression in Säugerzellen untersucht. Zuerst wurde die Expression in CHO (*chinese hamster ovary*) Zellen, einer häufig genutzten Zelllinie für die Proteinexpression, getestet. Als weitere Standard-Zelllinie wurden HEK293-Zellen (*human embryonic kidney*) als Expressionswirt getestet. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Varianten von L-Selektin, die die Lektin- und EGF-Domäne umfassen, hergestellt.

3.3.1 Expression von L-Selektin (LE) in CHO-Zellen

Die Lektin- und EGF-Domäne von L-Selektin wurden zum einen mit einem His-tag („LEHis“) und zum anderen als Fusionsprotein mit dem Fc-Teil von humanem IgG („LEIgG“) konstruiert. Die Plasmide enthielten das native Signalpeptid von L-Selektin, so dass das rekombinante Protein in den Zellkulturüberstand sekretiert werden sollte. Drei Tage nach der Transfektion dieser Konstrukte in CHO-Zellen wurde die Expression überprüft. LEHis konnte jedoch weder im Kulturüberstand noch im Zelllysate der CHO-Zellen nachgewiesen werden. Es konnte offenbar nicht oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden.

Der Kulturüberstand von mit LEIgG transfizierten CHO-Zellen wurde an Protein A-Sepharose angereichert. Das Eluat der Protein A-Sepharose wurde mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (**Abb. 12A**). Nach Western Blot und Detektion mit polyklonalem anti-L-Selektin Antikörper konnte LEIgG unter reduzierenden Bedingungen mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 60 kDa nachgewiesen werden. Unter nichtreduzierenden Bedingungen wurde zusätzlich eine Bande bei ~120 kDa detektiert. Diese repräsentiert die durch zwei Disulfidbrücken des IgG Fusionsanteils dimerisierte Form von LEIgG.

Nachdem die Expression des rekombinanten Proteins nachgewiesen war, wurden die Zellen durch Zugabe von Geneticin (G418) selektioniert, um eine stabile CHO-Zelllinie zu erhalten. Resistente Zellen wurden durch Verdünnung vereinzelt und klonal vermehrt. Zur Expression wurde das Kulturmedium gegen FCS-freies Medium ausgetauscht um den Gesamt-Proteingehalt des Mediums zu senken. Die verschiedenen CHO-Zellklone wurden nach 2 und 4 Tagen Kultivierung in FCS-freiem Medium auf die Expression von LEIgG hin untersucht. Dazu wurde der Kulturüberstand wie zuvor mittels Protein A Sepharose angereichert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert **Abb. 12B**.

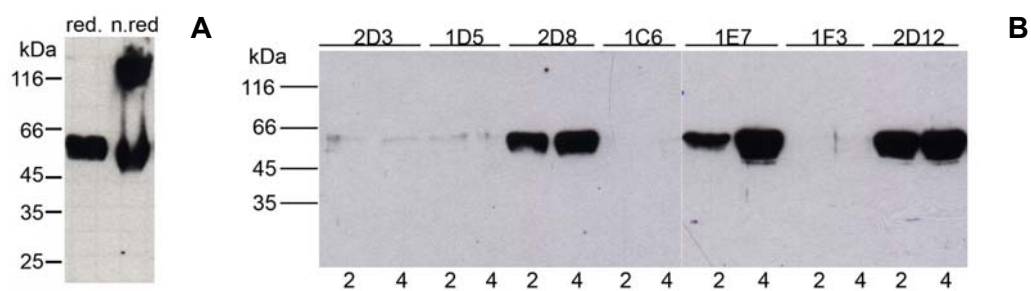


Abb. 12: Nachweis der Expression von LEIgG im Kulturüberstand transfizierter CHO-Zellen. **A:** LEIgG aus CHO-Zellkulturüberstand, angereichert durch Protein A-Sepharose, wurde reduzierend (red) und nicht reduzierend (n. red) durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit polyklonalem anti-L-Selektin-Antikörper detektiert. **B:** Kulturüberstand verschiedener LEIgG exprimierender stabiler CHO Klone wurde mittels Protein A Sepharose angereichert und wie in A durch Western Blot detektiert. Über dem Gel ist der Klonname angegeben. 2: nach 2 Tagen; 4: nach 4 Tagen Kultivierung in FCS-freiem Medium

Im Kulturüberstand der Klone „2D8“, „1E7“ und „2D12“ konnte LEIgG nachgewiesen werden, wobei die stärkste Expression bei „2D12“ zu verzeichnen war. In den Proben nach 2 und 4 Tagen FCS-freier Kultivierung waren die Signale bei Klon 2D8 und 2D12 etwa gleich stark, bei 1E7 nahm die Intensität der Proteinbande deutlich zu. Es konnte somit keine Beeinträchtigung der Expression durch die Umstellung auf FCS-freie Kultivierung beobachtet werden. Zur weiteren Untersuchung wurde der Klon "2D12" ausgewählt.

Nach Anlegen einer Expressionskultur und Vergrößerung des Kulturvolumens wurde LEIgG aus dem Kulturüberstand des Klons 2D12 durch Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Fraktionen der Aufreinigung wurden mittels SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt und im Western Blot mit dem anti-sL-Selektin Antikörper detektiert (**Abb. 13A**). LEIgG konnte mit einem apparenten Molekulargewicht von ~120 kDa nachgewiesen werden.

Um selektiv bindungsaktives LEIgG zu isolieren, wurde mit dem Protein A-Eluat eine Ligandenaffinitätschromatographie durchgeführt. Die Affinitätsmatrix trägt einen synthetischen Liganden von L- und P-Selektin, das in seiner Struktur dem am besten charakterisierten Liganden PSGL-1 nachempfunden ist. Als Bi-Ligand-Konstrukt trägt er auf Polyacrylamid gekoppelt die relevanten Bindungs epitope Tyrosinsulfat und sialyl Lewis X. Im Folgenden wird diese Matrix als sTyr/sLeX-Säule bezeichnet. Da die Bindung von L-Selektin an seine Liganden abhängig von Calcium-Ionen ist, erfolgte die Elution durch Chelatieren der im Bindungspuffer enthaltenen Calcium-Ionen mit EDTA.

In **Abb. 13B** sind die Fraktionen der Ligandenaffinitätschromatographie gezeigt, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht wurden. LEIgG konnte in den Eluatfraktionen nachgewiesen werden und hatte somit Calcium-abhängig an die Ligandensäule gebunden.

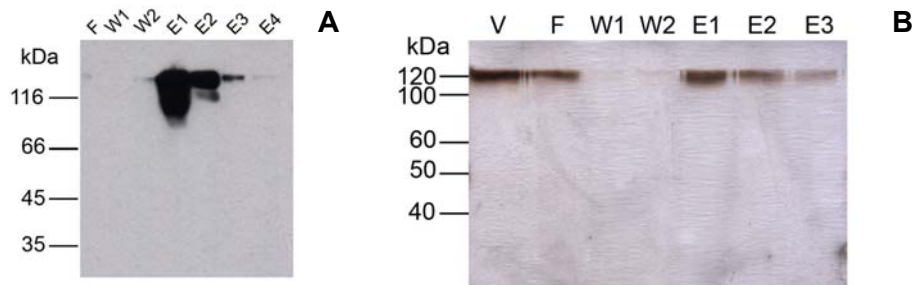


Abb. 13: Aufreinigung von LEIgG aus Kulturüberstand transfizierter CHO-Zellen mittels Protein A-Chromatographie. Nachweis der Bindungsaktivität durch Ligandenaffinitätschromatographie an sTyr/sLeX. A: Fraktionen der Protein A Chromatographie wurden nichtdenaturierend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit polyklonalem anti-L-Selektin Antikörper detektiert. **B:** Fraktionen einer Chromatographie von Protein A-gereinigtem LEIgG an Tyr/sLeX-Sepharose wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. LEIgG wandert unter nichtreduzierenden Bedingungen bei ~120 kDa. V: Auftrag, F: Durchfluß, W: Waschfraktionen, E: Eluatfraktionen

Gereinigtes LEIgG wurde mit der *N*-Glykanase PNGase F inkubiert, um vorhandene *N*-Glykane abzuspalten. Die mit PNGase F behandelte Probe zeigte nach SDS-PAGE und Silberfärbung ein um ~12 kDa verringertes apparentes Molekulargewicht gegenüber der unbehandelten Probe (**Abb. 14A**). Somit konnte gezeigt werden, dass LEIgG aus CHO-Zellen *N*-glykosyliert wird.

Zur Kontrolle der Reinheit und Stabilität des aufgereinigten LEIgG wurden konzentrierte, umgepufferte Präparationen einige Tage bei 4°C gelagert und nach SDS-PAGE und Silberfärbung kontrolliert (**Abb. 14B**). Im Gegensatz zu dem reinen homogenen Erscheinungsbild der Eluate in **Abb. 13B** waren bei den 3 analysierten Chargen zusätzliche Banden zu erkennen, die die Probe verunreinigen und damit für die Kristallisation ungeeignet machen. Diese zusätzlichen Banden, besonders jene bei ~90 kDa und ~55 kDa stammen wahrscheinlich aus proteolytischem Abbau von LEIgG. Im Falle der Charge „B“ war zusätzlich offenbar die Aufreinigung nicht erfolgreich gewesen und die Verunreinigungen waren erst nach Konzentrierung der Präparation sichtbar.

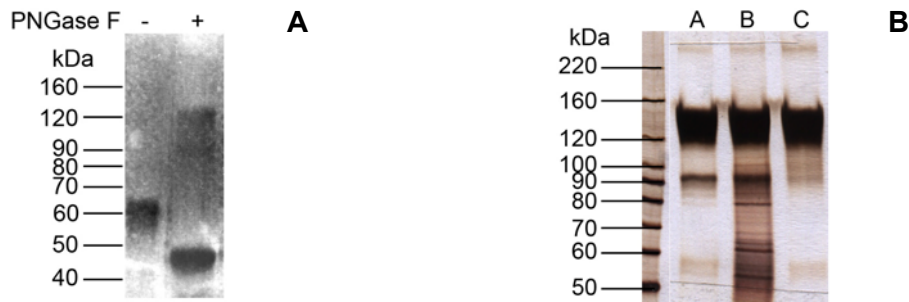


Abb. 14: Nachweis der N-Glykosylierung von LEIgG und Analyse der Reinheit. **A:** Protein A-gereinigtes LEIgG wurde 3 h bei 37°C mit PNGaseF inkubiert. Proben vor und nach Behandlung mit PNGase F wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Auftrag reduzierend. **B:** Auftrag nichtreduzierend. Verschiedene Chargen (A-C) aufgereinigten LEIgG wurde nach einigen Tagen Lagerungszeit bei 4°C mittels 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt.

Es war somit möglich, LEIgG in CHO-Zellen zu exprimieren. Das Protein wurde in den Kulturüberstand sekretiert und konnte über Protein A-Sepharose aufgereinigt werden. Die Expressionsrate war jedoch mit etwa 100-500 µg/L relativ gering. N-Glykane und Dimerisierung durch Disulfidbrückenbindung, sowie eine Calcium-abhängige Bindung an den synthetischen Bi-Liganden sTyr/sLeX konnten nachgewiesen werden. Aufgereinigtes LEIgG bildete nach Lagerung bei 4°C nach kurzer Zeit Abbauprodukte und erwies sich damit als nicht geeignet für die Kristallisation.

3.3.2 Expression von L-Selektin (LE) in HEK293F-Zellen

Alternativ zur stabilen Expression in CHO-Zellen wurde die transiente Expression von LE in HEK293F-Zellen untersucht. Das "Freestyle 293 Expression System" des Herstellers Invitrogen basiert auf transientser Proteinexpression in HEK293F-Zellen, die in Suspension wachsen und an Schüttelkultur sowie serumfreies Medium adaptiert sind. In einem Pilotexperiment wurden die bereits für die CHO-Zellen konstruierten Vektoren pcDNA3-LEHis und pcDNA3-LEIgG nach Herstellerprotokoll in HEK293F-Zellen transfiziert. 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurde ein Aliquot des Kulturüberstandes entnommen und mittels Western Blot auf Expression der Proteine LEHis und LEIgG analysiert (**Abb. 15A**). Im Kulturüberstand transfizierter Zellen konnte ohne vorheriges Anreichern sowohl LEHis als auch LEIgG mit dem anti-L-Selektin Antikörper detektiert werden. Der Antikörper reagierte dabei im Falle von LEHis am stärksten mit Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von ~28 und ~32 kDa. Im Überstand von mit LEIgG transfizierten Zellen wurden Proteinbanden bei ~40 und ~60 kDa detektiert. Aus diesen Proben wurde die L-Selektin-Konzentration zusätzlich mittels sL-Selektin ELISA bestimmt. Diese Werte sind in der **Abb. 15B** graphisch dargestellt. Die Expressionsstärke war zunächst bei beiden Konstrukten mit ~600 µg/L nach 24 Stunden und ~1600 µg/L nach 48 Stunden etwa gleich. Nach 72 Stunden hingegen war im Kulturüberstand LEHis transfizierter Zellen mit ~2600 µg/L deutlich mehr L-Selektin vorhanden als bei LEIgG mit ~1100 µg/L. Das Konzentrationsmaximum lag bei LEIgG bei 48 Stunden, während die Konzentration von LEHis erst bei 72 Stunden für den getesteten Zeitraum

maximal war.

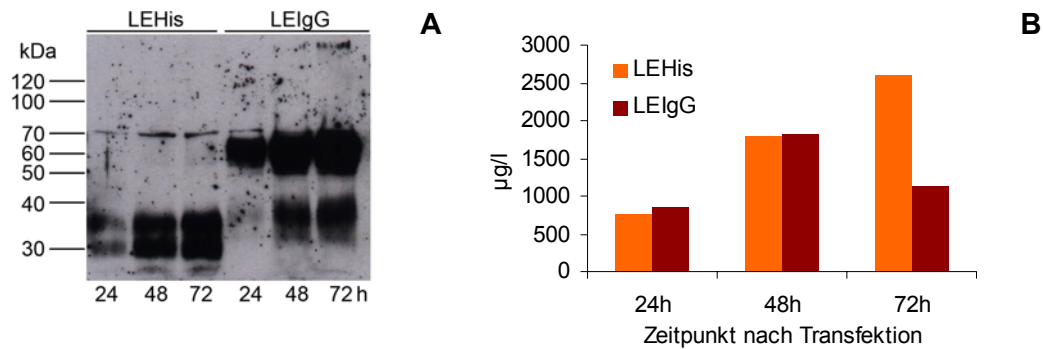


Abb. 15: Nachweis der Proteinexpression von LEHis bzw. LEIgG im Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen. **A:** 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurden Proben des Kulturüberstandes entnommen. Diese wurden mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und im Western Blot mit dem polyklonalem anti- L-Selektin Antikörper detektiert. **B:** Die L-Selektin-Konzentration derselben Proben, die auf dem Western Blot in A zu sehen sind, wurde mittels ELISA bestimmt. Graphische Darstellung des Verlaufes der L-Selektin Konzentration im Kulturüberstand .

Kulturüberstand LEHis exprimierender HEK293F-Zellen wurde einer Ni-NTA-Chromatographie unterzogen und die Fraktionen durch SDS-PAGE analysiert (**Abb. 16A**). In der Eluatfraktion E1 sind hauptsächlich vier Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von ~19, 23.5, 28 und 32 kDa angefärbt. In der Eluatfraktion E2 sind noch zwei kleinere und größere Banden zu sehen. Im Western Blot werden die vier Banden zwischen ~19 und ~32 kDa von dem anti-L-Selektin Antikörper erkannt (**Abb. 16B**).

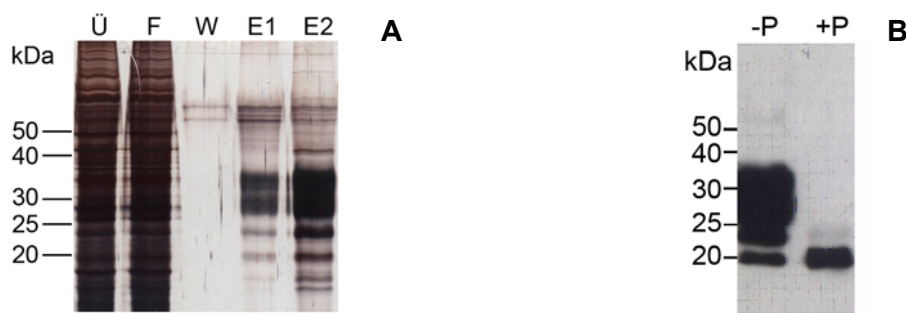


Abb. 16: Aufreinigung von LEHis aus Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen über Ni-NTA und Nachweis der N-Glykosylierung **A:** Fraktionen einer Ni-NTA-Aufreinigung von LEHis wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Ü: Kulturüberstand; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat. **B:** Durch Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigtes LEHis wurde mit PNGase F inkubiert. Jeweils eine Probe vor (-P) und nach (+P) Inkubation mit PNGase F unter nativen Bedingungen wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit polyklonalem anti-L-Selektin Antikörper detektiert.

Nach Inkubation dieser Probe mit PNGase F wurde nur eine Bande bei ~19 kDa von dem L-Selektin Antikörper detektiert. Das Proteingerüst von LEHis hat eine errechnete Molekülmasse von 19214 Dalton und korreliert somit mit der im Western Blot detektierten Bande bei ~19 kDa nach PNGaseF-Verdau (**Abb. 16B**). Diese nichtglykosylierte Form wurde auch in der unbehandelten

Probe nachgewiesen. Die vier Proteinbanden, die mit dem anti-L-Selektin Antikörper nachgewiesen wurden, repräsentieren also 1. nichtglykosyliertes LEHis bei ~19 kDa, 2. LEHis mit einem *N*-Glykan bei ~23 kDa, 3. LEHis mit zwei *N*-Glykanen bei ~28 kDa und 4. LEHis mit drei *N*-Glykanen bei ~32 kDa. Jedes angeheftete *N*-Glykan trägt somit zu einer Erhöhung des apparenten Molekulargewichtes um jeweils etwa 4 kDa bei. Diese LEHis-Glykoformen wurden weitergehend analysiert. Die Ergebnisse der Analysen werden in Abschnitt 3.13 der vorliegenden Arbeit beschrieben.

LEIgG aus HEK293F-Zellen wurde durch Chromatographie an Protein A-Sepharose aufgereinigt. Fraktionen dieser Chromatographie wurden mittels SDS-PAGE analysiert (**Abb. 17A**). In der Eluatfraktion ist eine Proteinbande bei ~60 kDa und eine schwächere bei ~40 kDa sichtbar. Dabei handelt es sich offenbar um LEIgG, denn diese Banden haben das gleiche apparente Molekulargewicht wie jene, die mittels Western Blot aus dem Kulturüberstand detektiert wurden (siehe **Abb. 15A**).

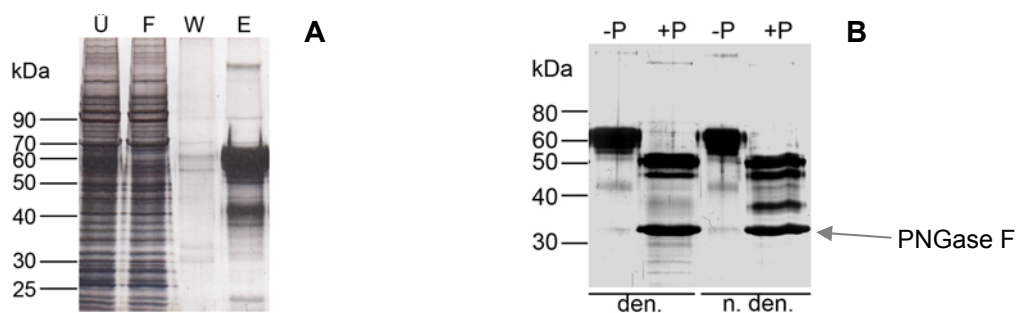


Abb. 17: Aufreinigung von LEIgG aus Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen über Protein A Sepharose und Nachweis der *N*-Glykosylierung. Fraktionen der Protein A Chromatographie und Proben vor und nach Inkubation mit PNGase F wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. **A:** Fraktionen der Chromatographie. Ü: Kulturüberstand; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat. **B:** Aufgereinigtes LEHis aus HEK293F-Zellen, vor (-P) und nach (+P) Inkubation mit PNGase F. Die Bande bei 32 kDa entspricht der PNGase F. Die Deglykosylierung fand unter denaturierenden (den.) oder nicht denaturierenden (n. den.) Bedingungen statt.

LEIgG aus HEK293F-Zellen konnte also aus dem Kulturüberstand über Protein A Sepharose aufgereinigt werden. Um die *N*-Glykosylierung nachzuweisen, wurde das Eluat unter nativen und denaturierenden Bedingungen mit PNGase F verdaut und mittels SDS-PAGE analysiert. Auf dem Gel in **Abb. 17B** sind nach dem Verdau zwei Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von ~50 kDa und ~45 kDa sichtbar. Die Proteinbande bei ~32 kDa in **Abb. 17B** stammt von der PNGase F. Die berechnete Molekülmasse des Proteingerüsts von LEIgG als Monomer beträgt 44806 Da. Die Proteinbande bei ~45 kDa korreliert somit mit der nichtglykosylierten Form von LEIgG. Die Bande bei ~50 kDa stellt wahrscheinlich eine einfach glykosylierte Form dar. Ein *N*-Glykan wird auch unter denaturierenden Bedingungen nicht vollständig durch die PNGase F abgespalten. LEIgG hat im Gegensatz zu LEHis 4 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen, da der Fc-Teil des humanen IgG ebenfalls ein *N*-Glykan besitzt. Welches *N*-Glykan in dem Konstrukt zum Großteil nicht von der PNGase F verdaut wird, wurde nicht bestimmt. Wahrscheinlich handelt es sich aber um das *N*-Glykan des Fc-Teils, das schwierig abzuspalten ist. LEIgG wird somit ebenfalls glykosyliert, es

können jedoch nicht so deutlich wie bei LEHis verschiedene Glykosylierungsstufen unterschieden werden.

Für Kristallisationsansätze muß das eingesetzte Protein so rein wie möglich sein. In den Eluatfraktionen auf den Gelen in **Abb. 16A** und **Abb. 17A** sind neben den Proteinbanden von LEHis bzw. LEIgG noch weitere Banden zu erkennen, die die Probe verunreinigen. Die erste Chromatographie über Ni-NTA bzw. Protein A reicht offenbar nicht aus, um LEHis bzw. LEIgG komplett aufzureinigen. Außerdem soll das Protein für die Kristallisation in funktioneller Form vorliegen. Um also funktionelles, reines LEHis bzw. LEIgG zu isolieren, wurde das Eluat der ersten Chromatographieschritte weiter mit der spezifischen sTyr/sLeX-Ligandenaffinitätssäule aufgereinigt. Fraktionen dieser Chromatographie sind in **Abb. 18A** und **Abb. 18B** zu sehen.

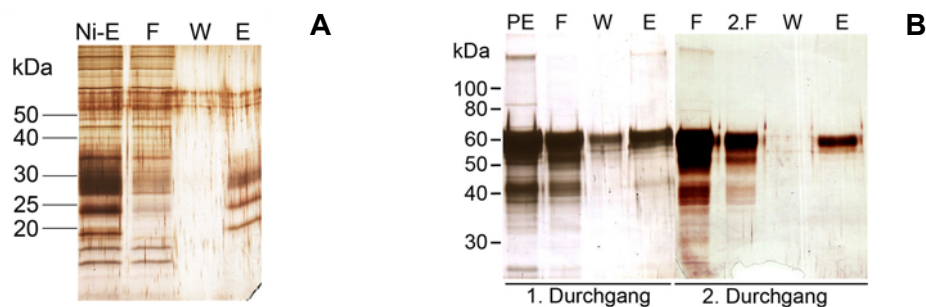


Abb. 18: Bindung von aufgereinigtem LEHis bzw. LEIgG an den synthetischen Bi-Liganden sTyr/sLeX. Fraktionen der sTyr/sLeX-Chromatographie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. **A:** Fraktionen der Chromatographie von LEHis. **B:** Fraktionen der Chromatographie von LEIgG. Die erste Durchlaufraction (F) wurde in einem zweiten Durchgang erneut über die sTyr/sLeX-Säule gegeben. Ni-E: Ni-NTA –Eluat; F: Durchlauf; 2.F: zweiter Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Eluat; PE: Eluat der Protein A Sepharose.

Auf dem SDS-Gel in **Abb. 18A** sind in der Eluatfraktion von LEHis die drei Proteinbanden bei ~19, ~23 und ~27 kDa, die nichtglykosyliertes, einfach und zweifach glykosyliertes LEHis repräsentieren, angefärbt. Die Proteinbande bei ~32 kDa, die die dreifach glykosylierte Form repräsentiert, ist bei der aufgetragenen Proteinmenge nur schwach zu erkennen. Mit steigender Anzahl der *N*-Glykane erscheint die Proteinbande auf dem Gel zunehmend unscharf und verwischt. In der Durchlaufraction sind viele Proteinbanden vorhanden, die nicht an die Säule binden und die Probe zuvor verunreinigt haben. Alle vier Glykosylierungsstufen von LEHis sind offenbar funktionell aktiv, da sie Calcium-abhängig an die Ligandenaffinitätssäule binden und mit EDTA eluiert werden können.

In **Abb. 18B** sind die Fraktionen einer sTyr/sLeX-Chromatographie von LEIgG nach SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung gezeigt. In allen Fraktionen ist die Haupt-Proteinbande bei ~60 kDa zu sehen. In der Durchlaufraction war viel Protein enthalten, daher wurde diese Fraktion in einem zweiten Durchgang erneut an die sTyr/sLeX-Säule gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass das in der ersten Durchlaufraction enthaltene LEIgG aus Kapazitätsgründen nicht an die Säule gebunden hatte und nicht etwa weil es nicht bindungsaktiv war. Zusätzlich konnte im Eluat eine schwache Bande bei ~40 kDa und eine Bande mit unbestimmten apparenten Molekulargewicht > 150 kDa nachgewiesen werden, die bereits im Protein A Eluat vorhanden waren. Diese beiden

Proteinbanden waren zuvor auch mit dem polyklonalen anti-L-Selektin-Serum im Western Blot detektiert worden (**Abb. 15A**). Der Ursprung dieser Banden ist unklar. Nach dem zweiten Durchgang sind diese zusätzlichen Banden in der Eluatfraktion nicht zu sehen.

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass sowohl LEHis als auch LEIgG an die sTyr/sLeX-Säule binden und diese Bindung Calcium-abhängig ist, da die Bindung durch Chelatieren der Calcium-Ionen mittels EDTA wieder aufzulösen ist. Durch Chromatographie an sTyr/sLeX-Sepharose können kontaminierende Proteine von LEHis abgetrennt werden. LEIgG zeigt nach sTyr/sLeX-Chromatographie noch mindestens zwei Nebenbanden auf dem SDS-Gel.

3.4 Optimierung und Anpassung des Expressionssystems

3.4.1 Wahl des L-Selektin Konstruktes und des Expressionssystems

Einzig im HEK293-*Freestyle*-Expressionssystem konnten sowohl LEHis als auch LEIgG in relevanten Mengen exprimiert werden. Die Proteine wurden *N*-glykosyliert, konnten aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden und waren bindungsaktiv. Aufgrund der höheren Expressionsrate wurde die Expression von LEHis im HEK293-*Freestyle*-System als Grundlage für die Optimierung der Methoden zur Expression und Aufreinigung von LE für die Kristallisation herangezogen.

3.4.2 Test verschiedener Transfektionsreagenzien

Um große Mengen Zellsuspension so oft wie nötig transient zu transfizieren, werden größere Mengen Transfektionsreagenz benötigt. Das Transfektionsreagenz sollte daher für wiederholte Transfektionen im Liter-Maßstab nicht unverhältnismäßig teuer sein. Eine Reihe Transfektionsreagenzien wurden daraufhin nach den Protokollen der jeweiligen Hersteller auf ihre Eignung hin untersucht. Hierbei wurden für jedes Transfektionsreagenz verschiedene Bedingungen zur Bildung von Transfektionsreagenz/DNA-Komplexen getestet, um die jeweils optimalen Bedingungen zu finden. Nach drei Tagen wurden Proben aus dem Kulturüberstand mittels Western Blot analysiert (**Abb. 19**).

293fectin ist das vom Hersteller empfohlene Transfektionsreagenz für das *Freestyle Expression System*. Im Kulturüberstand sind die beiden prominenten Banden von LEHis nach Einsatz der vom Hersteller empfohlenen 1 und 1,5 µl pro µg Plasmid mit dem L-Selektin-Antikörper zu detektieren. Dabei erscheinen die Banden in dem Ansatz mit 1,5 µl 293fectin/µg Plasmid stärker als jene im Ansatz mit 1 µl 293fectin/µg Plasmid. Nach Transfektion mit 2 µl 293fectin/µg Plasmid konnte kein LEHis im Kulturüberstand detektiert werden. Nach Transfektion mit 2,5 -3,5 µl *ExGen500* pro Mikrogramm Plasmid konnte kein LEHis im Überstand detektiert werden. *ExGen500* ist somit nicht für die Transfektion von HEK293F-Zellen geeignet. Eine kostengünstige Standard-Transfektionsmethode ist die Copräzipitation von DNA mit Calciumphosphat. Nach Transfektion von 0,5, 1 und 1,5 µg Plasmid durch die Calciumphosphat-Methode konnte jedoch kein Protein im

Überstand detektiert werden. *Metafectene* zeigte bei Einsatz von 2-6 µl pro Mikrogramm Plasmid einen Verlauf der Effizienz mit einem Maximum bei 3-4 µl. Beim Einsatz von Polyethylenimin (PEI) zur Transfektion ist ein Maximum bei einem DNA:PEI- Verhältnis von 1:4 -1:5 zu sehen.

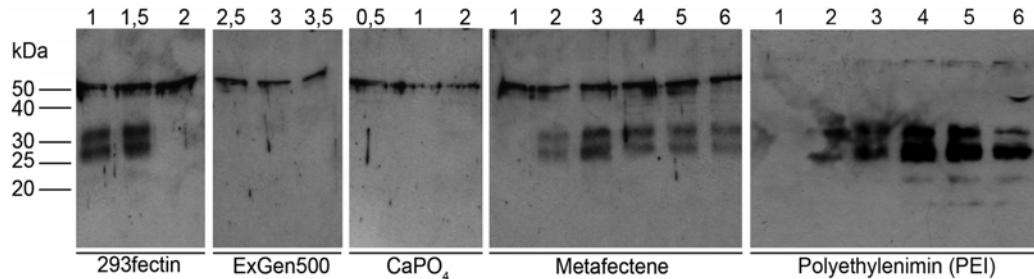


Abb. 19: Test verschiedener Reagenzien zur Transfektion von HEK293F-Zellen. Jeweils $1 \cdot 10^6$ HEK293F-Zellen wurden mit den angegebenen Transfektionsreagenzien bei unterschiedlichen Bedingungen transfiziert. 3 Tage nach der Transfektion wurden Proben von Kulturüberständen im Western Blot mit polyklonalem anti-L-Selektin Antikörper detektiert. Ziffern über den Spuren beziehen sich auf das eingesetzte Volumen des Transfektionsreagenz in µl pro µg Plasmid zur Herstellung der Transfektionskomplexe. Eine Ausnahme bildet die Transfektion nach der CaPO_4 -Methode. Hier wurde die Menge der DNA variiert und die Ziffern beziehen sich auf die Menge des Plasmides in µg. Die verwendete PEI-Lösung war 1 mg/ml in H_2O .

Da die Substanz Polyethylenimin mit großem Abstand das kostengünstigste und außerdem in der Lage war, die HEK293F-Zellen mindestens ebenso gut zu transfizieren wie das *293fectin*, wurde für folgende Transfektionen nur noch PEI benutzt.

3.4.3 Optimierung der Sequenz von LEHis

Von dem Vorhersageprogramm "*SignalP*" (Bendtsen *et al.*, 2004) wurde die native L-Selektin-Signalpeptidsequenz nicht als solche erkannt. Es wurde daher untersucht, ob es möglich ist, das native Signalpeptid gegen ein etabliertes Signalpeptid, das von dem Vorhersageprogramm erkannt wird, auszutauschen und somit eventuell die Expressionsrate zu steigern. Außerdem wurde analysiert, ob eine in der Kozaksequenz optimierte DNA-Sequenz den Translationsstart erleichtert und daher zu einer effektiveren Expression führen kann. Das bestehende LEHis-Konstrukt wurde dazu folgendermaßen modifiziert:

1. Austausch des Signalpeptides durch jenes von CD30 („CD30 sig.-pep.“)
2. Optimierung der Kozak-Sequenz am putativen Translationsstart („Kozak“)
3. Eliminierung weiterer potentieller ATG-Startcodons im Signalpeptid („1ATG“).

Die entsprechenden Sequenzen sind in Abschnitt 5.2.12 detailliert aufgeführt. Diese drei so modifizierten Konstrukte wurden zum Vergleich mit dem Wildtyp in HEK293F-Zellen transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurde die Konzentration von LEHis im Kulturüberstand mittels sL-Selektin-ELISA gemessen. Alle vier Konstrukte wurden in jeweils 6 verschiedenen DNA:PEI Verhältnissen transfiziert.

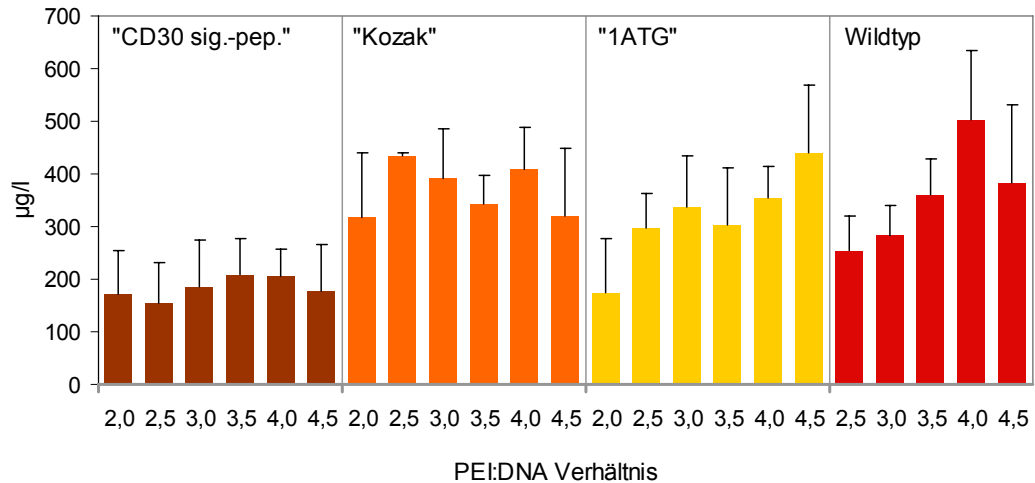


Abb. 20: Einfluss von Modifikationen des Signalpeptides auf die Expression von LEHis in HEK293F-Zellen. „CD30 sig.-pep.“ bezeichnet die Variante, bei der das native Signalpeptid von L-Selektin gegen jenes von CD30 ausgetauscht wurde. Bei „Kozak“ wurde die Kozaksequenz am Translationsstart optimiert. Die „1ATG“ Variante besitzt stumme Mutationen, die alle ATG-Sequenzen bis auf eines am Translationsstart eliminiert. Für jedes Konstrukt wurde die Transfektion mit einer Reihe verschiedener DNA: PEI Verhältnisse durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus 3 unabhängigen ELISA.

In **Abb. 20** sind die Mittelwerte der Expressionsraten, ermittelt durch sL-Selektin ELISA, von 3 unabhängigen Transfektionsreihen dargestellt. Die Konzentration von LEHis „CD30 sig.-pep.“ war mit 154 µg/L bis 208 µg/L am geringsten. Die Konzentration von LEHis „Kozak“ lag zwischen 316 µg/L und 434 µg/L und jene von „1ATG“ zwischen 175 µg/L und 441 µg/L. Wildtypisches LEHis wurde mit 225 µg/L bis 502 µg/L am stärksten exprimiert. Die Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der "Kozak" und "1ATG"-Variante sind allerdings relativ gering. Somit konnte durch Modifikation der Signalpeptidsequenz von LEHis keine deutliche Verbesserung der Expressionsrate erzielt werden.

3.4.4 Aufreinigung von LEHis mittels Aptamer-Affinitätschromatographie (AAC)

Die zur Verfügung stehende sTyr/sLeX-Säule ist zwar geeignet, die Bindungsfähigkeit von L-Selektin-Konstrukten nachzuweisen, doch hat sie eine zu geringe Kapazität, um größere Mengen Protein aufzureinigen. Für das Ziel, eine Möglichkeit zu finden, größere Mengen LEHis spezifisch aufzureinigen, wurde die Chromatographie an einem spezifischen L-Selektin Aptamer untersucht (Romig *et al.*, 1999). Dazu wurde ein am 5'-Ende biotinyliertes L-Selektin Aptamer an Streptavidin-Agarose gekoppelt. Ni-NTA-Eluat wurde zunächst konzentriert und umgepuffert und mittels Aptamer-Affinitätschromatographie (AAC) fraktioniert. Da die Bindung an das Aptamer Calcium-abhängig ist, wurde dem Bindepuffer Calcium zugesetzt und mit EDTA eluiert. In **Abb. 21A** sind die Fraktionen einer AAC von LEHis nach SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zu sehen.

In der Durchlaufraktion ist bereits ein Großteil der kontaminierenden Proteinbanden vorhanden, die nicht an die Säule binden. In der Waschfraktion sind weitere verunreinigende

Proteine zu sehen, die von der Säule gewaschen wurden. In den Eluatfraktionen E1-E6 sind die vier Proteinbanden der vier Glykosylierungsstufen von LEHis bei ~19-32 kDa zu sehen. Die Eluatfraktionen sind sehr rein. Mit der AAC ist es somit möglich, verunreinigende Proteine aus konzentriertem Ni-NTA-Eluat zu entfernen, und hochreines LEHis zu erhalten.

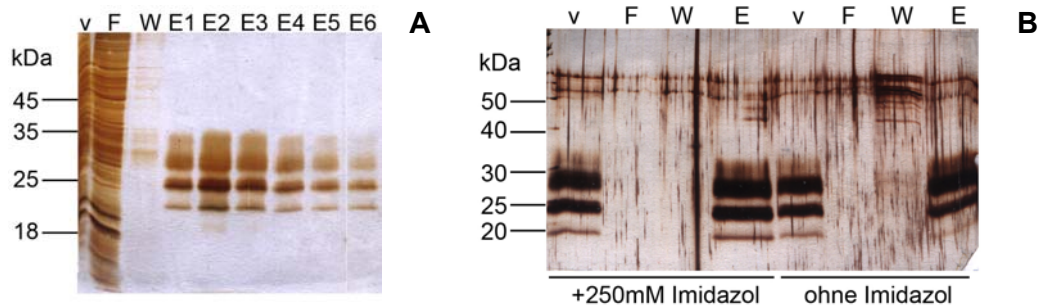


Abb. 21: Aufreinigung von LEHis durch Aptamer-Affinitätschromatographie (AAC) und Test der Pufferkompatibilität. **A:** Umgepuffertes Eluat einer Ni-NTA-Chromatographie wurde durch AAC aufgereinigt und mittels 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde silbergefärbt. Ni-E; Ni-NTA – Eluat; F: Durchfluss; W: Waschfraktion, E: Eluat. **B:** Aufreinigung von LEHis über AAC, Elution mit 20mM EDTA; linke Seite in Gegenwart von 250 mM Imidazol, rechte Seite ohne Imidazol. Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. v: LEHis vor der Säule. F: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Eluatfraktionen.

Da jeder Aufreinigungsschritt Verluste der Proteinmenge mit sich bringt, sollten die einzelnen Schritte in ihren Pufferbedingungen möglichst kompatibel sein, um Zwischenschritte wie Pufferwechsel zu sparen. Also wurde getestet, ob das Ni-NTA Eluat, das 250 mM Imidazol enthielt, direkt im Elutionspuffer zur Bindung an die Aptamersäule genutzt werden kann. Aufgereinigtes LEHis wurde in zwei Teile getrennt, ein Teil mit 250 mM Imidazol und 2 mM CaCl_2 versetzt, und der andere Teil in TBSCa-Puffer belassen. Anschließend wurde eine AAC durchgeführt und die Fraktionen auf dem Silbergel verglichen (**Abb. 21B**). Zwischen den Eluatfraktionen ist kein Unterschied festzustellen. Der Ni-NTA-Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol hat also keinen störenden Einfluß auf die Bindung von LEHis an die Aptamersäule.

3.4.5 Chromatographische Trennung

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass LEHis als Mischung von vier Glykosylierungsstufen exprimiert wird. Nach SDS-PAGE sind daher auf dem Gel vier Proteinbanden zu sehen. Da eine Proteinpräparation für die Kristallisation homogen sein muß, eignet sich eine Mischung verschiedener Formen nicht für die Kristallisation. Daher wurde versucht, die Glykoformen chromatographisch zu fraktionieren.

3.4.5.1 Gelfiltration über Sephadex 75 (10/30)

Kulturüberstand LEHis transfizierter HEK293F-Zellen wurde geerntet und über Ni-NTA und AAC aufgereinigt. Das konzentrierte Eluat dieser Chromatographie (1,5 mg/ml, 225 µg) wurde anschließend über eine Sephadex 75 (10/30) Säule gelfiltriert.

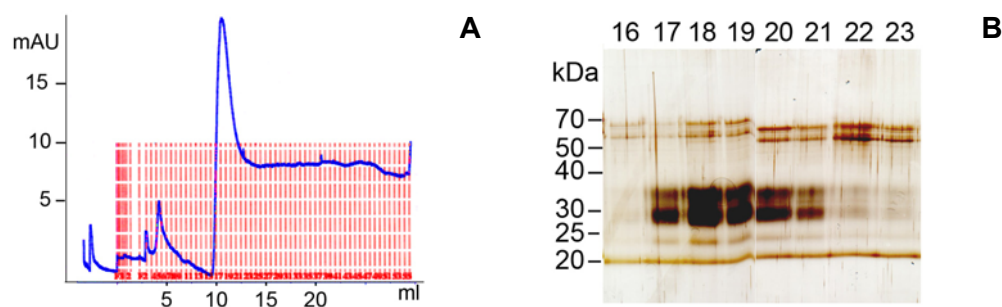


Abb. 22: Gelfiltration von LEHis an Sephadex 75 (10/30). A: Chromatogramm B: Proben der 500 μ l-Fractionen wurden mittels 12%SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt.

Auf dem Chromatogramm in **Abb. 22A** erscheint der HauptPeak mit einem Maximum bei etwa 20 mAU Intensität bei 10,25 ml Elutionsvolumen. Nach SDS-PAGE konnten die Proteinbanden von LEHis bei 22-32 kDa in Fraktion 17-21 nachgewiesen werden (**Abb. 22B**). Die ~19 kDa-Bande, die die nichtglykosylierte Glykoform repräsentiert, ist in diesem Gel von der Lauffront verdeckt. In allen Fraktionen sind die drei anderen Banden der Glykosylierungsstufen zu sehen, sie wurden also durch diese Methode nicht voneinander getrennt.

3.4.5.2 Heparin-Chromatographie

Zur Trennung der LEHis-Glykoformen wurde alternativ zur Gelfiltration eine kombinierte Kationenaustausch- und Affinitätschromatographie über Heparin-Sepharose versucht. LEHis wurde wie zuvor in HEK293F-Zellen exprimiert und über Ni-NTA aufgereinigt. Die Ni-NTA-Säule wurde mit 250 mM Imidazol in H₂O eluiert, um das Eluat direkt nach Konzentrierung zur Bindung an die Heparinsäule nutzen zu können. Es war aus Vorversuchen bekannt, dass LEHis nur bei geringen Salzkonzentrationen an die Heparinsäule bindet. Das Eluat wurde über eine 1 ml-*Hi-Trap* Heparinsäule gegeben, gewaschen und mit einem NaCl-Gradienten eluiert (**Abb. 23**).

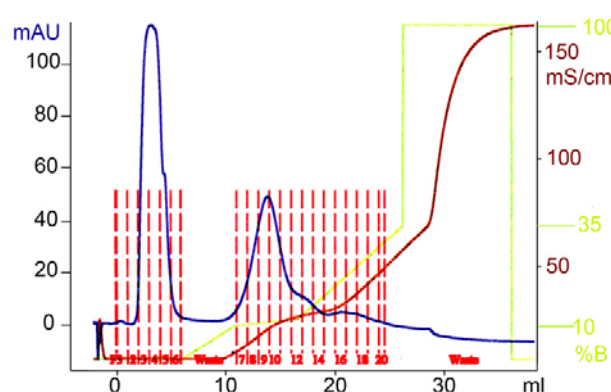


Abb. 23: Heparinchromatographie von LEHis aus HEK293F-Zellen. LEHis wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt. Das Ni-NTA-Eluat enthielt kein NaCl und wurde konzentriert über die Heparinsäule gegeben. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen (CV) Puffer A (0,1 M Tris, 0,01 M Zitronensäure pH 7,4) gewaschen. Ein dreistufiger Gradient wurde aus Puffer A und Puffer B (2 M NaCl in Puffer A) wie folgt angelegt: 0-10%B in 5, 10-12 % B in 6 CV und 12-35 % in 10 CV.

Das Chromatogramm in **Abb. 23** zeigt, dass beim Waschen der Säule mit Puffer A über 5 Säulenvolumen (CV) ein *Peak* mit einem Maximum von >100 mAU erschien. In der ersten Stufe des Gradienten wurde die Konzentration des Puffer B von 0 % auf 10 % innerhalb von 5 CV angehoben, wobei kein weiterer *Peak* erschien. Während der zweiten Stufe von 10-12 % B erschien ein *Peak* mit einem Maximum von ~50 mAU. An dem rechten absteigenden Ast der Kurve war eine kleine Schulter in Fraktion 12-14 zu erkennen. Bei der dritten Stufe, bei der die Konzentration von B von 12 auf 35 % innerhalb von 10 CV erhöht wurde, erschienen nur kleinere Erhebungen in der Kurve. Um die Fraktionen zu identifizieren, die LEHis enthalten, wurden die Fraktionen mittels Western Blot analysiert (**Abb. 24**).

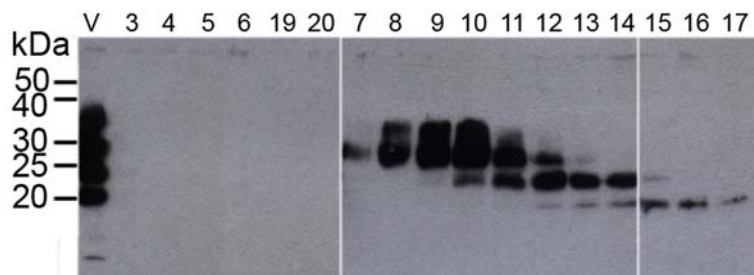


Abb. 24: Western Blot- Analyse von Fraktionen der Heparinchromatographie. Fraktionen der Chromatographie (s. **Abb. 23**) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem anti-L-Selektin Antikörper detektiert. Über den einzelnen Spuren im oben stehenden Gel ist die Fraktionsnummer angegeben. V: Eluat vor der Chromatographie.

Der Western Blot zeigt zunächst in der ersten Spur zum Vergleich die vier Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von 19-32 kDa, die in der Probe bevor sie auf die Säule gegeben worden war, vorhanden waren. In den Fraktionen 3-6 konnte kein LEHis detektiert werden. Der große *Peak* auf dem Chromatogramm stammt also von anderen, verunreinigenden Proteinen. Ebenso war kein LEHis in den Fraktionen 19-20 zu finden, bei denen im Chromatogramm (**Abb. 23**) kleine Erhebungen in der UV-Detektorkurve zu sehen waren. In den Fraktionen 7 bis 17 hingegen wurde LEHis von dem Antikörper detektiert. Dabei ist in Fraktion 7 nur die Proteinbande bei ~28 kDa angefärbt, die mit dem zweifach glykosylierten LEHis korreliert. In Fraktion 8 und 9 wurde die zweifach und dreifach glykosylierte Form detektiert. In Fraktion 10 kommt die Bande für die einfach glykosylierte Form hinzu. Ab Fraktion 12 erscheint auch die nichtglykosylierte Form von LEHis, während die dreifach glykosylierte Form bereits vollständig eluiert wurde. In Fraktion 13 und 14 ist neben einer schwachen Bande für die nichtglykosylierte Form hauptsächlich die einfach glykosylierte Form vorhanden. In Fraktion 16 und 17 wurde schließlich nur noch die nichtglykosylierte Form von LEHis detektiert.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Bindung der verschiedenen Glykosylierungsstufen von LEHis an die Heparinsäule unterschiedlich stark ist, wobei die zweifach glykosylierte Form am schwächsten bindet und entsprechend bei geringeren NaCl-Konzentrationen eluiert. Die nichtglykosylierte Form bindet am stärksten und eluiert somit als letztes bei höherer NaCl-Konzentration.

Es zeigte sich in weiteren Versuchen mit feineren Gradienten, kleineren und größeren

Fractionen, dass keine weitere Auftrennung als in **Abb. 24** gezeigt erreicht werden kann. Wahrscheinlich sind die Ladungszustände, die für die Trennung der Glykoformen verantwortlich sein könnten, bei den vorliegenden Formen zu ähnlich, um eine Trennung zu ermöglichen.

3.5 Verminderung der *N*-Glykosylierung von LEHis

Wie zuvor gezeigt, exprimieren HEK293F-Zellen LEHis als Mischung aus vier verschiedenen Glykosylierungsstufen. Nach Aufreinigung über Ni-NTA und sTyr/sLeX bzw. AAC, bleiben die vier Formen bestehen (**Abb. 16, Abb. 18, Abb. 21**). Proben, die glykosyliert und somit nicht homogen sind und mehr als eine scharfe Bande auf einem SDS-Gel zeigen, sind in der Regel nicht kristallisierbar. Da eine chromatographische Trennung der Glykoformen nicht effizient zu erreichen war, wurden als nächstes verschiedene Strategien zur Reduktion der *N*-Glykosylierung untersucht:

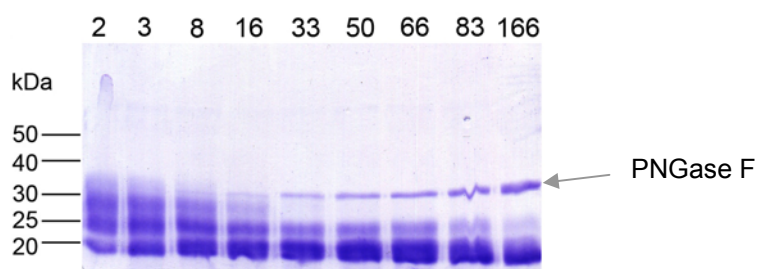
1. Enzymatische Deglykosylierung mittels PNGase F (Abschn. 3.5.1)
2. Inhibition der Glykosylierung mittels Tunicamycin (Abschn. 3.5.2)
3. Expression von *N*-Glykosylierungs-Mutanten (Abschn.3.5.3).

3.5.1 Enzymatische Deglykosylierung mittels PNGase F

Aufgereinigtes LEHis wurde zunächst mit steigenden Mengen PNGase F für 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (**Abb. 25**). Mit steigenden Enzymmengen verminderte sich die Anzahl der Proteinbanden, die die verschiedenen Glykoformen repräsentieren. Zusätzlich zu der Proteinbande bei ~19 kDa, die nichtglykosyliertes LEHis repräsentiert, war in den letzten vier Spuren noch eine etwa 4 kDa größere Form vorhanden. Während dreifach und zweifach glykosylierte Formen bereits mit ~33 Units PNGase F pro Mikrogramm LEHis deglykosyliert werden konnten, blieben einfach glykosylierte Formen auch noch bei Einsatz von 166 U PNGase F/ μ g Protein erhalten.

Abb. 25: Enzymatische Deglykosylierung von LEHis durch PNGase F.

Aufgereinigtes LEHis wurde 3 Stunden bei 37°C mit den über dem Gel angegebenen Units PNGase F pro μ g unter nativen Bedingungen inkubiert, anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. PNGase F erzeugt eine Proteinbande bei ca. 32 kDa.



Unter den getesteten Bedingungen konnte keine vollständige Deglykosylierung erreicht werden, trotz eines PNGase F zu LEHis-Verhältnis von 166 Units pro Mikrogramm Glykoprotein. Mit dem Ziel, mit diesen 166 U/ μ g Mikrogramm auszukommen, wurde der gleiche Versuch mit verlängerter Inkubationszeit wiederholt. Die Proben wurden dazu nach Inkubation mit 1,7-166 U

PNGase F pro Mikrogramm LEHis über Nacht bei 37°C inkubiert. In **Abb. 26** sind die Proben dieses Versuches nach Auftrennung im Gel zu sehen. Im Gegensatz zu dreistündiger Inkubationszeit ist nach Inkubation über Nacht bereits bei ~8 U PNGase F/ μ g LEHis eine Reduktion der Glykosylierungsbanden zu erkennen. Auch nach verlängerter Inkubationszeit war jedoch kein vollständiger Verdau zu erreichen, wenn auch die Bande bei ~23 kDa nur noch sehr schwach zu sehen ist. Dieser Ansatz kann in Kombination mit einer Chromatographie, mit der restliches glykosyliertes LEHis abgetrennt werden kann, womöglich durchgeführt werden. Gegen eine Inkubation über Nacht bei 37°C spricht jedoch, dass auf dem Gel einige kleinere Proteinbanden unterhalb von 19 kDa erscheinen. Dies deutet auf proteolytischen Abbau hin. In dem Ansatz, in dem ~166 U PNGase F/ μ g verwendet wurden, sind diese Banden nicht zu sehen. Eventuell befindet sich im Puffer der PNGase F ein Faktor, der ab einer bestimmten Konzentration vor dem Abbau schützt.

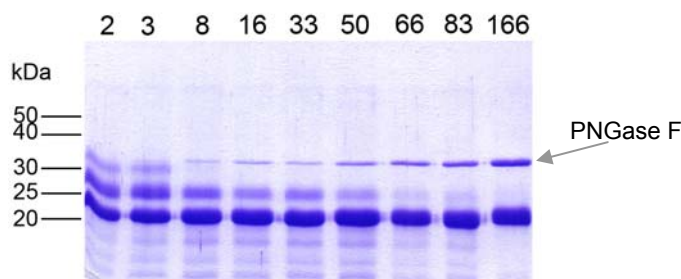


Abb. 26: Enzymatische Deglykosylierung von LEHis mit PNGase F. Jeweils 3 μ g aufgereinigtes LEHis wurde mit den über dem Gel angegebenen Mengen PNGase F über Nacht bei 37°C unter nativen Bedingungen inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt mit Coomassie gefärbt. Die Bande bei ~32 kDa entspricht der PNGase F.

Als nächstes mußte eine Methode gefunden werden, mithilfe derer sich die PNGase F von LEHis wieder abspalten läßt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass LEHis an DEAE-Sephrose bindet. Der Reaktionsansatz wurde also bei pH 8 über eine DEAE Sepharose-Säule gegeben. In **Abb. 27** sind die Fraktionen der Chromatographie zu sehen. Im Durchfluss ist die Proteinbande bei 32 kDa, die von der PNGase F gebildet wird, zu sehen. Offenbar bindet die PNGase F dieses Säulenmaterial nicht und ist daher im Durchfluss zu finden. Die DEAE-Sephrose wurde anschließend mit 1,5 M NaCl eluiert. In der Eluatfraktion sind die beiden Banden zu sehen, die mit unglykosyliertem LEHis bei 19 kDa und einfach glykosyliertem LEHis bei 23 kDa korrelieren.

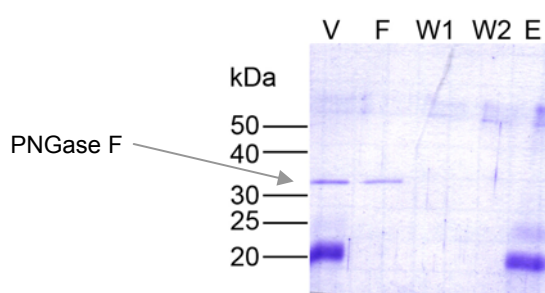


Abb. 27: Abtrennung der PNGase F von LEHis aus dem Reaktionsansatz mittels Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose. Fraktionen einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. V: Probe vor der Aufreinigung; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat.

LEHis kann also zum Großteil durch Inkubation über Nacht bei 37°C mit ~170 U

PNGase F/ μ g deglykosyliert werden. Es müssen dann allerdings nach der Inkubation noch mindestens zwei weitere Aufreinigungsschritte erfolgen: Die Abtrennung des Enzymes und die Abtrennung des restlichen glykosylierten LEHis. Für die Abtrennung des Enzyms konnte eine Methode gefunden werden, und zwar die Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose. Die Trennung der restlichen Glykoformen von LEHis ist hingegen nur eingeschränkt möglich (vgl. Abschnitt 3.4.5).

3.5.2 Inhibition der Glykosylierung mittels Tunicamycin

HEK293F-Zellen wurden wie zuvor mit LEHis transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Substanz Tunicamycin (TM) als Inhibitor der N-Glykosylierung zum Kulturmedium hinzugegeben. Nach 3 Tagen Inkubation mit Tunicamycin wurde der Kulturüberstand geerntet und über Ni-NTA aufgereinigt. Fraktionen dieser Aufreinigung wurden im Western Blot analysiert (**Abb. 28A**). Im Kulturüberstand konnte die bei \sim 19 kDa erwartete Bande, die das nichtglykosylierte LEHis repräsentiert, nicht detektiert werden. In den Proben des Überstandes und der Durchlaufraktion konnte lediglich eine Bande $>$ \sim 70 kDa detektiert werden, die vermutlich unspezifisch ist. Dagegen konnte in der Eluatfraktion nichtglykosyliertes LEHis nachgewiesen werden. In der **Abb. 28A** ist rechts neben der Eluatfraktion zur Kontrolle LEHis aus unbehandelten Zellen zu sehen. Die Proteinproduktion ist bei Behandlung mit Tunicamycin offenbar herabgesetzt, da LEHis erst nach Anreicherung durch die Ni-NTA-Säule im Western Blot detektierbar ist. Die Proteinbanden, die den Glykoformen mit 1-3 Glykanen entsprechen, wurden im Eluat ebenfalls schwach detektiert. LEHis kann somit in HEK293F-Zellen ohne Glykane exprimiert und sekretiert, sowie durch Ni-NTA aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden.

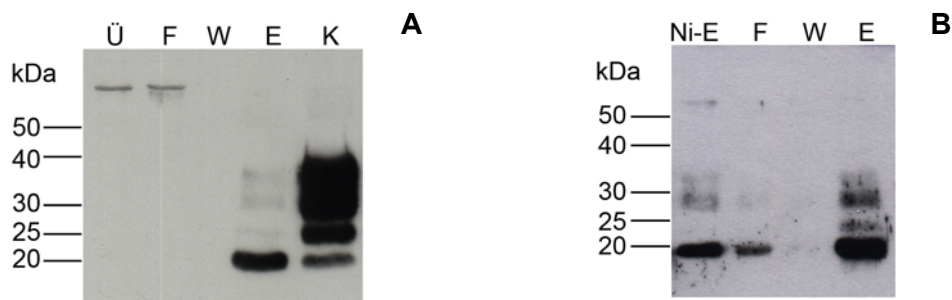


Abb. 28: Inhibition der N-Glykosylierung von LEHis durch Tunicamycin und Nachweis der Bindung an Ni-NTA- und sTyr/sLeX. Transfizierte HEK293F-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit Tunicamycin versetzt. **A:** Fraktionen einer Ni-NTA Aufreinigung von Kulturüberstand LEHis transfizierter Zellen, die unter Einfluß von Tunicamycin inkubierten. Ü: Kulturüberstand; F: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Eluat; K: Kontrolle: LEHis aus HEK293F-Kultur ohne Tunicamycin. **B:** Fraktionen einer Chromatographie von gereinigtem LEHis aus HEK293F-Zellen, die unter Einfluß von Tunicamycin inkubierten, an Tyr/sLeX-Sepharose. Ni-E: Ni-NTA-Eluat.

Anschließend wurde die Bindungsfähigkeit des so exprimierten Proteins mittels Chromatographie an sTyr/sLeX-Sepharose untersucht. In **Abb. 28B** sind die Fraktionen der Chromatographie im Western Blot zu sehen. Die Proteinbande bei \sim 19 kDa, die nicht-glykosyliertes

LEHis repräsentiert, wurde schwach in der Durchlaufraction und stark in der Eluatfraction nachgewiesen. Nichtglykosyliertes LEHis ist somit bindungsaktiv. In der Eluatfraction sind außerdem noch Proteinbanden teilweise glykosylierter LEHis-Formen zu sehen. Diese stammen wahrscheinlich aus dem Zeitintervall zwischen Transfektion und Zugabe von Tunicamycin. Es war jedoch nicht möglich, Tunicamycin früher als 24 Stunden nach der Transfektion zuzugeben, da ansonsten die Transfektion nicht gelang (nicht gezeigt).

Es wurde versucht, die Menge der bereits ohne Tunicamycin-Einwirkung gebildeten LEHis-Glykoformen durch Waschen der Zellen vor der Zugabe zu reduzieren. Eine gemeinsam transfizierte Kultur wurde dabei geteilt und nur zu einer Hälfte Tunicamycin hinzugegeben. Die andere Hälfte blieb zum Vergleich ohne Tunicamycin. Nach 3 Tagen Expressionsphase wurde der Kulturüberstand der geteilten Kultur parallel über Ni-NTA aufgereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert (**Abb. 29**). In beiden Eluatfractionen konnte LEHis mit dem jeweils erwarteten apparenten Molekulargewicht von ~19 kDa (+TM) und ~19-32 kDa (-TM) nachgewiesen werden. Die Proteinbanden in der Eluatfraction von nicht mit TM inkubierten Zellen waren deutlich stärker. Nach dieser Methode wird wegen des Medienwechsels also doppelt so viel Medium benötigt und die Expressionsrate von LEHis wird herabgesetzt. Somit scheint diese Methode nicht geeignet, große Mengen unglykosyliertes Protein für die Kristallisation zu produzieren.

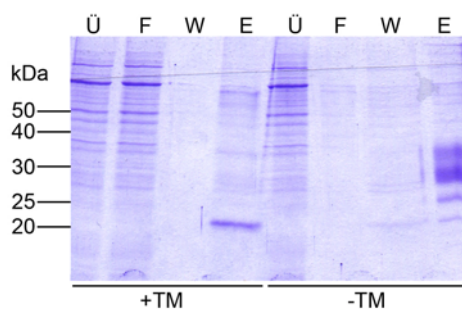
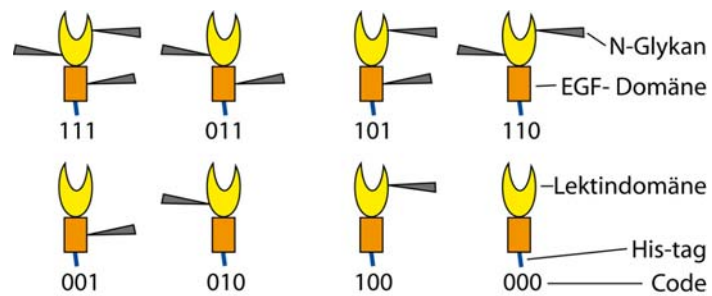


Abb. 29: Vergleich der Expressionsstärke von LEHis mit und ohne Tunicamycin-Behandlung. HEK293F-Zellen wurden mit LEHis transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Kultur in zwei Hälften geteilt, wobei eine Hälfte mit Tunicamycin behandelt wurde, während die andere Hälfte nicht weiter behandelt wurde. Nach 3 Tagen wurde der Kulturüberstand geerntet und mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt. Fraktionen dieser Aufreinigung wurden über 12%SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Ü: Überstand, F: Durchlauf, W: Waschfraction, E: Eluat, TM: Tunicamycin.

3.5.3 Expression von *N*-Glykosylierungsmutanten

Ein weiterer Ansatz zur Reduktion der *N*-Glykosylierung von LEHis ist die Mutation der *N*-Glykosylierungs-Konsensussequenzen. In der Sequenz von LEHis wurden systematisch die Asparagine N22, N66 und N139 der drei Glykosylierungs-Konsensussequenzen durch Glutamine (Q) ausgetauscht, wodurch die Glykosylierungsmaschinerie der Zelle diese Sequenz nicht mehr erkennt. Durch PCR-basierte gerichtete Mutagenese und Restriktion/Ligation wurden alle acht möglichen Kombinationen konstruiert und in den Vektor pcDNA3 kloniert. Die Konstrukte wurden mit einem Drei-Ziffern-Code versehen, die in der Reihenfolge für die drei Glykosylierungsstellen der Lektin- und EGF-Domäne stehen. Dabei steht eine 1 für eine intakte Glykosylierungsstelle bzw. ein vorhandenes *N*-Glykan und eine 0 eine Mutation bzw. ein fehlendes *N*-Glykan (**Abb. 30**).

Abb. 30: Schema der Glykosylierungsmutationen von LEHis und deren Codierung. Die drei Ziffern stehen für die drei Glykosylierungsstellen bei N22, N66 und N139. Die Ziffer „1“ steht für eine intakte Glykosylierungsstelle und eine „0“ für eine mutante.



Diese acht Konstrukte mit mutierten Glykosylierungsstellen wurden in HEK293F-Zellen transfiziert. Der Zellkulturüberstand (Ü) wurde über eine Ni-NTA-Säule angereichert und neben dem Zelllysat (Z) im Western Blot analysiert (**Abb. 31**).

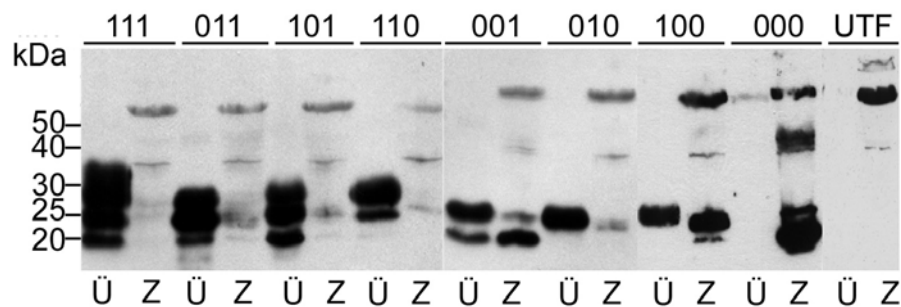


Abb. 31: Nachweis der Expression von LEHis Glykosylierungsmutanten im Western Blot. SDS-PAGE und Detektion mit polyklonalem anti-L-Selektin Antikörper im Western Blot. Ü: Kulturüberstand, Z: Zelllysat. Ziffern über den Gelen: Code für die Glykosylierungsmutanten (siehe auch Abb. 30) UTF: Untransfizierte HEK293F-Zellen.

Wildtypisches LEHis (111) konnte, wie zuvor beobachtet (vgl. Abschnitt 3.3.2), als Mischung aus 4 Glykosylierungsstufen mit einem apparenten Molekulargewicht von ~19-32 Da im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Bei der Mutante 011 ist die Glykosylierungsstelle an erster Position mutiert, weshalb das Protein an dieser Stelle nicht glykosyliert werden kann. Entsprechend erwartet man statt einer Mischung aus 4 Glykosylierungsstufen beim Wildtyp bei der Mutante 011 nur 3 Glykosylierungsstufen. Dieser Erwartung entsprechend konnten im Western Blot 3 Proteinbanden zwischen ~19 und ~27 kDa nachgewiesen werden. Analog zur Mutante 011 finden sich im Überstand der Mutante 101 ebenfalls 3 Glykosylierungsstufen. Bei 011 scheint im Vergleich zu 101 die einfach glykosylierte Form in der Mischung stärker repräsentiert zu sein. Bei der Mutante 110 ist die Bande der zweifach glykosylierten Form die stärkste, gefolgt von der einfach glykosylierten Form. Die Proteinbande für die nichtglykosylierte Form hingegen konnte bei dieser Mutante nicht detektiert werden. Bei der Mutante 001 konnten im Überstand zwei Proteinbanden nachgewiesen werden, welche die nichtglykosylierte und die einfach glykosylierte Form repräsentieren. Die Mutanten 010 und 100 zeigen jeweils nur eine Form von LEHis im Kulturüberstand, die mit ~23 kDa dem einfach

glykosyliertem LEHis entspricht. Hier fehlt, ebenso wie bei 110, die nichtglykosylierte Form von LEHis im Überstand. Bei 100 kann hingegen im Zelllysate eine deutliche Proteinbande detektiert werden, die ebenso stark wie die Bande im Überstand erscheint. Im Überstand der Dreifachmutante 000 konnte kein nichtglykosyliertes LEHis nachgewiesen werden. Allerdings ist im Zelllysate ein starkes Signal bei ~19 kDa. Offenbar wird die Mutante 000 gut exprimiert, das nichtglykosylierte Protein jedoch nicht in den Überstand sekretiert. Im Überstand untransfizierter Zellen wurde erwartungsgemäß keine Proteinbande detektiert, jedoch reagieren im Zelllysate zwei Proteinbanden mit L-Selektin Antikörper. Diese Signale sind auch in den Zelllysaten der Mutanten zu finden und somit unspezifisch.

Die Anzahl der detektierten Proteinbanden korreliert also bei fast allen Mutanten mit der Anzahl der möglichen Glykosylierungsstufen. Eine Ausnahme bilden alle Mutanten, die in der dritten Position die Mutation N139Q enthalten; bei diesen fehlt die nichtglykosylierte Form von LEHis im Kulturüberstand. Dies führt dazu, dass die Mutante 000, die neben den beiden ersten mutierten Glykosylierungsstellen auch die Mutation N139Q enthält, nicht in den Kulturüberstand sekretiert wird.

Es schien unwahrscheinlich, dass die verhinderte Sekretion von nichtglykosyliertem LEHis mit der Mutation N139Q darauf zurückzuführen ist, dass an dieser Position ein Glykan fehlt. Denn sowohl bei der Expression von LEHis mit Tunicamycin als auch bei Expression von LEHis 111, 011, 101 und 001 wird nichtglykosyliertes Protein in der Mischung mit den anderen Glykoformen sekretiert. Daher muß es sich bei N139Q um einen für diese Stelle ungünstigen Aminosäureaustausch handeln, der dazu führt, dass nichtglykosyliertes LEHis nicht sekretiert wird. Die Aminosäuresequenz der EGF-Domäne, in der sich N139 befindet, wurde daraufhin in der Datenbank (NCBI BLASTp (Altschul *et al.*, 1997)) mit homologen Sequenzen verglichen, um einen Hinweis zu erhalten, welche alternative Aminosäure an dieser Position toleriert würde. In der Sequenz von P-Selektin der Maus fand sich an homologer Stelle eine alternative Aminosäure zu Asparagin, nämlich ein Serin. Daher wurde analog in LEHis an Position 139 statt des Glutamins (Q) alternativ ein Serin (S) ausgetauscht. Dadurch wird die Konsensussequenz ebenfalls eliminiert. Im Drei-Ziffern-Code wird in diesem Falle hinter den drei Ziffern, die die Glykosylierungsmutante bezeichnen, ein (S) geschrieben. Kulturüberstände und Zelllysate von mit LEHis 000(S), 110 und 110(S) transfizierten HEK293F-Zellen wurden im Western Blot analysiert.

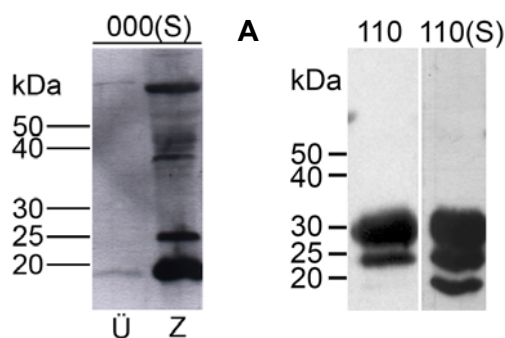


Abb. 32: Nachweis von nichtglykosyliertem LEHis mit der alternativen Mutation N139S im Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen. **A:** HEK293F-Zellen wurden mit der LEHis Mutante 000(S), 110 und 110 (S) transfiziert. Das Zelllysate von 000(S) und die Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem polyklonalen anti-L-Selektin Antikörper detektiert. **A:** Kulturüberstand (Ü) und Zelllysate (Z) LEHis 000(S) transfizierter HEK293F-Zellen. **B:** Kulturüberstand LEHis 110 und 110(S) transfizierter HEK293F-Zellen.

In **Abb. 32A** ist eine einzelne Bande im Überstand der mit der Dreifachmutante LEHis 000(S) transfizierten HEK293F-Zellen zu sehen. Mit einem apparenten Molekulargewicht von ~19 kDa korreliert diese Bande mit der nichtglykosylierten Form von LEHis. Somit kann LEHis in unglykosylierter Form sekretiert werden, wenn es statt der Mutation N139Q die Mutation N139S innerhalb der Glykosylierungsstelle besitzt. Es wird jedoch relativ wenig sekretiert, und im Zelllysat wird wie zuvor eine starke Proteinbande detektiert. In **Abb. 32B** sind Western Blot Analysen von Kulturüberständen von LEHis 110(S) und 110 transfizierten HEK293F-Zellen im direkten Vergleich nebeneinander gestellt. Im Überstand von 110 transfizierten Zellen wurden wie zuvor nur zwei Proteinbanden detektiert, die mit der einfach- und zweifach glykosylierten Form korrelieren. Im Überstand der mit der Mutante 110(S) transfizierten Zellen hingegen wurden drei Proteinbanden detektiert, die die zweifach- einfach- und zusätzlich die nicht-glykosylierte Form von LEHis repräsentieren. Somit konnte gezeigt werden, dass die Sekretion der nicht-glykosylierten Form von LEHis durch Einführen der Mutation N139S statt N139Q wiederhergestellt werden kann.

Es handelt sich bei N139Q also um eine für die Sekretion ungünstige Mutation innerhalb der EGF-Domäne. Anhand der Mutanten 110, 010, 100 ist die positive Wirkung der *N*-Glykosylierung auf die Sekretion zu beobachten. Denn obwohl die Mutation N139Q ungünstig für die Sekretion ist, bewirkt die Modifikation mit nur einem einzigen *N*-Glykan, dass das Protein sekretiert werden kann.

Bei der systematischen Mutagenese von *N*-Glykosylierungsstellen konnten erfolgreich Varianten von LEHis generiert werden, die weniger glykosyliert sind als der Wildtyp. Bei den beiden Mutanten LEHis 010 und 100 wird nur eine einzige, einfach glykosylierte Form in den Kulturüberstand sekretiert. Diese neuen LEHis-Varianten eignen sich wegen der höheren Homogenität wahrscheinlich besser für die Kristallisation als LEHis, das 4 Proteinbanden auf dem Gel zeigt.

Neben der Nutzung für die Kristallographie wurden die Mutanten auch bezüglich des Einflusses der Glykane auf Sekretion und Funktion untersucht. Besonders interessant ist es, die drei Mutanten 100, 010 und 001, die jeweils nur noch ein einzelnes Glykan tragen, miteinander zu vergleichen. Die Glykanstruktur für jede einzelne Position sowie der Einfluß auf Sekretion und Funktion waren bislang nicht bekannt. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Glykosylierungsmutanten und zum Einfluß, Struktur und Funktion der Glykane werden in Abschnitt 3.13 der vorliegenden Arbeit beschrieben.

3.6 Auswahl des L-Selektin-Konstruktes für die Kristallisation

Bei der Mutagenese von LEHis sind Varianten entstanden, die jeweils nur eine einzelne, einfach glykosylierte Form von LEHis in den Kulturüberstand sekretieren (**Abb. 31**). Zusätzlich wurde eine nichtglykosylierte Variante LEHis (000(S)) konstruiert, die ebenfalls nur eine einzige Proteinbande nach Auftrennung durch SDS-PAGE zeigt (**Abb. 32**). Da die Expressionsrate der Variante 010 deutlich stärker ist als jene von 100 und 000(S), wurde diese Variante zur weiteren Optimierung der Produktion von L-Selektin für die Kristallisation ausgewählt. Zum Vergleich wurde in **Abb. 33** im Western Blot die einzelne Bande von LEHis 010 den vieren des wildtypischen LEHis (111) gegenübergestellt.

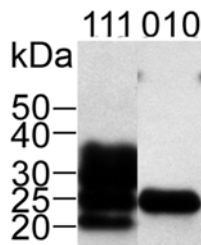


Abb. 33 Vergleich der beiden LEHis-Varianten 111 (wt) und 010. Western Blot von Kulturüberständen LEHis111 und 010 transfizierter HEK293F-Zellen. Detektion mit polyklonalem anti-L-Selektin-Antikörper.

3.6.1 Funktioneller Test der L-Selektin Variante LEHis 010

Wenn die Variante LEHis 010 für die Kristallisation genutzt werden soll, so muß zunächst sichergestellt sein, dass sie funktionell aktiv ist. Dazu wurde mittels Ni-NTA und AAC aufgereinigtes LEHis 010 in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an die sTyr/sLeX-Ligandenaffinitätssäule gebunden und durch den Calciumchelator EDTA eluiert. Fraktionen der Chromatographie wurden im Western Blot analysiert (**Abb. 34**). Im Eluat der sTyr/sLeX-Säule konnte LEHis 010 mit einem apparenten Molekulargewicht von ~23,5 kDa nachgewiesen werden. Somit konnte demonstriert werden, dass die Mutante LEHis 010 bindungsaktiv ist und für Kristallisationsversuche eingesetzt werden kann.

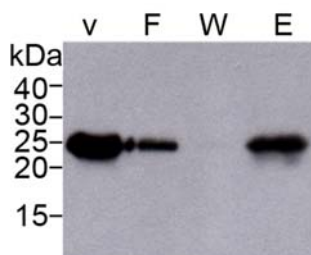


Abb. 34: Nachweis der Bindungsaktivität von LEHis 010 durch Bindung an den synthetischen Bi-Liganden sTyr/sLeX. LEHis 010 wurde in HEK293F-Zellen exprimiert und über Ni-NTA und AAC aufgereinigt. Nach Konzentrieren und Pufferwechsel wurde LEHis 010 in Anwesenheit von Calcium an die sTyr/sLeX-PAA-Sepharose-Säule gebunden, gewaschen und mit EDTA eluiert. V: vor der Säule, F: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Eluatfraktion.

3.6.2 Expression, Reinigung und Kristallisation von LEHis 010

LEHis 010 wurde in HEK293F-Zellen nach dem PEI-Protokoll transfiziert. 4 Tage nach Transfektion wurde der Kulturüberstand geerntet und mittels Ni-NTA-Agarose und AAC aufgereinigt. Fraktionen der Reinigungen wurden mittels Western Blot analysiert (**Abb. 35**). Im Überstand, Durchlauf und den Waschfraktionen konnte kein LEHis 010 nachgewiesen werden. In der Eluatfraktion hingegen konnte die homogene Proteinbande von LEHis 010 detektiert werden. Im silbergefärbten Gel sieht man, dass das Ni-NTA-Eluat sehr verunreinigt ist. Diesem ersten chromatographischen Schritt muß also eine weitere, spezifische Aufreinigung erfolgen.

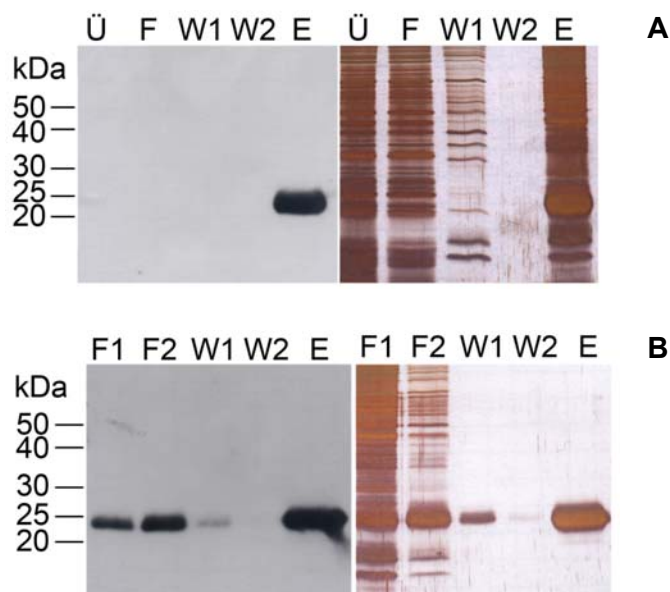


Abb. 35: Reinigung von LEHis 010 über Ni-NTA und AAC. Nachweis von LEHis 010 durch SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. im Western Blot durch den polyklonalen anti-L-Selektin Antikörper. Die Elution erfolgte jeweils mit 50 ml Elutionspuffer, davon sind 20 µl aufgetragen worden.

A: Reinigung über Ni-NTA,
B: Reinigung über AAC.
 Ü: Überstand,
 F: Durchlauf fraktionen,
 W: Waschfraktionen, E: Eluat

Für die Präparation hochreinen LEHis 010 steht die AAC-Säule zur Verfügung. In **Abb. 35B** sind die Fraktionen der Aufreinigung des Ni-NTA-Eluates durch AAC zu sehen. In den Durchlauf fraktionen, sowie in der ersten Waschfraktion war LEHis 010 nachzuweisen. Auf dem silbergefärbten Gel in **Abb. 35B** ist die sehr reine Eluatfraktion der AAC zu sehen. Da im Durchlauf der AAC stets relativ viel Protein vorhanden ist, wurden die Durchlauf fraktionen nacheinander erneut aufgereinigt, bis kein LEHis mehr eluiert werden konnte (o. Abb.). Die Eluate wurden gepoolt und konzentriert. Es konnten etwa 2 mg reinstes LEHis 010 aus 4 L Kulturüberstand gewonnen werden. Nach Konzentrierung und Umpuffern die Reinheit der Präparation mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung überprüft (**Abb. 36**).

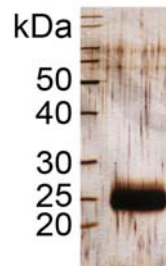


Abb. 36: Reinheitsprüfung von aufgereinigtem LEHis 010. 2 µg aufgereinigter Probe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt.

Aufgereinigtes LEHis 010 wurde so nach finaler Gelfiltration („*Polishing*“) (vgl. 3.8.1) über eine Superdex 200 (16/60) Säule zu Kristallisations-Screenings eingesetzt. Es konnte jedoch, auch nach mehrmaliger Wiederholung, keine Kristallisationsbedingung mit diesem Protein gefunden werden.

3.7 Optimierung von LE 010 für die Kristallisation

3.7.1 Entfernen des Affinitätstags

Bislang wurde mit einem C-terminal His-getaggen Protein (LEHis) gearbeitet. Da es manchmal bei der Kristallisation zu Problemen kommen kann, die durch die Anwesenheit eines Affinitätstags hervorgerufen werden, wurde mithilfe molekularbiologischer Standardmethoden eine Thrombinschnittstelle zwischen LE und dem His-*tag* eingeführt, um das *tag* entfernen zu können. Mithilfe der Thrombinschnittstelle sollte es möglich sein, das His-*tag* nach der Aufreinigung proteolytisch abzuspalten. LEHis 010 mit Thrombinschnittstelle (im Folgenden „LEHis 010“ genannt) wurden mit Thrombin inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert (**Abb. 37**).

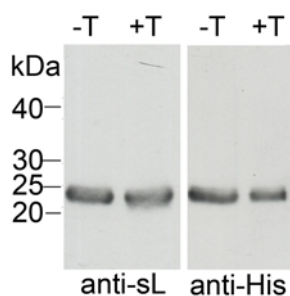


Abb. 37: Nachweis des intakten Protein LEHis 010 und des His-tag nach Verdau mit humanem α -Thrombin. Jeweils 5 µg aufgereinigtes LEHis 010 wurde mit 0,5 µg humanem α -Thrombin für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Proben des Reaktionsansatzes wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot einmal mit dem polyklonalen anti-L-Selektin Antikörper und einmal mit dem anti-His-Antikörper detektiert. -T: Ansatz ohne Thrombin, +T: Ansatz mit Thrombin..

Im Western Blot konnte LEHis 010 mit dem anti-L-Selektin Antikörper in der Probe mit und ohne Thrombin-Inkubation nachgewiesen werden. Ebenso konnte LEHis 010 in beiden Proben mit dem anti-His-Antikörper nachgewiesen werden. Somit wurde das His-*tag* offenbar nicht abgespalten. Die Funktionalität des Thrombins unter diesen Bedingungen wurde parallel an einem anderen Protein kontrolliert und war gegeben (nicht gezeigt). Da auf diese Weise kein *tag*-freies Protein erhalten werden konnte, wurde anschließend ein anderes Konstrukt kloniert, das LE 010 mit einer

Thrombinschnittstelle fusioniert an den Fc-Teil des humanen IgG enthält. Nach Expression und Funktionalitätstest stellte sich heraus, dass dieses Konstrukt nicht bindungsfähig war (nicht gezeigt).

Somit hatte die Strategie, ein spaltbares Konstrukt herzustellen, keinen Erfolg und so wurde ein alternativer Ansatz verfolgt. Hierzu wurde eine Variante von LE 010 kloniert, die kein Affinitätstag besitzt. HEK293F-Zellen wurden mit diesem LE 010 transfiziert und nach 3 Tagen wurde der Zellkulturüberstand ohne weitere Vorbehandlung parallel über die sTyr/sLeX- und die Aptamer-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit EDTA. Die Fraktionen dieser Chromatographien wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert (**Abb. 38**). In den Eluatfraktionen der AAC und der sTyr/sLeX-Säule konnte LE 010 bei jeweils ~22 kDa nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass nicht-getaggetes LE 010 direkt, ohne Vorbehandlung und in einem Schritt aus Zellkulturüberstand aufgereinigt werden kann. Außerdem bindet LE 010 an die sTyr/sLeX-Säule und besitzt damit Ligandenbindungsaktivität. Die Aufreinigung über das Aptamer resultierte in weniger verunreinigenden Nebenbanden auf dem Gel als die Aufreinigung über die sTyr/sLeX-Säule. Zuvor wurde bereits erwähnt, dass die sTyr/sLeX-Säule, die zur Verfügung stand, eine zu geringe Kapazität hatte. Von der Aptamer-Affinitätsmatrix ließen sich hingegen leichter und kostengünstiger größere Mengen herstellen, so dass im Folgenden die Aufreinigung des LE 010 für die Kristallisation mittels AAC erfolgen sollte.

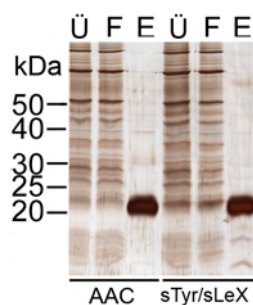


Abb. 38: Reinigung von nicht-getaggetem LE 010 aus Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen mittels AAC und sTyr/sLeX. Proben der Chromatographien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Linke Seite: Aptamer-Säule (AAC), rechte Seite: sTyr/sLeX-Säule Ü: Kulturüberstand; F: Durchfluss; E: Eluat. Das Eluat wurde jeweils konzentriert.

3.7.2 Optimierung der Transfektion von LE 010 mit PEI

Um das ideale Verhältnis für die Generierung von Transfektionskomplexen für LE 010 zu ermitteln, wurden HEK293F-Zellen in einer 6-well Schale mit 6 unterschiedlichen DNA:PEI Verhältnissen mit pcDNA3:LE 010 transfiziert. Dabei wurden 4 verschiedene Chargen PEI benutzt, um die Variabilität zwischen den Chargen zu überprüfen. 3 Tage nach der Transfektion wurde die Konzentration des LE 010 mittels sL-Selektin-ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 39** dargestellt. Das optimale Verhältnis von DNA:PEI für die Bildung von Transfektionskomplexen lag zwischen 1:3 und 1:3,5. Die Variabilität der einzelnen PEI Chargen untereinander war gering. In den folgenden Expressionen wurden die Transfektionskomplexe immer in einem Verhältnis von 1:3,5 hergestellt.

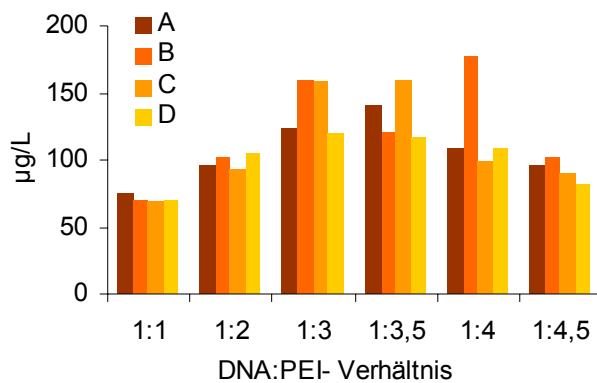


Abb. 39: Ermittlung des optimalen DNA:PEI-Verhältnisses für die Transfektion und Test verschiedener PEI-Chargen. 4 verschiedene Chargen PEI (A-D) wurden in 6 verschiedenen DNA: PEI Verhältnissen für die Transfektion von LE 010 eingesetzt. 3 Tage nach Transfektion wurde die L-Selektin-Konzentration im Kulturüberstand mittels sL-Selektin-ELISA gemessen und graphisch dargestellt.

3.7.3 Untersuchung der Kulturbedingungen im Schüttelkolben

Für das Hochskalieren der Schüttelkultur stand ein CO₂-begaster Schüttelbrutschrank zur Verfügung, der allerdings auf 15 Plätze für 1L-Erlenmeyerkolben begrenzt war. Die maximal zumutbare Füllhöhe in einem 1L-Erlenmeyerkolben wurde zu 400 ml angenommen. Da die Expressionsrate im Erlenmeyerkolben zwar höher als im 6-well-Format, aber dennoch relativ niedrig ist, wurde die gesamte Schüttlerkapazität benötigt. Es wurde daher untersucht, ob es für die Expression vertretbar ist, die maximale Füllhöhe der Kolben zu nutzen. Außerdem wurde Zellaggregatbildung, Wachstum und Vitalität untersucht. Dazu wurden 12 1 L-Erlenmeyerkolben mit vier verschiedenen Füllhöhen mit jeweils 3 verschiedenen Zellkonzentrationen mit LE 010 bei einem DNA:PEI-Verhältnis von 1:3,5 transfiziert und bei 96 rpm (5 cm Hub) im CO₂-begasten Schüttelbrutschrank 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden Proben entnommen, mit Trypanblau gefärbt und die vitalen, nichtvitalen und aggregierten Zellen gezählt. Aus diesen Zellzahlen wurden die Verhältnisse zu den anfangs eingesetzten Zellkonzentrationen errechnet und in **Abb. 40** graphisch dargestellt.

Das Zellwachstum bewegte sich in einem Rahmen von -42 % bis 144 %. In 100 ml Kulturvolumen wuchsen die Zellen sehr schnell, bei 400 ml hingegen waren nach 3 Tagen weniger Zellen zu finden, als ausgesät worden waren. In dem Diagramm in (**Abb. 40A**) ist deutlich zu erkennen, dass das Wachstum mit steigendem Kulturvolumen geringer wird. Ähnlich verhält sich die Vitalität, die mit steigendem Kulturvolumen sinkt. In den verschiedenen Kulturen wurde die Vitalität mit 33,5 % bei 400 ml und einer Dichte von 9×10^5 Zellen/ml bis 73,8 % bei 100 ml und 1×10^6 Zellen/ml bestimmt. Die Werte für die Zellaggregate reichten von 41,4 % bis 66,3 %. So wurden die wenigsten Zellaggregate bei 300 ml bei einer eingesetzten Zelldichte von 9×10^5 Z/ml gezählt. Bei 100 ml und 400 ml gab es mehr Zellaggregate als bei 200 ml und 300 ml. Die höchste, mit einem L-Selektin-spezifischen ELISA gemessene Expression wurde auf 100 % gesetzt. Die relative Expressionsrate umfaßte somit Werte von 51,4 % bis 100 %. Die Expressionsrate bei 1×10^6 Z/ml und 9×10^5 Z/ml war bei 300 ml am stärksten. Beachtenswert bei diesen Ergebnissen ist, dass in dem Kolben mit der geringsten Zellaggregation die höchste Expressionsrate gemessen wurde. In folgenden Transfektionsansätzen wurde also darauf geachtet, Zellaggregate möglichst gering zu halten. Zellwachstum und Vitalität müssen für eine gute Expression offenbar nicht hoch sein. Obwohl

die Vitalität bei dem angestrebten maximalen Kulturvolumen von 400 ml am geringsten war, war die Expression bei allen drei Zelldichten nur wenig geringer als bei den für die Expressionsrate optimalen 300 ml.

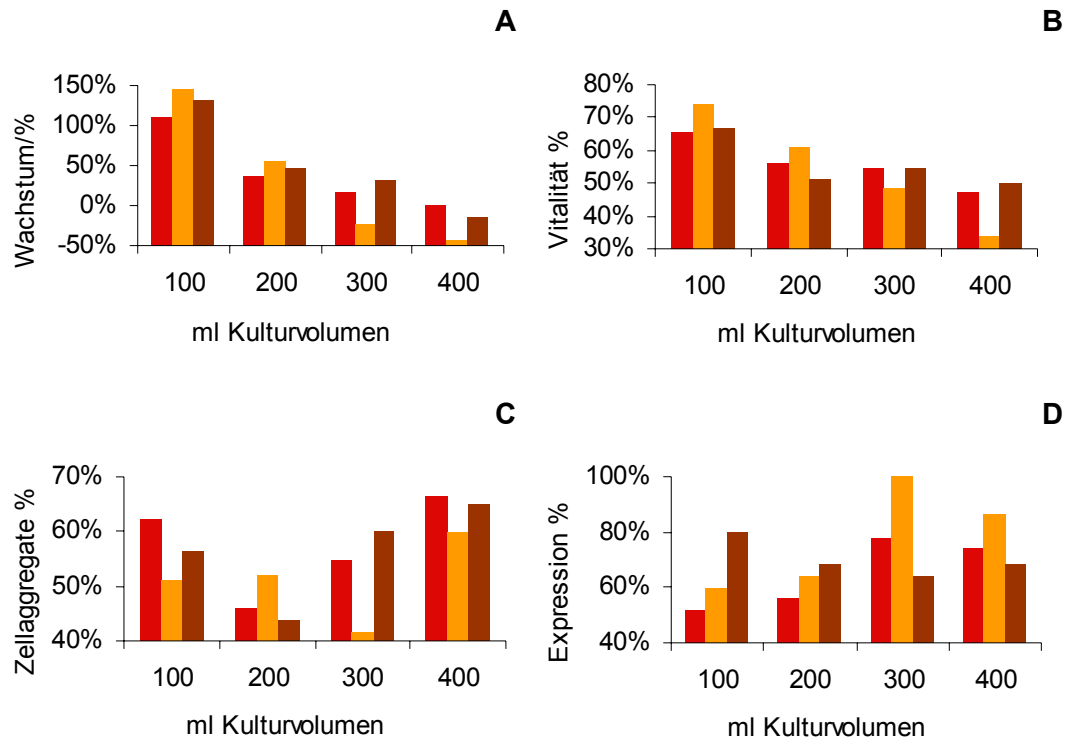


Abb. 40: Untersuchungen zu den Kulturbedingungen im 1 L-Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator. Einfluss der Zelldichte und Füllhöhe im Schüttelkolben bei konstanter Schüttelgeschwindigkeit auf **A)** Zellwachstum, **B)** Vitalität, **C)** Zellaggregate und **D)** Expressionsrate bei drei verschiedenen Zelldichten (Legende rechts). Die Werte für A-C wurden in der Zählkammer und mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Die Expressionsrate wurde durch sL-Selektin-ELISA bestimmt, dabei wurde der höchste Wert zu 100 % gesetzt.

■ 1000000 Z/ml
 ■ 900000 Z/ml
 ■ 800000 Z/ml

3.7.4 Optimierung der AAC

Mit dem Ziel, die Parameter für eine optimierte Aufreinigungsmethode zu ermitteln, wurden verschiedene Salzkonzentrationen, pH-Werte und Elutionsbedingungen für die AAC getestet. Die vorhandene AAC-Matrix wurde dazu zu je 200 µl Bettvolumen in *Mobicol*-Säulchen gefüllt, um die Versuche parallel durchführen zu können. Pro Versuch wurden je 10 µg LE 010 in TBS-Puffer mit 2 mM CaCl₂, verschiedenem pH-Wert und NaCl-Konzentrationen eingesetzt.

Zunächst wurde der Einfluß der Salzkonzentration und des pH-Wertes auf die Säulenbindung mithilfe von bereits einmal aufgereinigtem LE 010 untersucht. Bei diesem Test wurden alle Säulchen mit TBS mit 20 mM EDTA bei entsprechendem pH-Wert eluiert. Proben des Durchlaufes, der Waschfraktion und des Eluatpools wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und

silbergefärbt (**Abb. 41**).

Es konnte gezeigt werden, dass aufgereinigtes LE 010 vollständig an die Matrix bindet, wenn dessen Kapazität nicht überschritten wird. In den Durchlaufaktionen wurde bei keinem der Versuche LE 010 detektiert. Bei pH 7 bindet LE 010 in Puffer mit 150 mM NaCl bzw. 200 mM NaCl gleich gut an die Säule; nur in der Eluatfraktion ist eine Proteinbande zu erkennen. Bei 300 mM NaCl bleibt die Bindung bei pH 7 unvollständig, denn in der Waschfraktion ist mehr Protein vorhanden als in der Eluatfraktion. Bei den Chromatographien bei pH 7,5 sehen die Eluatfraktionen bei 150 und 200 mM NaCl ähnlich aus wie bei pH 7. Bei 300 mM NaCl hingegen wird der Großteil des Proteins bereits während des Waschschrutes herausgewaschen und nur wenig Protein ist im Eluat zu erkennen. Bei pH 8 sind die Proteinbanden in den Eluatfraktionen kleiner als bei pH 7 oder 7,5. Wo der Verlust stattgefunden hat, ist allerdings nicht zu erkennen, da kein Protein im Durchlauf oder der Waschfraktion detektiert wurde. Wahrscheinlich ist das Protein bei pH 8 nicht mit 20 mM EDTA eluierbar und befindet sich noch auf der Säule. Daher wurde in der nächsten Versuchsreihe die optimale EDTA-Konzentration zur Elution ermittelt. In Gegenwart von 300 mM NaCl bindet LE 010 auch bei pH 8 nicht sehr gut an die Matrix, und findet sich überwiegend in der Waschfraktion (**Abb. 41**).

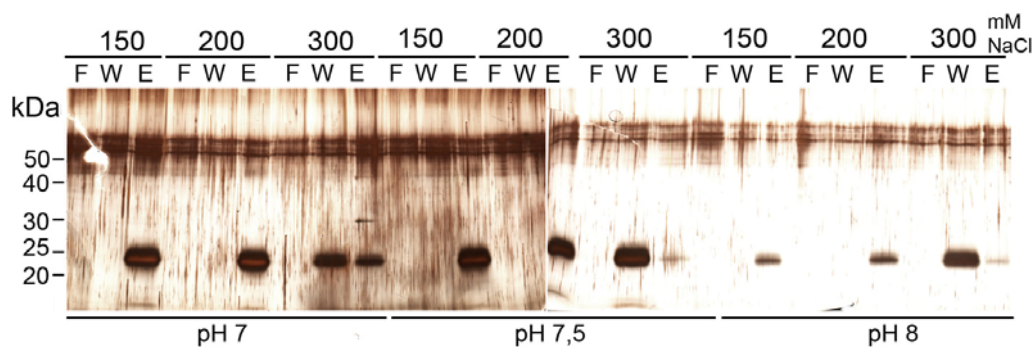


Abb. 41: Ermittlung des optimalen pH und der optimalen NaCl-Konzentration für die Bindung von LE 010 an die AAC-Matrix. Bindung von bereits aufgereinigtem LE 010 an die Aptamersäule bei pH 7, 7,5 und 8. Die Versuche fanden parallel an aliquotierter Säulenmatrix im 200µl- Maßstab statt. Jede pH- Wert Reihe wurde bei drei verschiedenen NaCl-Konzentrationen durchgeführt (über den Spuren angegeben). F: Durchlaufaktion, W: Waschfraktion, E: Eluatfraktion

Als nächstes wurde jeweils 10 ml Kulturüberstand LE 010 exprimierender HEK293F-Zellen über die Säule gegeben, um die Reinigungsleistung unter den verschiedenen Bedingungen zu analysieren. Die Versuche waren wie oben beschrieben parallel durchgeführt worden. LE 010 wurde bei pH 8 und pH 7 in Gegenwart von 150 bzw. 200 mM NaCl, das sich im vorigen Versuch als tolerabel erwiesen hatten, an die Säulchen gebunden. Durch Verwendung von 200 mM NaCl sollte untersucht werden, ob eine gegenüber der physiologischen leicht erhöhten Salzkonzentration zu besserer Reinigung führt. Die Elution wurde mit vier verschiedenen EDTA-Konzentrationen zwischen 20 mM und 100 mM in Bindungspuffer untersucht. Fraktionen der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt (**Abb. 42**).

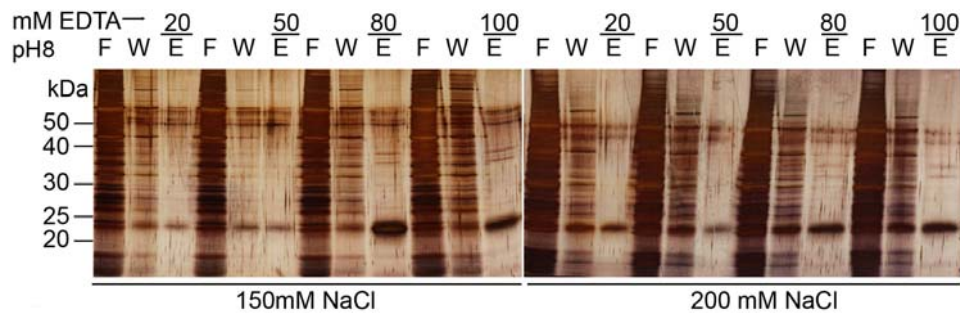


Abb. 42: Test der Parameter für die Reinigung von LE 010 aus Kulturüberstand über AAC bei pH 8 sowie 150-200 mM NaCl. Kulturüberstand LE 010 transfizierter HEK293F-Zellen wurde unter verschiedenen Bedingungen mittels AAC aufgereinigt. Dabei wurde Bindungspuffer mit 150 mM NaCl und 200 mM NaCl untersucht. Die Elution von den AAC-Säulchen fand mit 20, 50 oder 80 mM EDTA statt

Nach Bindung von LE 010 an die Aptamersäule bei pH 8 (**Abb. 42**) sind die stärksten Banden in jenen Eluatfraktionen zu sehen, die mit 80 mM und 100 mM EDTA eluiert wurden. Dies bestätigt die Annahme, die im vorigen Versuch gemacht wurde, dass eine Konzentration von 20 mM EDTA bei pH 8 offenbar nicht ausreicht, eine vollständige Elution zu gewährleisten. Der Vergleich der beiden Salzkonzentrationen ergab, dass bei 200 mM NaCl offenbar mehr Protein im Waschschritt abgelöst wird als bei 150 mM NaCl. Führt man die AAC hingegen bei pH 7 durch, so reichen bereits 20 mM EDTA für die Elution aus (**Abb. 43**). Die Eluatfraktion ist zudem bei pH 7 deutlich sauberer als jene bei pH 8. Bei beiden Salzkonzentrationen ist jedoch zu sehen, dass eine ~22 kDa-Proteinbande in den Waschfraktionen vorhanden ist. Dabei könnte es sich um einen Anteil nicht bindungsaktiven LE 010 handeln. Für diese Annahme spricht, dass einmal aufgereinigtes LE 010 bei erneuter Chromatographie vollständig an die Affinitätsmatrix bindet (**Abb. 41**). Unabhängig von dem Grund für diese Proteinbande im Durchlauf ist es für die Kristallisation vorteilhaft, wenn eventuelle alternative, nicht-funktionelle LE 010-Strukturen, die nicht an das Aptamer binden, abgetrennt werden. Versuche mit weniger oder keinem NaCl in den Pufferlösungen zeigten, dass die physiologische NaCl-Konzentration von 150 mM für die Reinigung notwendig ist (o. Abb.).

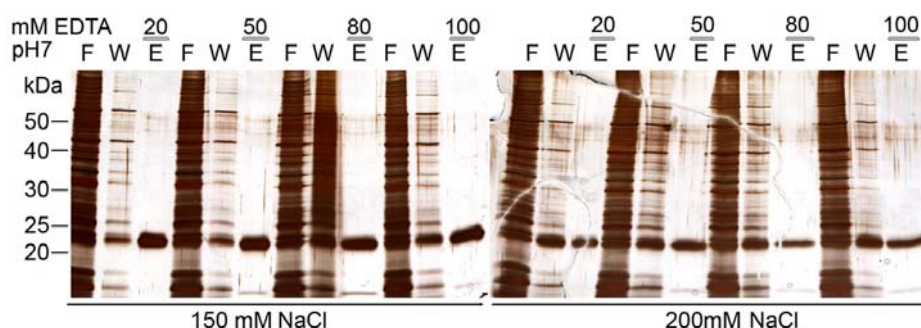
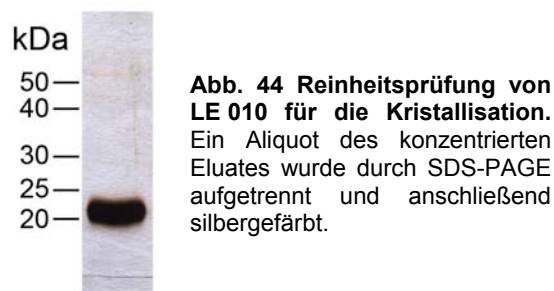


Abb. 43: Test der Parameter für die Reinigung von LE 010 aus Kulturüberstand über AAC bei pH 7 sowie 150-200 mM NaCl. Kulturüberstand LE 010 transfizierter HEK293F-Zellen wurde unter verschiedenen Bedingungen mittels AAC aufgereinigt. Dabei wurde Bindungspuffer mit 150 mM NaCl und 200 mM NaCl untersucht. Die Elution von den AAC-Säulchen fand mit 20, 50 oder 80 mM EDTA statt.

Im Folgenden wurde somit die Aptamer-Affinitätschromatographie bei pH 7, 150 mM NaCl und 2 mM CaCl₂ durchgeführt. Die Elutionen erfolgten mit 20 mM EDTA in TBS. Nach jeder Elution wurde die Säule mit 6 M Guanidiniumchlorid und 70 % Ethanol gewaschen und mit Bindungspuffer reäquilibriert. Durchlaufaktionen wurden erneut aufgereinigt, um die höchstmögliche Ausbeute zu erzielen.

3.7.5 Reinheits- und Homogenitätsprüfung

Das nach den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Verfahren gewonnene L-Selektin ("LE 010") wurde mittels SDS-PAGE und Silberfärbung auf seine Reinheit überprüft (**Abb. 44**). Auf dem Gel erscheint die Proteinpräparation sehr rein und homogen.



3.7.6 Überprüfung der Primärsequenz mittels Massenspektrometrie

Das zu kristallisierende LE 010 wurde von Dr. Eckhard Nordhoff (MPI für molekulare Genetik, Berlin) massenspektrometrisch untersucht. Nach tryptischem Verdau ohne vorherige Reduktion und Alkylierung konnte festgestellt werden, dass der N- und C-Terminus korrekt sind und der theoretischen erwarteten Sequenz entsprechen. Das N-Glykan wurde wie erwartet verknüpft mit dem Asparagin 66 gefunden. Bei der Analyse des intakten Proteins mit verschiedenen MALDI-Matrizes wurden bei einem erwarteten maximalen Fehler von 150 ppm folgende mittlere Molekülmassen gemessen: 20341, 20382, 20465, 20487, 20530 und 20633. Es zeigte sich also eine durch das N-Glykan bewirkte Heterogenität. Der Kohlenhydratanteil betrug ca. 10 % der gesamten Molekülmasse. Das berechnete Molekülgewicht ohne Glykananteil und mit der Annahme, dass alle Cysteine oxidiert sind, betrug 18389,6. Das C-terminal tryptische Peptid, welches der EGF Domäne entspricht, ist sehr groß und wies drei Disulfidbrücken auf. Zusätzlich wurde dieses C-terminale Peptid mit Cys 19 verlinkt detektiert (Peptide 114-157+18-20 und 114-157+17-20). Nach Alkylierung und HPLC-Trennung konnten die Peptide, die Cys 90 und 109 enthalten, ebenfalls detektiert werden, die somit wahrscheinlich verbrückt sind. In Kombination mit den Ergebnissen der direkten Analyse des tryptischen Verdau ohne vorherige Reduktion und Alkylierung wurde eine fast vollständige Sequenzabdeckung erreicht und die erwartete Primärstruktur bestätigt. Es fehlten dabei lediglich die Aminosäuren 56-67, an denen das N-Glykan die Analyse behindert.

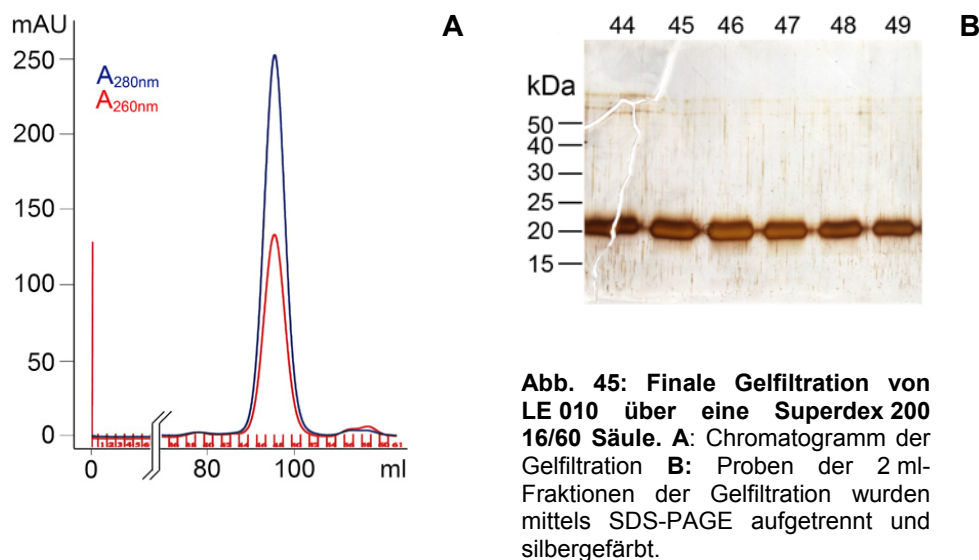
Der Proteinanteil war nach diesen Ergebnissen homogen, die Disulfidbrücken entsprechen

den Erwartungen und es konnten keine unerwarteten Modifikationen am *N*- und *C*-Terminus von LE 010 nachgewiesen werden. Trotz des homogenen Erscheinungsbildes auf dem SDS-PAGE-Gel weist die *N*-Glykosylierung der Variante LE 010 eine Mikroheterogenität auf, was bei der Glykananalyse in Abschnitt 3.14 der vorliegenden Arbeit gezeigt wird.

3.8 Kristallisation

3.8.1 Gelfiltration: „Polishing“

Direkt bevor das mittels AAC aufgereinigte LE 010 für Kristallisationsansätze benutzt wurde, wurde es abschließend einer Gelfiltration über eine Superdex 200 (16/60)-Säule unterzogen (**Abb. 45A**). Das Chromatogramm in **Abb. 45A** zeigt einen einzelnen, relativ symmetrischen Haupt-*Peak*. Kleinere Erhebungen der Grundlinie vor und nach dem Haupt-*Peak* wurden somit abgetrennt. Die Fraktionen wurden auf dem SDS-Gel kontrolliert (**Abb. 45B**). Die zum *Peak* gehörigen Fraktionen enthielten LE 010, das nach SDS-PAGE als einzelne saubere Bande auf dem silbergefärbten Gel erscheint. Die Fraktionen wurden ausgewählt, vereinigt und konzentriert.



Nach dem Konzentrieren auf ca. 15 mg/ml wurde die Proteinlösung schnellstmöglich für Kristallisationsscreens eingesetzt.

3.8.2 Initiale Kristallisations-Screenings

Durch die niedrige Expressionsrate des ausgewählten Konstruktes konnten nur jeweils ca. 1 mg reinstes LE 010 pro Charge gewonnen werden. Da dies für Kristallisationsscreens recht wenig ist, wurden die initialen Screens zu 150 nl im 96-well-Format mithilfe eines Pipettierroboters pipettiert. Bei folgenden Bedingungen konnten Mikrokristalle (**Abb. 46**) gefunden werden:

15% PEG 4000	(1)
0,1 M Natriumcitrat pH 5,6	
0,2 M Ammoniumacetat	
„ <i>sitting drop</i> “, 18°C	
10-15 mg/ml Proteinkonzentration	

Nachdem diese Bedingungen gefunden waren, wurden neben der L-Selektin Glykosylierungsvariante LE 010 zur Kontrolle auch noch die vollglykosylierte Variante LE 111 und die nichtglykosylierte Variante LE 000(S), das nach dem gleichen Verfahren exprimiert und aufgereinigt worden war, im 96well-Format *gescreent*. Es konnten keine Kristalle dieser Varianten erhalten werden.

Anschließend wurden die Kristallisationsbedingungen für LE 010 manuell mit weiteren Chargen näher definiert. Dabei wurde der pH-Wert (5; 6; 7; 8) variiert, das Fällungsmittel (Ammoniumsulfat, Ammoniumacetat (0,1 M; 0,2 M; 0,4 M)), die PEG- Konzentration (8 %, 10 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %), die PEG-Größe (PEG 400, 2000, 3350, 4000 Da), Zugabe von Calcium- oder Magnesiumionen oder Zugabe von 10 % MPD getestet. Reproduzierbares Wachstum von kleinen Kristallen konnte bei folgenden Bedingungen **(2)** beobachtet werden.

10-15 mg/ml Proteinkonzentration	(2)
„ <i>hanging drop</i> “ 4-7 Tage 18 °C	
15% PEG 4000	
0,1 M Natriumcitrat pH 5,6	
0,2 M Ammoniumsulfat	



Abb. 46: Mikroskopisches Bild der Kristalle von LE 010. Die Kristalle wurden mit den unter (2) genannten Bedingungen erhalten

Die Kristalle wurden am Synchrotron (BESSY II Berlin oder ESRF Grenoble) gemessen (s. Abschn. 3.9). Durch „*Microseeding*“, also Animpfen eines neuen Proteintropfens mit Bruchstücken eines bereits gewachsenen Mikrokristalls, konnte kein verbessertes Kristallwachstum erreicht werden.

3.8.3 Kristallisation mit Liganden

Die Kristallstruktur von L-Selektin ist nur im Komplex mit einem seiner Liganden biologisch informativ. Außerdem können zu kristallisierende Proteine durch ihre Liganden stabilisiert werden, was häufig zu verbesserter Auflösung bei der Messung führt. Die Kristalle, die in den initialen *Screenings* erhalten wurden, führten bei der Messung zu einem Beugungsmuster mit geringer

Auflösung ($> 14 \text{ \AA}$). Daher wurden in parallelen Ansätzen verschiedene Liganden zugegeben.

In einem Ansatz wurde versucht, L-Selektin LE 010 zusammen mit dem Aptamer (s. 5.2.11) zu kristallisieren. Dazu wurde 1,5 Moläquivalent Aptamer in TBSCa-Puffer gelöst zur Proteinlösung hinzugegeben und über eine Superdex 200-Säule (16/60) gefiltriert, um ungebundenes Aptamer zu entfernen. In **Abb. 47A** ist das Chromatogramm der Gelfiltration abgebildet. In die Abbildung wurde zum Vergleich das Chromatogramm von LE 010 ohne Aptamer montiert. Das Maximum des Elutionspeaks von LE 010 mit Aptamer liegt bei etwa 87 ml, während jenes von LE 010 allein bei etwa 93 ml liegt. Der Anteil der Absorption bei 260 nm ist bei dieser Chromatographie größer als bei LE 010 allein, da das Aptamer bei 260 nm absorbiert. Die Eluate wurden auf einem silbergefärbten SDS-Gel kontrolliert (**Abb. 47B**). In Fraktion 40-45 konnte LE 010 bei $\sim 22 \text{ kDa}$ nachgewiesen werden. Nach denaturierender SDS-PAGE liegt der Komplex dissoziiert vor. In der letzten Spur des Gels ist die Probe nach Konzentration zu sehen. Die Probe war sehr rein. Die Präsenz des Aptamers in den Fraktionen wurde zusätzlich zur Verschiebung des Peaks der Gelfiltration durch native PAGE mit anschließender Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen.

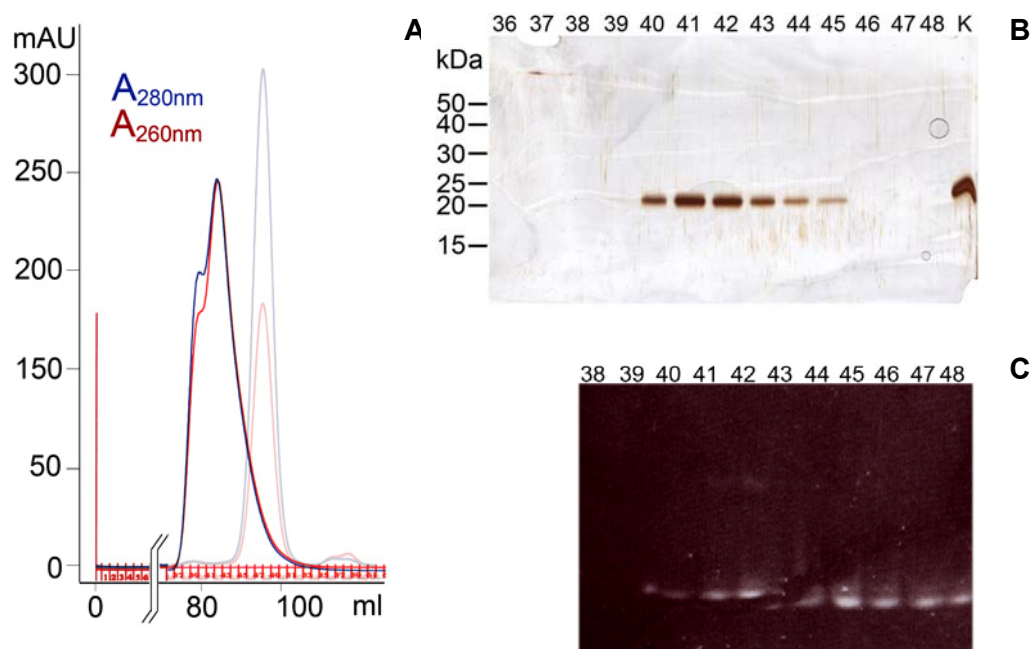


Abb. 47: Gelfiltration von LE 010 nach Zugabe von 1,5 Moläquivalenten Aptamer. Zu aufgereinigtem LE 010 wurde 1,5 moläquivalent Aptamer in TBSCa hinzugefügt und über eine Superdex 200 (16/60) Säule gefiltriert. In **A** ist das Chromatogramm abgebildet. Zum Vergleich wurde das Chromatogramm des LE 010 ohne Aptamer schattiert in den Hintergrund eingefügt. **B**: Die Fraktionen der Chromatographie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. **C**: Parallel wurde die Präsenz des Aptamers in den Fraktionen mittels nativer PAGE mit anschließender Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen.

Die Eluate im Peakbereich der Gelfiltration wurden gepoolt, konzentriert und im 96-well-Format gescreent. Hierbei fanden sich bei folgenden Bedingungen Kristalle:

14% PEG 400	(3)
0,1 M Na HEPES pH 7,5	
0,2 M CaCl ₂	

15% PEG 4000	(4)
0,1 M Tris HCl pH 8,5	
0,2 M Lithiumsulfat	

10% PEG 8000	(5)
0,05 M Kaliumdihydrogenphosphat	

Die Kristalle wurden am Synchrotron (BESSY II, Berlin) gemessen, jedoch ergab die Messung kein Beugungsmuster.

Als weiterer Ligand wurden ein 5-facher und ein 2-facher molarer Überschuss des Liganden *Bimosiamose* (Revotar AG, Berlin) zugegeben. Mit *Bimosiamose* konnte keine Kristallisationsbedingung gefunden werden.

Es war jedoch möglich, LE 010 bei den in Abschnitt 3.8.2 unter **(2)** genannten Bedingungen zusammen mit dem Tetrasaccharid sialyl Lewis X zu kristallisieren. Dazu wurde ein 5-facher molarer Überschuss von sialyl Lewis X zum Kristallisationsansatz hinzugegeben. Das Kristallwachstum wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Die Kristalle wurden jedoch auch nicht vergrößert und es wurden keine zusätzlichen Kristallisationsbedingungen gefunden. In weiteren Screens wurde, wenn nicht anders angegeben, immer sialyl Lewis X als Ligand zugegeben.

3.8.4 Verbesserung des Kristallwachstums durch Additive

Mit dem Ziel der Verbesserung des Kristallwachstums wurde ein „*Additive Screen*“ (Hampton Research) mit LE 010 und den unter (2) genannten Kristallisationsbedingungen durchgeführt. Dabei wurden einige Additive gefunden, mit denen es ebenfalls möglich war, LE 010 zu kristallisieren (1 % (v/v) Additiv pro Tropfen):

0,1 M Taurin	0,1 M Betain Hydrochlorid	(6)
0,1 M Spermidin	0,1 M Sarcosin	
0,1 M Trimethylamin HCl	0,5 M Natriumfluorid	
0,1 M Urea	0,1 M EDTA	
10 % PEG3350	12 % (w/v) Inositol	
30 % (w/v) Trehalose	0,15 M Cymal-7	
30 % Dioxan	30 % Ethanol	
0,1 M Praseodym (III) Acetat		

Mit ausgewählten Additiven, die zu größeren Kristallen geführt hatten, wurden *Fine Screens* angesetzt, bei denen jeweils die PEG 4000-Konzentration variiert wurde. Zusätzlich wurde eine Reihe von Alkoholen getestet (s. Abschn. 5.8.1). Einzig durch Zugabe von Praseodym (III) Acetat

konnte das Kristallwachstum erfolgreich verbessert werden (**Abb. 48**). Die Kristalle waren deutlich größer und konnten zur Röntgendiffraktionsmessung verwendet werden.

Neben der Zugabe von Liganden und Additiven wurde noch eine reduktive Methylierung und eine *in situ* Proteolyse mit α -Chymotrypsin versucht. Diese beiden Methoden führten jedoch nicht zu Kristallen.



Abb. 48: Mikroskopisches Bild der Kristalle von LE 010. Die Kristalle waren zusammen mit sLeX unter den unter (2) genannten Bedingungen und Zugabe des Additivs Praseodym (III) Acetat erhalten worden.

3.9 Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten

Die erhaltenen Kristalle wurden von Dr. rer. nat. Ardeschir Vahedi-Faridi hausintern am Institut für Kristallographie (AG Prof. Saenger, FU Berlin), am Synchrotron BESSYII in Berlin oder am Synchrotron ESRF in Grenoble gemessen. Die Kristalle aus den initialen Screens (**Abb. 46**) erzeugten erfolgreich ein Röntgenbeugungsmuster, jedoch mit einer geringen Auflösung von ~ 14 Å. Nach Verfeinerung der Kristalle durch Zugabe von Praseodym (III) Acetat und sialyl Lewis X konnte die Auflösung des Beugungsmusters auf ~ 7 Å verbessert werden (**Abb. 49**). Die besten Daten konnten an der „*Microfocus beamline ID23-2*“ des Synchrotrons ESRF in Grenoble gemessen werden.

Es konnte ermittelt werden, dass es sich um eine tetragonale Raumgruppe $P4_32_12$ mit einem Solventgehalt von 61.7 % handelte, welcher auf zwei L-Selektin-Moleküle in der asymmetrischen Einheit hinwies. Die Zellparameter waren $a = 126,38$ Å; $b = 126,38$ Å und $c = 72,31$ Å. Die Beugungsmuster hatten eine maximale Auflösung von 6.46 Å mit einem gemittelten R_{sym} von 11.8 % (**Tabelle 1**).

Es konnte für die vorliegende Arbeit keine Methode gefunden werden, die zu einer weiteren Verbesserung der Auflösung des Beugungsmusters führte. Während dieser Versuche wurden Kristallstrukturdaten von nativem L-Selektin (Lektin-EGF), ohne gebundenen Liganden, in die *RCSB PDB* Datenbank eingepflegt (Mehta and McEver, 2008).

Da die Struktur des freien L-Selektin (Lektin-EGF) nun bekannt war, wurde ein Versuch unternommen, mittels molekularen Ersatzes trotz der niedrigen Auflösung die Struktur des LE-sLeX-Komplexes zu bestimmen. Als Suchmodell dienten die Koordinaten des freien L-Selektins (PDB Code 3CFW). Die Rotations- und Translationssuche ergab sich stark absetzende Lösungen mit einem Z-score von 7,9. Eine Verfeinerung nach der Methode der maximalen Wahrscheinlichkeit resultierte in einem R-Wert von 41,1 % (Freier R-Wert 44,7 %). In der anschließend dargestellten Elektronendichte konnten jedoch keine strukturellen Details wie Seitenkettenorientierung oder genaue Position und Orientierung des Liganden aufgelöst werden.

Tabelle 1: Datensammlung und Raumgruppenstatistik

Raumgruppe	P4 ₃ 2 ₁ 2
Moleküle in der asymmetrischen Einheit	2
Zelldimensionen η^*	
a, b, c (Å)	126.38, 126.38, 72.31
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Auflösung (Å)	50 – 6.46
R_{sym} oder R_{merge}	0.118 (0.668) *
σ	13.11 (1.55) *
Vollständigkeit (%)	92.3 (76.7) *
Redundanz	5.8 (3.4) *
*Die höchste Auflösung ist jeweils in Klammern angegeben	

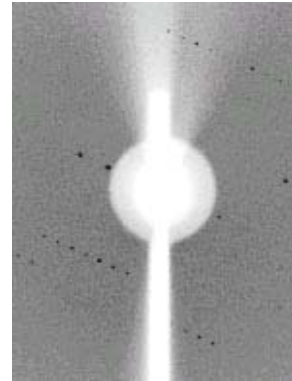


Abb. 49:
Röntgenbeugungsmuster.
 Ausschnitt des Röntgenbeugungsmusters von LE 010, das unter Zugabe von sLeX und Praseodym (III) Acetat kristallisiert worden war.

3.10 Untersuchung der Struktur und Stabilität von LE 010 mittels CD-Spektroskopie

Aufgereinigtes LE 010, das zur Kristallisation eingesetzt wurde, wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Dabei wurde die Meßküvette mithilfe eines Thermostats stufenweise von 5 °C auf 70 °C erwärmt, um die Stabilität und thermische Denaturierung des Proteins zu verfolgen. In **Abb. 50** sind die Spektren bei Temperaturen von 5 °C bis 70 °C zusammengestellt.

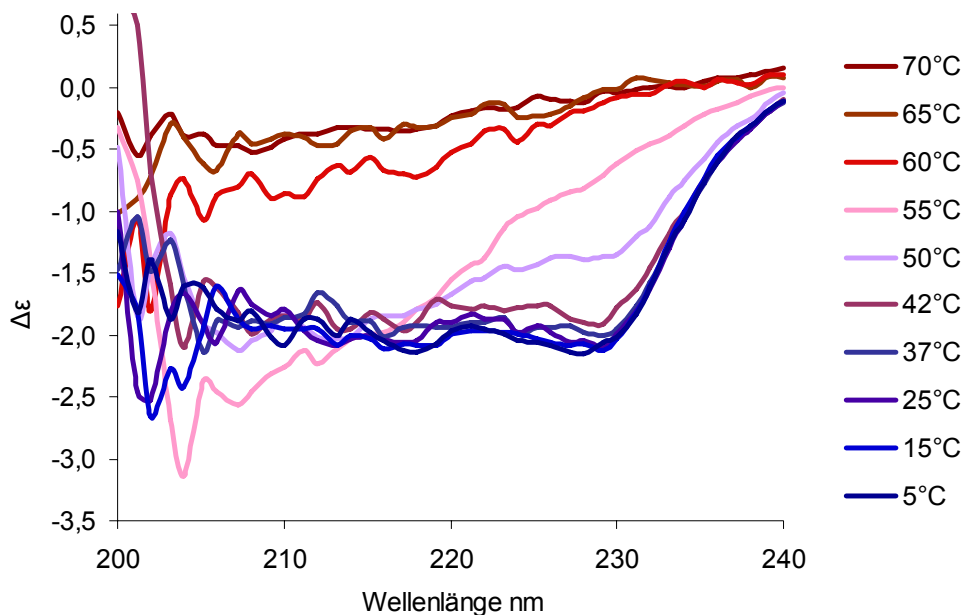


Abb. 50: CD-Spektren von LE 010 bei verschiedenen Temperaturen. Dargestellt ist der Verlauf der $\Delta\epsilon$ im Bereich von 200 bis 240 nm. Die Probe wurde bei den in der Legende angegebenen Temperaturen in TBSCa-Puffer pH 7, gemessen.

Durch Dekonvolution der Spektren mithilfe des Programms „K2D2“ (Perez-Iratxeta and Andrade-Navarro, 2008) wurde der Gehalt an α -Helices und β -Faltblattstrukturen bestimmt. In **Tabelle 2** wurden die dabei erhaltenen Werte aufgelistet. Die Werte für 15 °C und 25 °C wurden nicht aufgeführt, da sie sich nicht von den Werten bei 5 °C und 37 °C unterschieden. Für den Temperaturbereich von 5-37 °C wurde ein Gehalt α -helikaler Struktur von 18 % und ein Gehalt von β -Faltblattstrukturen von 31,28 % ermittelt. Ab 42 °C nahm der Gehalt α -helikaler Strukturen ab, bis schließlich ab 65 °C keine Veränderung mehr stattfand. Nach der Erhitzung war das Protein denaturiert und bildete einen dichten flockigen Niederschlag in der Küvette. Es konnte nach dieser Aggregation nicht renaturiert werden.

Tabelle 2: Anteile von α -Helices und β -Faltblattstrukturen von LE 010. Die Werte wurden bei verschiedenen Temperaturen durch CD-Spektroskopie bestimmt.

Temperatur (°C)	5	37	42	50	55	60	65	70
α -Helix (%)	18	18	10	11,44	6,45	1,76	4,44	4,44
β -Faltblatt (%)	31,28	31,28	40,55	34,26	40,35	47,42	44,17	44,17

In diesem Versuch wurde also der Beginn der thermischen Denaturierung ab 42 °C bestimmt. Nach vollständiger Denaturierung ab 65 °C fiel LE 010 aus der Lösung aus. Der mittels CD-Spektroskopie bestimmte Gehalt an α -Helices und β -Faltblattstrukturen der L-Selektin Variante LE 010 ist jenen der Kristallstruktur sehr ähnlich. Für die Kristallstruktur von L-Selektin (Lektin-EGF wt) wurden 14 % α -Helices und 32 % β -Faltblattstrukturen angegeben (Mehta and McEver, 2008).

3.11 Expression von L-Selektin (LE) in CHO *lec1* Zellen

Analog zu den Angaben in der Datenbank (RCSB PDB #3CFW) wurde versucht, L-Selektin LE ebenfalls in der mutanten CHO-Zelllinie *lec1* zu exprimieren. Diese Zelllinie ist defizient in der *N*-Acetylglucosaminyltransferase I, wodurch Glykoproteine mit einfacheren, mannosereichen *N*-Glykanen ausgestattet werden. Zunächst wurde die Variante LE 111 in CHO *lec1* Zellen transfiziert. In kleinem Maßstab konnte keine Expression detektiert werden. Daher wurde in einem Pilotversuch die Menge LE 111, die aus einem Gesamtkulturvolumen von 1,5 Litern gewonnen werden kann, bestimmt.

Die CHO *lec1* Zellen wachsen im Gegensatz zu den HEK293F-Zellen adhärent. 3 Tage nach der Transfektion wurde das Kulturmedium geerntet und mittels AAC aufgereinigt. Fraktionen der Aufreinigung wurden nach SDS-PAGE durch Silberfärbung bzw. Western Blot analysiert (**Abb. 51**). In der verdünnten Eluatfraktion konnte LE 111 nicht nachgewiesen werden. In der konzentrierten Eluatfraktion hingegen wurden 3-4 Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von ~19-26 kDa im Western Blot nachgewiesen. Auch in CHO *lec1* Zellen werden offenbar verschiedene Glykosylierungsstufen exprimiert. Nach Proteinbestimmung des Eluates wurde die Expressionsrate von LE 111 in diesem System zu ~8 μ g/L berechnet. Diese Expressionsrate ist viel zu niedrig, um damit genügend Protein für die Kristallisation zu exprimieren. Daher wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

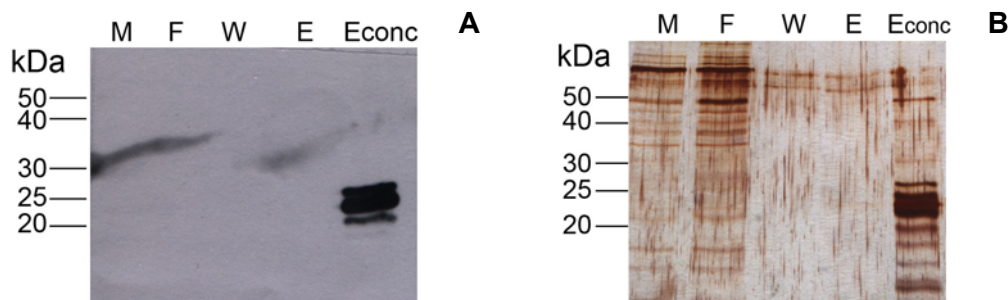


Abb. 51: Expression von LE111 in CHO *lec1* Zellen. CHO *lec1* Zellen wurden in 3 Hyperflask ausgesät und mit LE111 transfiziert. 3 Tage nach Transfektion wurde der Kulturüberstand geerntet, vereinigt und über AAC aufgereinigt. Fraktionen der Aufreinigung wurden mittels 13% SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF geblottet und mit dem polyklonalen sL-Selektin Antikörper detektiert. **B:** Dieselben Fraktionen wie in A wurden auf einem anderen Gel silbergefärbt. M: Medium, F: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: Eluat, Econc: konzentriertes Eluat.

Bereits bei den CHO-Zellen, die in Abschn. 3.3.1 der vorliegenden Arbeit benutzt wurden, konnte L-Selektin nur als IgG-Fusionsprotein in nennenswerten Mengen exprimiert werden. Daher wurde ein Lektin-EGF-IgG-Fusionsprotein konstruiert, das eine Thrombinschnittstelle zwischen der EGF-Domäne und dem IgG besitzt, damit der IgG-Teil nach der Aufreinigung abgespalten werden kann („LEThrlgG“). Dieses Konstrukt wurde in CHO *lec1* Zellen transfiziert. Anschließend wurden erfolgreich transfizierte Zellen mit G418 selektiert und durch Verdünnung in 96well-Platten klonal vermehrt. Die Kulturüberstände verschiedener Klone wurden nach einer Woche mittels *Dot Blot* auf Proteinexpression getestet und der Klon mit dem stärksten Signal ausgewählt (o. Abb.). Um die optimale Zelldichte und den Zeitverlauf der Expression zu bestimmen, wurde der CHO *lec1* Klon 3B5 in vier verschiedenen Zelldichten ausgesät und über 10 Tage täglich eine Probe des Kulturüberstandes entnommen. Aus den so gewonnenen Kulturüberständen wurde mittels sL-Selektin-ELISA die L-Selektin-Konzentration bestimmt (**Abb. 52**).

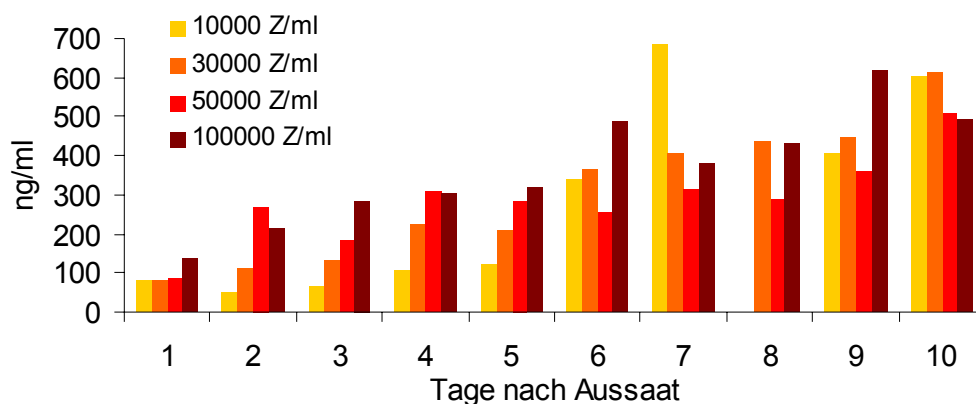


Abb. 52: Zeitverlauf der Expression von LEThrlgG in CHO *lec1* Zellen. 1-10 Tage nach Aussaat in 4 verschiedenen, in der Legende angegebenen Zellkonzentrationen wurden die Werte mit dem sL-Selektin-ELISA aus dem Kulturüberstand gemessen.

In **Abb. 52** ist zu erkennen, dass die Konzentration von LEThrIgG im Kulturüberstand über die untersuchten 10 Tage mit leichten Schwankungen langsam und stetig anstieg. Dabei waren die jeweils höchsten Werte auch zumeist bei der höchsten Zelldichte von 1×10^5 Z/ml zu finden. An Tag 10 wurden die höchsten Konzentrationen bei 1×10^4 Z/ml mit 603 ng/ml und bei 3×10^4 Z/ml mit 613 ng/ml gemessen. Aus diesen Messungen lässt sich nun nicht sagen, wie lange die Expression noch fortschreiten wird, da keine Abnahme der Konzentration im Kulturmedium festgestellt werden konnte. Die Kultur sollte somit mindestens 10 Tage Zeit zur Expression bekommen. Eine Expressionsrate von $\sim 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ ist allerdings sehr gering.

Um zu testen, wie viel LEThrIgG aus einer *Hyperflask* (500 ml Volumen bei 1720 cm^2 Wachstumsfläche) zu erhalten ist, und ob das aufgereinigte Protein bindungsaktiv ist, wurden 1×10^5 Z/ml in eine *Hyperflask* ausgesät und 10 Tage inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand geerntet und mittels Protein A-Sepharose aufgereinigt. Das Eluat wurde in zwei Teile geteilt und parallel über die sTyr/sLeX-Säule und mittels AAC aufgereinigt. Fraktionen dieser Aufreinigungen wurden in der SDS-PAGE analysiert (**Abb. 53**)

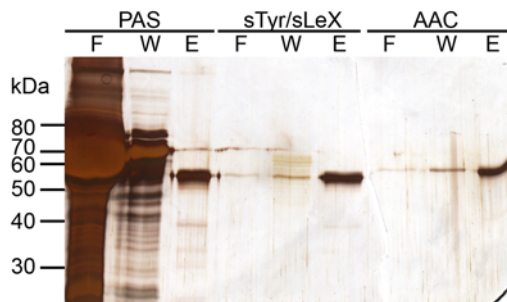


Abb. 53: Reinigung von LEThrIgG aus CHO *lec1* Zellen an Protein A Sepharose, sTyr/sLeX und AAC. CHO *lec1* Zellen wurden 10 Tage in einer Dichte von 1×10^5 Z/ml in einer *Hyperflask* kultiviert und anschließend über Protein A Sepharose aufgereinigt (PAS). Das PAS-Eluat wurde geteilt und parallel über sTyr/sLeX-PAA-Sepharose oder durch AAC aufgereinigt. Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt.

Im Durchfluss und der Waschfraktion der Protein A Sepharose-Säule ist auf dem Gel eine prominente Bande im Bereich von ~ 60 kDa zu sehen, die charakteristisch für Rinderserum-Albumin ist, das von dem fötalen Kälberserum stammt, mit dem das Kulturmedium supplementiert ist. Die Eluatfraktion der Protein A-Säule zeigt hingegen eine relativ saubere einzelne Bande bei ca. 55 kDa. Diese wurde ebenfalls in den Eluatfraktionen der sTyr/sLeX-Säule, sowie auch der AAC nachgewiesen. Somit muss es sich hierbei um LEThrIgG handeln, da es Calcium-abhängig sowohl an die sTyr/sLeX-Säule als auch an das L-Selektin-Aptamer in der AAC bindet.

Die in CHO *lec1*-Zellen exprimierte Form von L-Selektin ist somit bindungsaktiv und zeigt auf dem Gel nur eine einzelne Bande. Die Eluate wurden konzentriert und umgepuffert. Anschließend wurde die Ausbeute nach Proteinbestimmung berechnet. Demnach können aus 500 ml Kulturüberstand nur etwa $10 \mu\text{g}$ LEThrIgG erhalten werden. Diese Menge würde durch einen nachfolgenden Thrombinverdau und erneute Aufreinigung weiter reduziert werden. Diese Ausbeute ist viel zu gering, um auf diese Weise Protein für die Kristallisation zu produzieren.

Es war somit nicht möglich, aus CHO *lec1*- Zellen genügend Material für die Kristallisation zu gewinnen. Sowohl ungetaggetes LE als auch ein Fusionsprotein mit dem humanen IgG Fc-Teil wurden zu schwach exprimiert.

3.12 Expression von L-Selektin Multimeren

Im Zuge der Untersuchungen an verschiedenen Expressionssystemen konnte mit dem modifizierten HEK293*Freestyle*-Expressionssystem eine Methode etabliert werden, mit der L-Selektin-Varianten unter serumfreien Bedingungen exprimiert werden können.

Rekombinantes lösliches L-Selektin kommt als therapeutisches Protein in Frage, da es als kompetitiver Inhibitor für die L-Selektin-Ligandbindung und somit als Inhibitor für die Leukozytenadhäsion eingesetzt werden könnte. Frühere Untersuchungen zeigten bereits die Fähigkeit von löslichem natürlichen oder rekombinatem L-Selektin, die Leukozytenadhäsion zu inhibieren (Schleiffenbaum *et al.*, 1992) (Ley *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1991).

Die Selektin-Ligandbindung ist gemäß ihrer Funktion, das Leukozytenrollen auf dem Endothel zu vermitteln, schnell und transient. Sie wird jedoch verstärkt durch die multimerisierte Anordnung von Rezeptor- und Ligandmolekülen. Auf der Seite der Liganden werden Glykan-Epitope muzinartiger L-Selektin-Liganden multimerisiert präsentiert (Maaheimo *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite liegt L-Selektin selbst geclustert auf den Spitzen der Mikrovilli der Leukozyten vor (Picker *et al.*, 1991). Daher liegt es nahe, rekombinantes L-Selektin ebenfalls in einer multimerisierten Form zu konstruieren, um die natürliche Bündelung nachzuahmen und eine eventuelle Bindungsverstärkung gegenüber dem Monomer zu erzielen.

Mit der His-getaggten L-Selektin Variante LEHis lag bereits zum Vergleich das Monomer vor. Das ebenso klonierte und exprimierte Fusionskonstrukt von LE mit dem Fc-Teil des humanen IgG (LEIgG) liegt durch Disulfidbrückenbindung in der *hinge*-Region des Fc-Teils als Dimer vor (vgl. Abschn. 3.3.2). Zusätzlich wurde eine LE-Variante konstruiert, das durch Fusion mit der *coiled-coil*-Domäne von humanem COMP (*C*artilage *o*ligomeric *m*atrix *p*rotein) pentamerisieren sollte („LECOMP“). Eine weitere LE-Variante wurde als Fusion mit humanem IgM konstruiert, wodurch es als Decamer vorliegen sollte („LEIgM“). Diese Konstrukte wurden His-getaggt kloniert und in HEK293F-Zellen exprimiert. Der Kulturüberstand wurde über die AAC aufgereinigt und die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (**Abb. 54**).

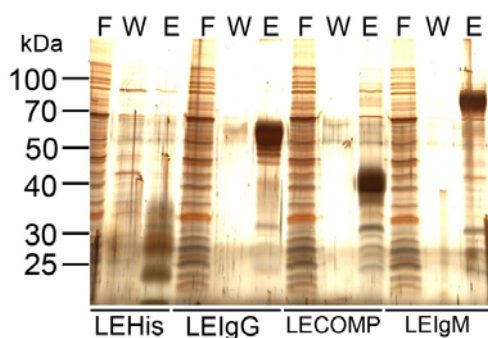


Abb. 54: AAC-Aufreinigung von LEHis (Monomer), LEIgG (dimer), LECOMP (pentamer) und LEIgM (decamer) aus Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen. Fraktionen der AAC wurden mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und silbergefärbt. F: Durchlauf, W: Waschfraktion, E: je 1 µg konzentriertes Protein der Eluatfraktion.

In den konzentrierten Eluaten, die nach Auftrennung auf dem Gel in **Abb. 54** zu sehen sind, konnten Proteinbanden in der jeweils erwarteten Größe nachgewiesen werden. Die vier Proteinbanden von LEHis zeigen sich wie zuvor mit einem apparenten Molekulargewicht von ~19-

32 kDa. Auch LEIgG war zuvor bereits in HEK293F-Zellen exprimiert worden und kann bei ~60 kDa im reduzierten Zustand detektiert werden. Die prominente Bande ist in der Spur von LECOMP bei ~40 kDa zu finden. Das errechnete Molekulargewicht von LECOMP beträgt reduziert als Monomer und ohne Glykananteil 27,8 kDa. Zusammen mit der bei anderen LE-Varianten beobachteten Molekulargewichtserhöhung von etwa 4,2 kDa pro Glykan ergeben sich ~40 kDa für das dreifach glykosylierte Protein. Dies korreliert mit der Bande auf dem Gel in **Abb. 54**. Für LEIgM wird im reduzierten Zustand inklusive aller Glykane ein Molekulargewicht von ~87 kDa erwartet, welches sich ebenfalls durch die SDS-PAGE bestätigen ließ. Die multimerisierten Formen von LE konnten somit erfolgreich in HEK293F-Zellen exprimiert und mittels AAC aufgereinigt werden.

In einem nächsten Schritt wurde die Bindungsfähigkeit der multimerisierten LE-Varianten untersucht. Dazu wurden die Eluate der AAC über die sTyr/sLeX-Säule aufgereinigt und durch EDTA-Zugabe eluiert. So läßt sich erkennen, ob die Varianten Calcium-abhängig an ihren Liganden binden. Fraktionen dieses Bindungstests wurden im Western Blot analysiert. Außerdem wurden die Eluate unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt, um eine Multimerisierung zu zeigen.

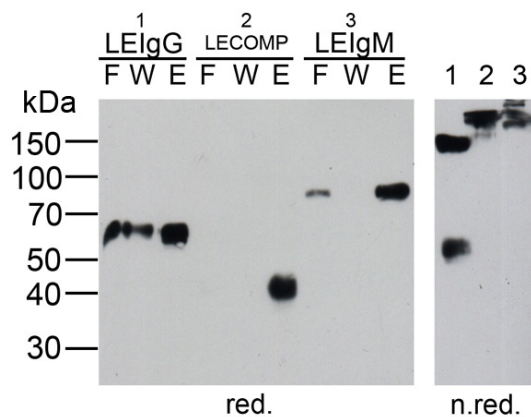


Abb. 55: Bindungstest von LE Multimeren an die sTyr/sLeX-Säule. Konzentriertes umgepuffertes Eluat der AAC- Aufreinigung (s. Abb. 54) wurde über die sTyr/sLeX-Säule gegeben, gewaschen und durch EDTA eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt dem polyklonalen anti-sL-Selektin Antikörper im Western Blot detektiert. Das sTyr/sLeX-Eluat wurde reduzierend (red.) und nichtreduzierend (n. red) aufgetragen.

Auf dem Western Blot in **Abb. 55** sind Fraktionen des Bindungstest an sTyr/sLeX der multimerisierten LE-Varianten LEIgG, LECOMP und LEIgM zu sehen. Es konnten in den Eluatfraktionen aller drei Varianten Proteinbanden mit dem anti-L-Selektin Antikörper detektiert werden. Die detektierten Banden befinden sich auf gleicher Höhe wie die prominenten Banden auf dem silbergefärbten Gel in **Abb. 54**. Alle drei Varianten binden somit an die Ligandenaffinitätsmatrix und die Bindung ist durch Chelatieren der Calcium-Ionen durch EDTA wieder auflösbar. Auf der rechten Seite der **Abb. 55** sind die drei Eluate unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteinbanden, die durch den Antikörper detektiert werden, befinden sich nun am oberen Rand des Gels und sind somit nicht mehr eindeutig mit dem Molekulargewichtsmarker zu vergleichen. Dennoch ist zu sehen, dass die Varianten offensichtlich Multimere bilden. Das Dimer des LEIgG läuft im nichtreduzierenden SDS-Gel bei ~120 kDa und zeigt noch eine weitere Bande im Bereich der Monomeren Form. Bei LECOMP und LEIgM ist im Western Blot kein Signal auf der Höhe der jeweiligen reduzierten Form detektiert worden. Offenbar liegen bei der dimerisierten Form des LEIgG noch monomere Formen vor, was bei dem Pentamer und dem Decamer nicht der Fall ist.

Die multimerisierten LE-Varianten wurden anschließend mittels

Oberflächenplasmonresonanz untersucht. LEHis, LEIgG und LECOMP wurden dafür über einen BIAcore-Chip geleitet, auf dem sTyr/sLeX-PAA immobilisiert war. LEIgM konnte wegen zu geringer Ausbeuten nicht eingesetzt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Konstrukte können keine direkt vergleichenden Bindungsstudien durchgeführt werden. Daher wurden lediglich die Charakteristika der Bindungssignale der verschiedenen Formen dargestellt (**Abb. 56**). In **Abb. 56** ist zu sehen, dass das Signal der multimerisierten L-Selektin Varianten jene des Monomers bei Weitem überstiegen. Auffällig ist dabei, dass die maximale Intensität des Signals bei der pentamerisierten Form geringer war als bei der dimerisierten Form. Da das Pentamer ein höheres Molekulargewicht besitzt und außerdem einen höheren Multimerisierungsgrad aufweist, würde man bei diesem ein stärkeres Signal erwarten. Offenbar gibt es somit Eigenschaften des Dimers, die die Bindung stärker begünstigen als die der pentamerisierten Variante. Im Vergleich zum Fc-Teil des humanen IgG, mit dem die Dimerisierung erfolgt ist, ist die *coiled-coil*-Domäne des humanen COMP relativ klein. Vielleicht gibt es daher bei der COMP-Chimäre eine gegenseitige sterische Hinderung der Lektin- und EGF-Domänen des L-Selektins.

Des Weiteren ist zu beobachten, dass das Bindungssignal bei den multimerisierten Varianten nach Ende der Injektionsphase nicht direkt wieder das Grundsignal erreicht, wie es beim Monomer der Fall ist (vgl. **Abb. 59**). Durch abwechselnde Bindung und Lösen von Bindungen benachbarter Domänen innerhalb eines Moleküls kann offenbar eine stabilere Bindung aufrechterhalten werden. Während das Pentamer bei einer Konzentration von 1 μM bereits eine Plateauphase erreicht, wird diese bei der dimerisierten Form innerhalb des gewählten Zeitfensters nicht erreicht. Außerdem scheint die Assoziationsgeschwindigkeit von LEIgG ist geringer als jene von LECOMP zu sein, was aus dem flacheren Kurvenverlauf in der Assoziationsphase zu schließen ist.

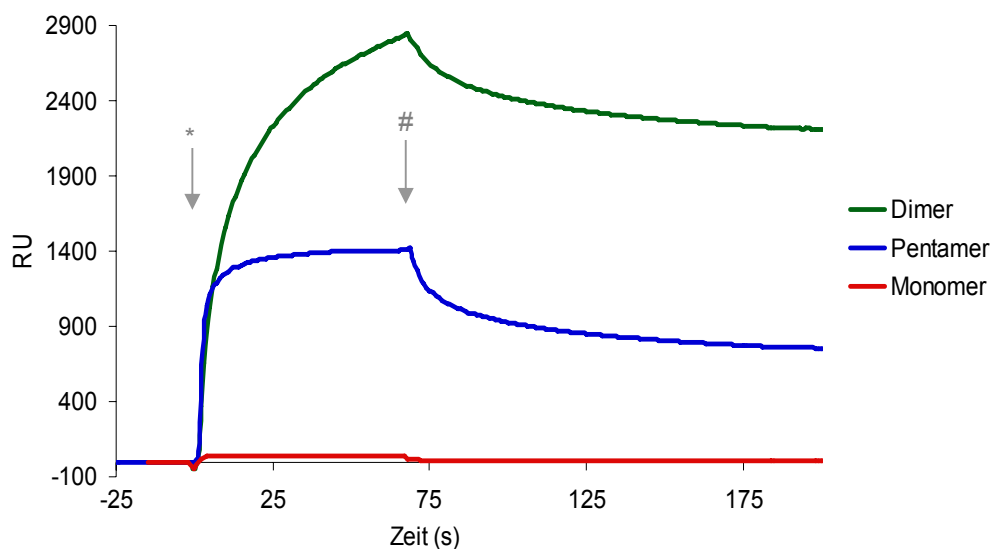


Abb. 56: Sensorgramme der Bindung von monomerem, dimerem und pentamerem L-Selektin an sTyr/sLeX-PAA. Proteinlösungen wurden zu 1 μM bei 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Chip gegeben, auf dem in Flusszelle 2 sTyr/sLeX-PAA und in Flusszelle 1 als Kontrolle LacNac-PAA immobilisiert war. Die Bindungskurven sind Resultierende aus dem Bindungssignal der Flusszelle 2 abzüglich des Signals der Flusszelle 1. Die Signalintensität kann wegen unterschiedlicher Molekulargewichte nicht verglichen werden. Doch zeigt das kleinere Dimer (LEIgG) eine höhere Signalintensität als das Pentamer (LECOMPHis). *: Start der Injektion, #: Ende der Injektion

Diese multimerisierten L-Selektin Varianten stehen nun für weiterführende Untersuchungen in Flusskammer-Assays zur Verfügung, wo sie als Inhibitoren des L-Selektin-vermittelten Rollens untersucht werden können.

3.13 Charakterisierung der LEHis Glykosylierungsmutanten

3.13.1 Expression und Aufreinigung von LEHis Glykosylierungsmutanten

Die acht LEHis Glykosylierungsmutanten (siehe **Abb. 30**) wurden in HEK293F-Zellen transfiziert und nach 3 Tagen Expression aus dem Kulturüberstand durch Ni-NTA-Chromatographie und AAC aufgereinigt. Fraktionen der Aufreinigungen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (**Abb. 57**).

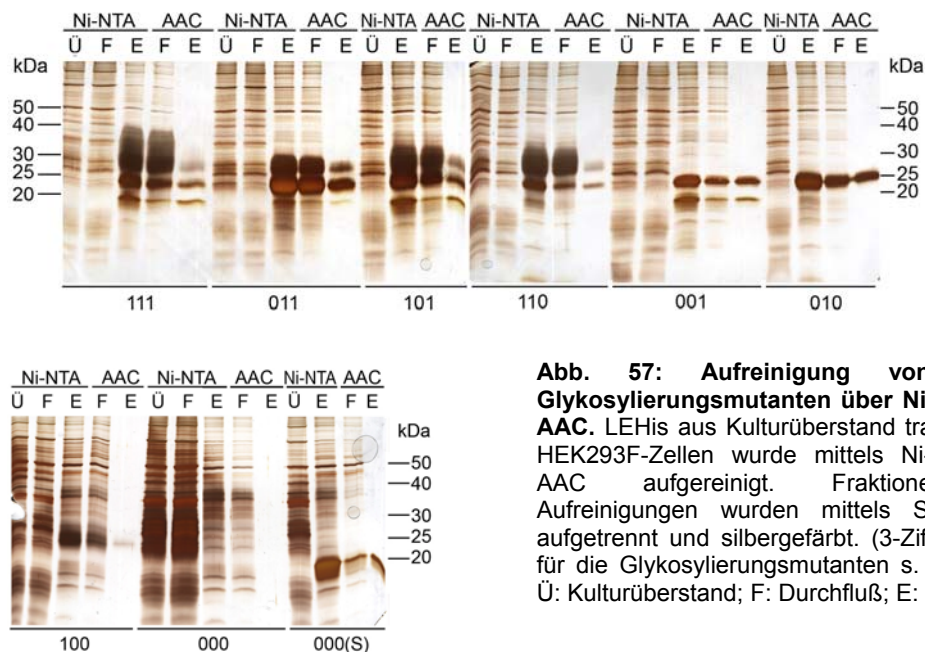


Abb. 57: Aufreinigung von LEHis Glykosylierungsmutanten über Ni-NTA und AAC. LEHis aus Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen wurde mittels Ni-NTA und AAC aufgereinigt. Fraktionen der Aufreinigungen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. (3-Ziffern Code für die Glykosylierungsmutanten s. **Abb. 30**). Ü: Kulturüberstand; F: Durchfluß; E: Eluat

Bei LEHis 111 sind im Ni-NTA-Eluat deutlich die vier Proteinbanden zu sehen, die die vier Glykosylierungsstufen von LEHis repräsentieren. Im Durchlauf der AAC-Säule ist eine große Proteinmenge nachweisbar, das in diesem Falle von der zu geringen Kapazität der verwendeten AAC-Matrix herrührt. Wegen zu geringer Konzentration ist daher die Bande für die dreifach glykosylierte Form in der Eluatfraktion kaum zu sehen. In **Abb. 21** waren bereits alle vier LEHis-Glykosylierungsstufen im AAC-Eluat einer Säule mit höherer Kapazität nachgewiesen worden. Alle Glykosylierungsmutanten konnten in den Eluatfraktionen mit ihrem bereits in Abschnitt 3.5.3 beschriebenen charakteristischen Bandenmuster nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildet dabei die Mutante 000, die nicht in den Überstand sekretiert wird. Daher wurde hier die sekretierbare

Mutante 000(S) aufgereinigt (vgl. 3.5.3). Auch LEHis 000(S) ließ sich nach Ni-NTA und AAC-Reinigung in der Eluatfraktion nachweisen.

3.13.2 Sekretion von LEHis Glykosylierungsmutanten

Die 8 verschiedenen Glykosylierungsvarianten wurden in 6-well-Schalen parallel in HEK293F-Zellen transfiziert. Nach 3 Tagen wurde die Konzentration von rekombinantem Protein mittels sL-Selektin-ELISA aus dem Kulturüberstand bestimmt. Da die Mutante LEHis 000 nicht in den Überstand sekretiert wird, wurde stattdessen die Mutante LEHis 000(S) (vgl. Abschn. 3.5.3) verwendet.

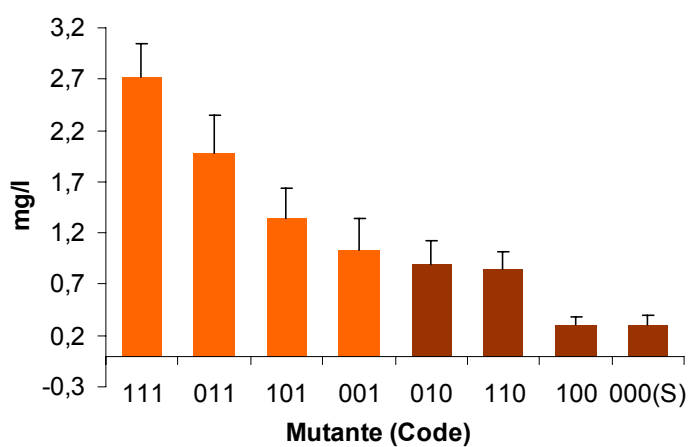


Abb. 58: Sekretion von LEHis Glykosylierungsmutanten. Werte wurden aus 5 unabhängigen Versuchen im 6-well Maßstab mittels sL-Selektin-ELISA aus dem Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen bestimmt. Es wurden von 5 unabhängigen Ansätzen die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes gebildet.

In **Abb. 58** sind die mittleren Konzentrationen von LEHis Glykosylierungsmutanten im Kulturüberstand transfizierter Zellen dargestellt. Die gemessenen Werte lagen zwischen 0,3 mg/L und 2,72 mg/L. Die Werte wurden in der Grafik in abfallender Reihenfolge sortiert. Bemerkenswert hierbei ist, dass die Sekretionsrate nicht mit der bloßen Anzahl der Glykane steigt. Die zweifach glykosylierte Variante 110 zum Beispiel wird schwächer sekretiert als die einfach glykosylierten Varianten 001 und 010. Vielmehr werden die vier Mutanten, die in der dritten Position (**N139**) ein Glykan tragen (111, 011, 101, 001; in der Grafik orange gefärbt) stärker sekretiert als die anderen vier, die in der dritten Position mutiert wurden und daher dort kein Glykan tragen (010, 110, 100, 000(S); in der Grafik braun gefärbt). Von diesen vier Mutanten werden jeweils jene stärker exprimiert, die ein Glykan in der zweiten Position (**N66**) tragen. Somit wird in der „orangenen“ Gruppe 111 und 011 stärker sekretiert als 101 und 001. Ebenso werden in der „braunen“ Gruppe, die Mutanten 010 und 110 stärker sekretiert als 100 und 000(S). Bei den schwächer sekretierten Mutanten (010, 110, 100, 000(S)) auf der rechten Seite der Grafik gibt es kaum einen Unterschied zwischen jenen Mutanten, die sich nur in der Besetzung der ersten Position unterscheiden. In der Gruppe der stärker sekretierten Varianten (111, 011, 101, 001) sind die Unterschiede deutlicher. Hier wird jeweils die Mutante stärker sekretiert, die in der ersten Position (**N22**) ein Glykan besitzt. 111 wird also stärker sekretiert als 011 und 101 wird stärker sekretiert als 001.

Es scheint somit einen Einfluß der Position der Glykane auf die Stärke der Sekretion zu geben. Bei den niedrig exprimierten Varianten konnte kein großer Unterschied bei den Varianten festgestellt werden, bei denen die erste Position mutiert oder intakt war. War in der zweiten und dritten Position hingegen ein Glykan vorhanden, so wurde es stärker sekretiert als die Mutante ohne Glykan an dieser Stelle.

3.13.3 Bindungsaktivität der Glykosylierungsmutanten

Die Bindungsaktivität der LEHis Glykosylierungsmutanten an den Bi-Liganden sTyr/sLeX wurde durch Oberflächenplasmonresonanz im BIAcore-System charakterisiert. Dafür wurden zunächst einige Parameter der Bindung am Beispiel von LEHis 111 an sTyr/sLeX untersucht. Die Konzentration von aufgereinigtem LEHis 111 wurde hierbei mittels sL-Selektin-ELISA bestimmt und auf 1 μ M eingestellt. Diese Proteinlösung wurde über auf dem BIAcore-Chip immobilisiertes sTyr/sLeX-PAA gegeben. In der zweiten Flußzelle war LacdiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc)-PAA als Referenz immobilisiert. Die in den folgenden Abbildungen gezeigten Sensorgramme sind die resultierenden Kurven aus dem Bindungssignal in der ersten Flusszelle abzüglich des unspezifischen Signals der Referenzzelle.

Zunächst wurde der Einfluß von Calciumionen im Laufpuffer auf das Bindungssignal untersucht. Die Sensorgramme der Messungen wurden in **Abb. 59** zusammengestellt. In dieser Abbildung ist der Zeitpunkt des Injektionsstarts mit einem Stern (*) und der Zeitpunkt des Injektionsendes mit einer Raute (#) markiert. Diese Zeitpunkte gelten auch für die folgenden Diagramme, in denen auf diese Markierung verzichtet wurde.

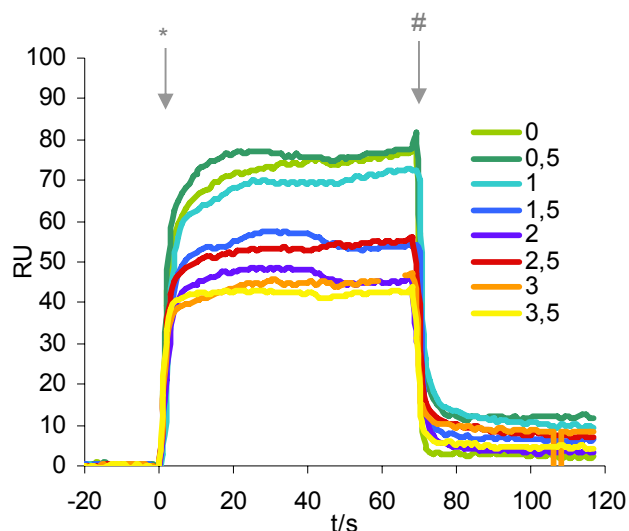


Abb. 59: BIAcore-Sensorgramme der Bindung von LEHis 111 an immobilisiertes sTyr/sLeX-PAA.

Gezeigt sind aus zwei Messungen gemittelte Kurven, resultierend aus dem Signal der Messzelle abzüglich des Signals der Referenzzelle. 35 μ l parallel aufgereinigter LEHis Glykosylierungsmutanten wurden in einer Konzentration von 1 μ M und 30 μ l/min über den Chip geleitet. Der Laufpuffer bestand aus 20 mM Tris HCl pH 7, 150 mM NaCl und 0 bis 3,5 mM CaCl₂ (in der Legende angegeben). Die Dissoziationsphase betrug 120 s (in der Abbildung nicht vollständig wiedergegeben). Die Kurven sind Mittelwerte aus jeweils 2 Messungen.

Zu Beginn der Injektion stiegen die Bindungskurven zunächst sehr steil an, um nach kurzer Zeit als annähernd waagerechte Linie zu verlaufen. Dieses Plateau repräsentiert die Äquilibriumssituation, in der die Assoziationsgeschwindigkeit gleich der Dissoziationsgeschwindigkeit ist. Nach Ende der Injektion wurde eine Dissoziationsphase von 120 Sekunden eingestellt, in der nur

Laufpuffer über den Chip geleitet wurde. Hier kam es zu einem raschen und steilen Abfall der Bindungskurven auf annäherndem Ausgangsniveau. Das bedeutet, dass LEHis mit hohen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten transient bindet und nicht fest am Liganden gebunden verbleibt.

Bei Calciumkonzentrationen von 0 bis 1 mM und 1,5 bis 3,5 mM bildeten die Bindungskurven zwei Bereiche bezüglich der Signalstärke im Äquilibriumbereich. Bei einer höheren Calciumkonzentration als äquimolar erreichten diese Kurven auf ihrem Plateau ca 20 RU weniger. Auch bei einer angegebenen Calciumkonzentration von 0 mM im Laufpuffer ist eine Bindung zu beobachten. Dabei ist zu beachten, dass LEHis 111, das für die Messungen eingesetzt wurde, in TBS mit 2 mM CaCl_2 gelagert war und für die Messung in Laufpuffer mit den verschiedenen Calciumkonzentrationen verdünnt wurde. Dadurch waren bei „0 mM“ ~13 nmol Calciumionen in die Lösung gelangt. Diese haften offenbar an der L-Selektin- Bindungsstelle und ermöglichten so eine Bindung an sTyr/sLeX.

Anschließend wurde die Bindung von LEHis 111 an sTyr/sLeX-PAA bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. In **Abb. 60** sind die Sensorgramme dieser Messungen gezeigt. Bei pH 7 bis 9,5 sind die Bindungskurven sehr ähnlich und zeigen den zuvor beobachteten Verlauf. Bei pH 6,7 allerdings finden wir eine im Äquilibriumsbereich um ca. 55 RU erhöhte Kurve.

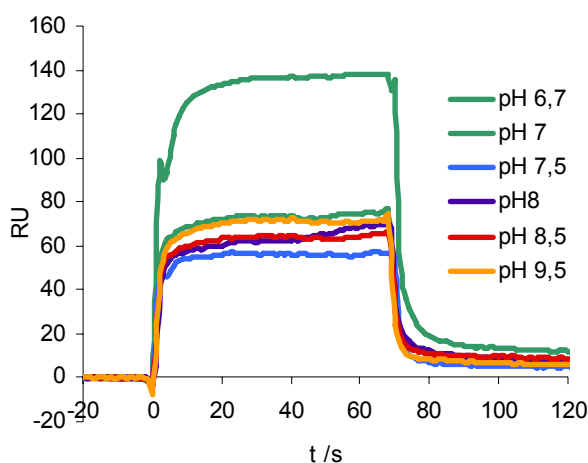


Abb. 60: Sensorgramme der Bindung von 1 μM LEHis 111 an sTyr/sLeX-PAA bei unterschiedlichem pH-Wert im Laufpuffer. Gezeigt sind aus zwei Messungen gemittelte resultierende Kurven abzüglich des Signals der Referenzzelle. Der Laufpuffer bestand aus 20 mM Tris-HCl mit in der Legende angegebenem pH-Wert, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 . Bei einer Flußrate von 30 μl pro Minute wurden 35 μl LEHis injiziert. Die Dissoziationsphase betrug 120 s (in der Abbildung nicht vollständig wiedergegeben).

In diesen ersten Untersuchungen war zu sehen, dass die Bindungskurve sehr schnell ein Plateau erreicht und nach 40 Sekunden bereits keine Veränderung mehr zeigt. Daher wurden in der folgenden Messung aller LEHis-Varianten nur 20 μl injiziert und die Dissoziationsphase auf 60 s verkürzt.

Bei diesen Versuchsbedingungen wurde aufgereinigtes LEHis in allen Mutationsvarianten als Analyt bei pH 7 und 1 mM CaCl_2 über auf dem Chip immobilisiertes sTyr/sLeX-PAA gegeben. In **Abb. 61** sind die verschiedenen Sensorgramme in einer Grafik vereint zu sehen.

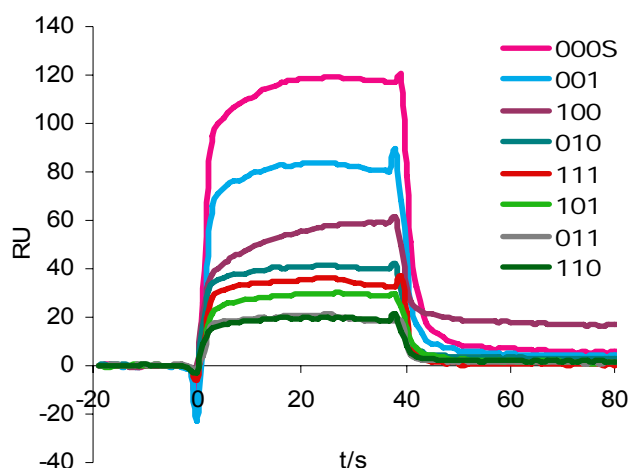


Abb. 61: Sensorgramme der Bindung der LEHis Glykosylierungsmutanten an sTyr/sLeX-PAA. Gezeigt sind aus zwei Messungen gemittelte resultierende Kurven abzüglich des Signals der Referenzzelle. 20 μ l 500 nM LEHis der in der Legende angegebenen Glykoverianten in TBS mit 1 mM CaCl_2 wurde bei 30 μ l/min über den Chip gegeben. Die Dissoziationszeit betrug 60 s. Mit Ausnahme der Mutante 100 waren alle Proteine parallel aufgereinigt worden.

Die Bindungskurve der nicht-glykosylierten Form zeigte die höchste Signalintensität im Plateaubereich, während sich die voll glykosylierte Form im mittleren Bereich befand. Der Kurvenverlauf war bei allen Mutanten ähnlich und wie in den Vorversuchen mit LEHis 111 beschrieben. Die Assoziation sowie auch die Dissoziation verlief sehr schnell, wie am steilen Kurvenverlauf zu Beginn und Ende der Injektionsphase zu erkennen ist. Eine starke langandauernde Bindung, wie es beispielsweise bei einer Antikörperbindung der Fall ist, war nicht zu verzeichnen. Die Mutante 100 stammte aus einer anderen Charge und zeigt direkt nach der Injektion einen etwas flacheren Kurvenverlauf, dafür aber ein höheres Signal in der Dissoziationsphase. Die zweifach glykosylierten Varianten zeigten insgesamt eine schwächere Bindung als die einfach glykosylierten und die nichtglykosylierte Form. Dies korreliert mit den Ergebnissen aus der Heparinchromatographie, bei der die einzelnen Glykoformen von LEHis 111 ebenfalls umso stärker gebunden waren, je weniger Glykane sie besaßen (vgl. **Abb. 23**).

Mit dieser Methode ist eine genauere kinetische Auswertung nicht möglich, da es sich bei den aufgereinigten Proteinen immer um Mischungen von verschiedenen Glykoformen handelt, die unterschiedliche Molekulargewichte haben. Außerdem variierte der Kurvenverlauf mit der durch die jeweiligen Kulturbedingungen und Lagerungszeit unterschiedlichen Zusammensetzung der Glykane. In **Abb. 61** ist dies bei der Mutante LEHis 100 zu erkennen, die aus einer anderen Charge stammte. Es wurde versucht, diesen Effekt durch parallele Expression und Aufreinigung zu minimieren. Da die einzelnen Mutanten jedoch unterschiedlich stark exprimiert wurden (vgl. Abschn. 3.13.2), konnten aus Kapazitätsgründen nicht alle Mutanten parallel aufgereinigt werden.

3.14 Analyse der N-Glykane von LEHis

Mit den Glykosylierungsmutanten von LEHis standen nun drei Varianten von L-Selektin zur Verfügung, welche an jeweils nur einer Stelle glykosyliert sind (100, 010 und 001). Damit ist es möglich, das jeweilige N-Glykan an jeder einzelnen der drei Positionen (N22, N66 und N139) innerhalb der Lektin- und EGF-Domäne zu analysieren und die Unterschiede in der Glykosylierung zu untersuchen. Die einzelnen N-Glykane wurden, soweit möglich, mit denen der wildtypischen Form

von LEHis (111) und von rekombinantem α -1-sauren Glykoprotein (AGP) verglichen. AGP wurde als Fusionsprotein mit dem Fc-Teil des humanen IgG His-getaggt im gleichen Expressionssystem mit den gleichen Methoden exprimiert und aufgereinigt. Durch Vergleich der Glykanstruktur von L-Selektin-Konstrukten mit einem Glykoprotein, das aus derselben Zelllinie mit gleichen Methoden hergestellt wurde, sollte sich feststellen lassen, ob eine bestimmte Struktur vom Zelltyp oder vom Proteinanteil des Glykoproteins beeinflusst wird.

Die in den folgenden Abschnitten zur Illustration verwendeten Symbole und Abkürzungen für die Glykanbausteine sind in **Abb. 62** gezeigt.

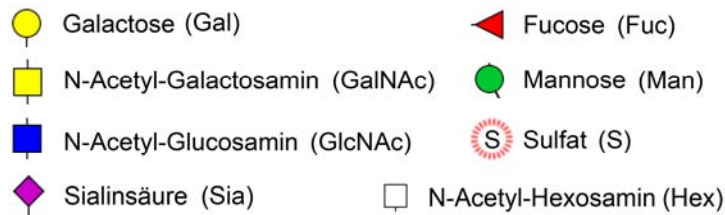


Abb. 62: Schlüssel der verwendeten Symbole und Abkürzungen für die Monosaccharideinheiten

3.14.1 Monosaccharid-Analyse

Zunächst wurden die *N*-Glykane der LEHis-Varianten 100, 010, 001, 111 und AGP durch PNGase F-Verdau abgetrennt und zu Monosaccharideinheiten hydrolysiert. Durch die Monosaccharid-Analyse ist es möglich, die relativen Anteile der verschiedenen Kohlenhydratbausteine zueinander abzuschätzen. Mit der Grundannahme, dass *N*-Glykane die konventionelle Basisstruktur 3 Mannoseeinheiten besitzen, können die erhaltenen Werte zu dieser Basisstruktur in Bezug gesetzt und die jeweiligen Anteile berechnet werden. Das Ergebnis der Monosaccharid-Analyse in **Tabelle 3** dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse der Monosaccharid-Analyse der *N*-Glykane von LEHis und AGP. Dargestellt sind die molaren Verhältnisse der einzelnen Monosaccharid-Bausteine, bezogen auf 3 Mannoseeinheiten der Basisstruktur. Die Werte für die Mutante 001 konnten nicht bestimmt werden.

Protein	Man	GlcNAc	Gal	Fuc	GalNAc
LEHis 100	3,00	4,74	0,51	1,74	2,29
LEHis 010	3,00	5,09	0,75	2,50	2,00
LEHis 111	3,00	4,71	1,13	1,96	1,20
AGP	3,00	4,87	2,07	0,93	0,00

Aus den Daten der **Tabelle 3** läßt sich ersehen, dass bei den LEHis-Varianten *N*-Acetyl-Galactosamin (GalNAc)-Bausteine gefunden wurden. GalNAc-Reste sind unübliche und nicht sehr häufig vorkommende Bausteine für *N*-Glykane, und bei AGP wurden keinerlei GalNAc-Reste gefunden. Alle Mutanten besitzen einen relativ hohen Anteil Fucosereste, die sich in ihrem Anteil innerhalb der Mutanten unterscheiden. Die Mutante 010 ist deutlich stärker fucosyliert als 100 oder 111. Der Anteil der Galactose-Einheiten ist bei den LEHis Mutanten geringer als bei AGP, was dafür

spricht, dass die GalNAc-Reste bei LEHis den Platz der üblicheren Galactose-Einheiten in der Struktur einnehmen. Diese Ergebnisse sind für die Interpretation der Massenspektren wichtig, da bei der Bestimmung der Struktur nun *N*-Acetyl-Galactosamin-Reste mit einbezogen werden müssen.

3.14.2 Massenspektrometrische Untersuchung der *N*-Glykane von LEHis 100, 010, 100, 111 und AGP

Die LEHis Glykosylierungsmutanten und AGP wurden wie beschrieben in HEK293F-Zellen exprimiert und aufgereinigt (s. Abschn. 3.5.3 und 3.13.1). Die *N*-Glykane wurden jeweils mit PNGase F abgespalten und vom Proteinanteil getrennt. Nach Aufreinigung wurden die Glykane entweder permethyliert oder desialyliert. Die Proben wurden am Massenspektrometer im Positiv-Ionen-Modus und im Negativ-Ionen-Modus gemessen. Den gemessenen Masse-zu-Ladungs-Verhältniswerten (m/z) wurden korrespondierende Glykankompositionen zugeordnet. Die wahrscheinlichsten Strukturen wurden nach Verdau mit verschiedenen Exoglykosidasen und erneuten Messungen (Spektren nicht gezeigt) ermittelt. Listen mit den gemessenen Werte und die Daten der Exoglykosidase-Verdaus sind im Anhang zu finden (Abschn. 0).

In **Abb. 63** sind Massenspektren und die korrespondierenden Glykanstrukturen der desialylierten *N*-Glykane von LEHis 100 und 010, gemessen im Positiv-Ionen-Modus gezeigt. Bei den *N*-Glykanstrukturen handelte es sich hauptsächlich um biantennäre *N*-Glykane, die am ersten GlcNAc der Basisstruktur eine („core“)-Fucose trugen. Der Größte Anteil der Glykanstrukturen wurde bei der Mutante 100 von einem biantennären, dreifach fucosylierten Glykan mit einem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) von 2183,8 gebildet. Dieses Glykan war an beiden Antennen terminal mit je einem GalNAc-Rest versehen. Das zweitstärkste Signal mit einem m/z von 2037,8 stammte von einem gleich aufgebauten Glykan, das jedoch nur insgesamt 2 statt 3 Fucosereste besaß.

Im Bereich größerer Massen fanden sich bei der Mutante 100 biantennäre Strukturen, die mit jeweils zwei aufeinander folgenden *N*-Acetyl-Galactosaminresten, gebunden an *N*-Acetyl-Glucosamin, an beiden Antennen versehen sind ($m/z = 2443,9$ und $2589,9$). Diese beiden Strukturen unterscheiden sich nur durch einen antennären Fucoserest. Zu dem m/z von 2548,9 wurden triantennäre Strukturen zugeordnet, die entweder an allen 3 Antennen mit Galactose- oder GalNAc-Resten substituiert sind oder an jeder Antenne zwei aufeinanderfolgende GalNAc-Reste besaßen. Es konnte keinerlei Literatur gefunden werden, in der eine solche Struktur bereits beschrieben wurde. Daher gehen wir davon aus, dass die vorliegenden Ergebnisse die erste Beschreibung von GalNAc-GalNAc-Antennen auf *N*-Glykanen darstellen.

Der größte Anteil der *N*-Glykane von LEHis 010 wurde von Strukturen mit einer m/z von 1996,7 und 2037,8 gebildet. Zu diesen m/z konnten zusammen mit den Ergebnissen aus den Exoglykosidase-Verdaus drei biantennäre Strukturen zugeordnet werden, von denen sich die zwei mit der dem identischen m/z 1996,7 nur durch die Position der Fucose unterschieden. Diese beiden biantennären Glykane besaßen an einer Antenne einen Galactoserest und an der anderen Antenne einen *N*-Acetylgalactosaminrest. Das *N*-Glykan mit dem m/z von 2037,8 trug an beiden Antennen einen GalNAc-Rest und eine Fucose am *N*-Acetyl-Glucosaminrest einer der beiden Antennen.

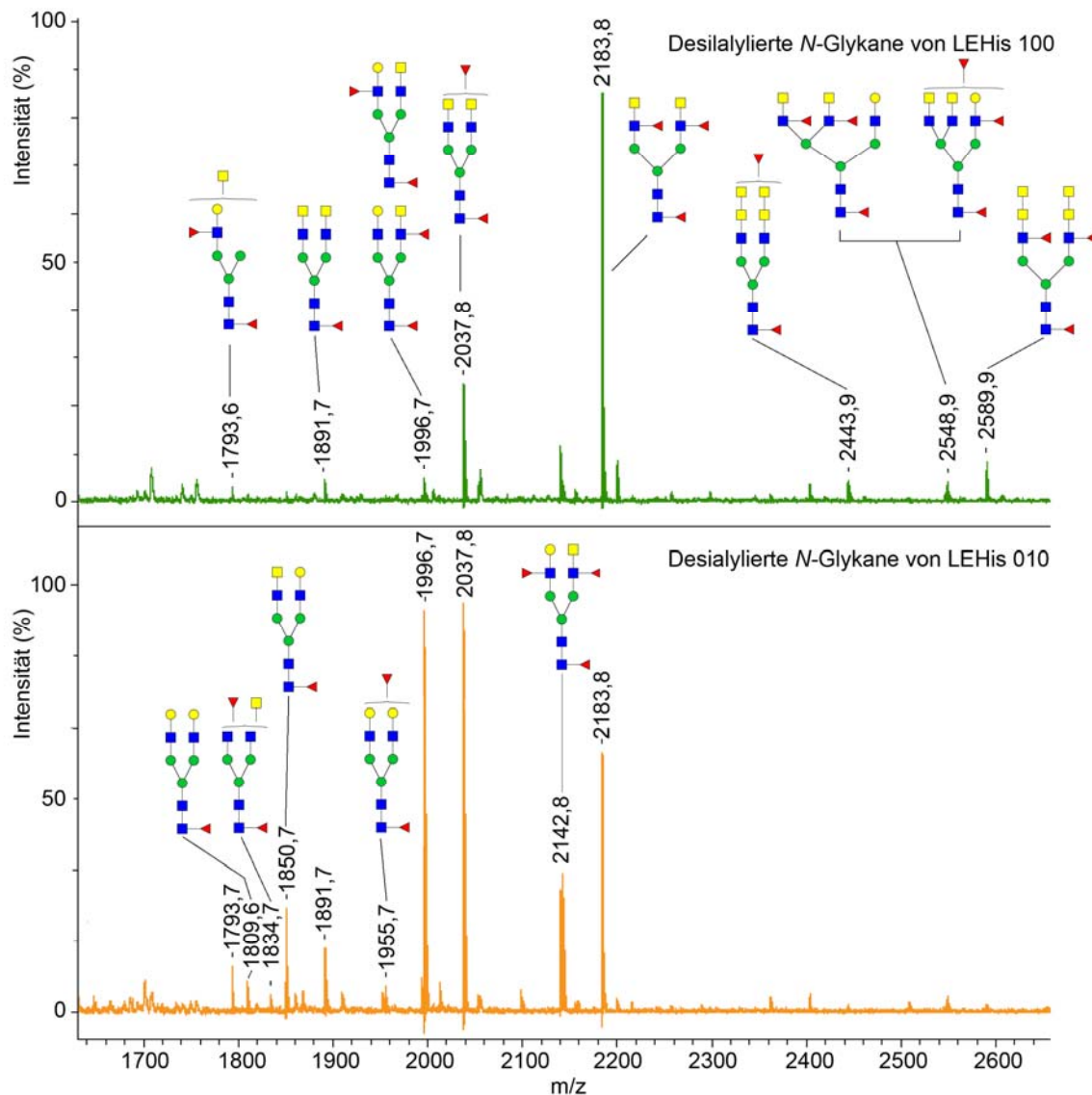


Abb. 63: MALDI-TOF-MS-Spektren von desialylierten N-Glykanen von LEHis 100 und 010. Die Spektren wurden im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen. Jede Struktur wurde nur einmal gezeigt, d.h. wenn die gleichen Strukturen bei beiden Mutanten vorkommen, ist sie aus Platzgründen nur im oberen Spektrum gezeichnet. Die Massen sind jedoch für beide Mutanten über den zugehörigen Peaks angegeben. Alle Strukturen wurden durch Vergleiche mit den Ergebnissen von Messungen nach verschiedenen Exoglykosidase-Verdau zugeordnet (vgl. Abschn. 9).

Um Sialinsäuren detektieren zu können, wurden alle Proben permethyliert und erneut gemessen (Spektren nicht gezeigt). Bei der Mutante 100 konnten die gleichen Strukturen wie nach Desialylierung erneut nachgewiesen werden. Es konnte zusätzlich nur ein N-Glykan, das mit einem Sialinsäurerest substituiert war, detektiert werden. Dieses war biantennär, mit je einem GalNAc-Rest an den Antennen besetzt, an den in nicht weiter bestimmter Weise ein Fucoserest und ein Sialinsäurerest verknüpft waren. Bei der Mutante 010 hingegen fanden sich, zusätzlich zu den bereits bestimmten, drei sialylierte N-Glykane. Es handelte sich um ein biantennäres Glykan mit zwei Galactoseresten an den Antennen und einem Fucoserest an der Basis, sowie zwei biantennären Glykanen mit einem Galactoserest und einem GalNAc-Rest an den Antennen, die sich jeweils in einem Fucoserest an der Antenne unterschieden (**Abb. 64**). Diese drei Strukturen trugen jeweils eine terminale Sialinsäure, wobei nicht bestimmt wurde, an welchen der beiden terminalen

Glykanbausteine diese geknüpft war.

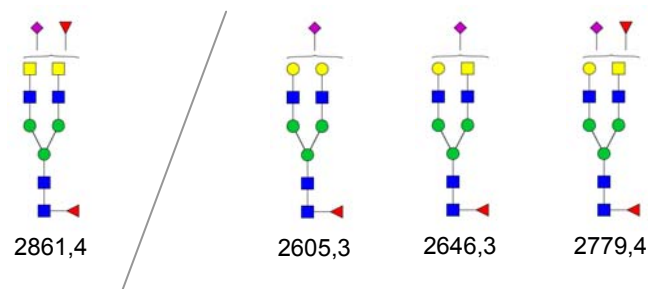


Abb. 64: Sialylierte N-Glykane der LEHis- Mutanten 100 (linke Seite) und 010 (rechte Seite). Unter den Strukturen ist jeweils das zugehörige m/z angegeben.

In **Abb. 65** sind die MALDI-TOF-MS Spektren der desialylierten N-Glykane von LEHis 001 und 111 gezeigt. Bei der Mutante 001 konnten 15 N-Glykanstrukturen zu den *Peaks* im Massenspektrum zugeordnet werden. Auch hier zeigte sich nach Exoglykosidase-Verdau und anschließender erneuter Messung (Spektren nicht gezeigt), dass die meisten Strukturen biantennär waren und eine *core*-Fucose enthielten. An den Antennen waren außerdem, wie auch bei den Mutanten 100 und 010, N-Acetyl-Galactosaminreste vorhanden. 12 von 15 Strukturen der Mutante 001 enthielten zusätzliche 1-3 Fucosereste an den antennären GlcNAc-Resten. Hier fanden sich außerdem 3 Strukturen, die triantennär und hoch fucosyliert waren.

Sowohl bei der Mutante 001 als auch 111 wurde der höchste *Peak* mit einer m/z von 1996,7 gemessen. Dieser *Peak* wird von zwei Strukturen gebildet, die sich in der Position des Fucoserestes an einer der Antennen unterscheiden. An den Enden dieser biantennären Struktur sind jeweils ein Galactose- und ein N-Acetyl-Galactosaminrest. Der nächst kleinere *Peak* in dem Spektrum der N-Glykane der Mutante 001 stammt von einem gleich aufgebautem Glykan, das jedoch noch zusätzlich einen antennären Fucoserest besitzt. Mit etwas geringerem Anteil wurden biantennäre N-Glykanstrukturen detektiert, die an beiden Antennen mit N-Acetyl-Galactosaminresten substituiert waren. Die Zusammensetzung dieser Glykane mit den m/z von 2037,7 und 2183,8 unterschied sich um einen Fucoserest. Bei der Mutante 001 wurden 2 triantennäre Strukturen identifiziert. Eine davon war hochfucosyliert, denn an jeder der drei Antennen trug sie einen Fucoserest (m/z = 2288,8).

Bei der wildtypischen Form LEHis 111 wurden neben den biantennären Glykanen, die mit Galactoseresten oder N-Acetylgalactosaminresten versehen waren und 1-3 Fucosereste trugen, auch drei triantennäre und eine tetraantennäre Struktur identifiziert. Ebenso wie bei den Mutanten 010 und 001 wurde der Haupt-*Peak* bei 111 von einem biantennären Glykan mit einem m/z von 1996,7 gebildet. Im mittleren Bereich des Spektrums wurden die gleichen Strukturen wie bei Mutanten identifiziert. Zusätzlich wurden bei 111 kleinere N-Glykanstrukturen gefunden, von denen eine keine *core*-Fucose besitzt (m/z = 1663,6). Der Anteil der kleineren biantennären Strukturen, die lediglich eine *core*-Fucose und keine antennären Fucosereste besitzen, ist bei 111 größer als bei den Mutanten 100 und 001. Außerdem gab es im Vergleich mit den Mutanten mehr Strukturen, deren Antennen mit Galactoseresten versehen waren. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der Monosaccharid-Analyse überein.

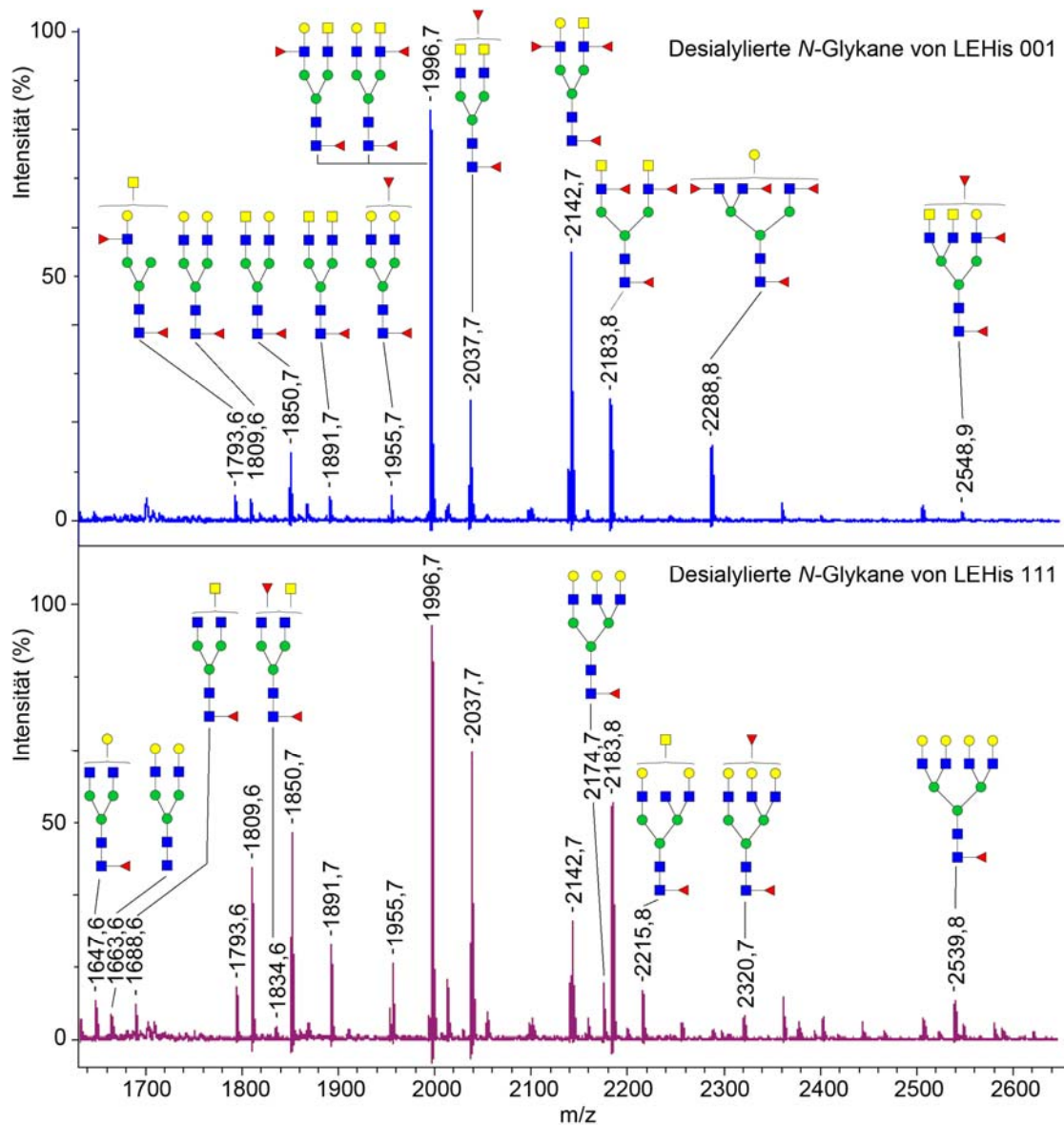


Abb. 65: MALDI-TOF-MS Spektren von desialylierten Glykanen von LEHis 001 und 111. Die Spektren wurden im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen. Jede Struktur wurde nur einmal gezeigt, d.h. wenn die gleichen Strukturen bei beiden Mutanten vorkommen, ist sie aus Platzgründen nur im oberen Teil gezeichnet. Die Massen sind jedoch für beide Mutanten über den zugehörigen *Peaks* angegeben. Alle Strukturen wurden durch Vergleiche mit den Ergebnissen von Messungen nach verschiedenen Exoglykosidase-Verdaus zugeordnet.

Nach Permethylierung und erneuter Messung (Spektren nicht gezeigt) wurden bei der Mutante 001 und dem Wildtyp auch sialylierte *N*-Glykane detektiert. Dabei handelte es sich in allen Fällen lediglich um einfach sialylierte *N*-Glykane. Insgesamt wurden bei der Mutante 001 nur drei sialylierte Strukturen identifiziert (**Abb. 66**). Diese waren wie die zuvor bestimmten Strukturen biantennär und besaßen 2-3 Fucosereste. Den größeren Anteil machte dabei die Struktur mit einem *m/z* von 2820,4 aus, während die anderen beiden Strukturen nur zu einem geringen Anteil vertreten waren. Es wurde jedoch nicht bestimmt, an welchem terminalen Kohlenhydratrest die Sialinsäure verknüpft war.

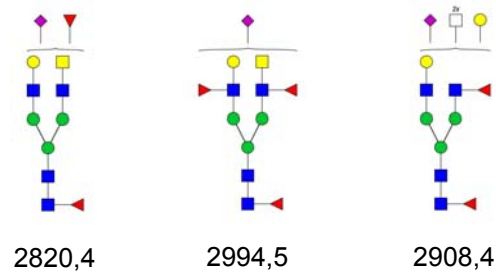


Abb. 66: Sialylierte N-Glykane der LEHis Mutante 001. Die Strukturen wurden nach Permethylierung mittels MALDI-TOF-MS im Positiv-Ionen-Modus gemessen und durch Exoglykosidase Verdau bestätigt. Unter den Strukturen ist jeweils das zugehörige m/z angegeben.

Bei der Wildtyp-Form von LEHis wurden nach Permethylierung 10 sialylierte Strukturen identifiziert (**Abb. 67**). Im Gegensatz zu AGP, dessen N-Glykane doppelt so viele sialylierte Strukturen aufwies (Spektren nicht gezeigt), handelt es dennoch relativ wenige Strukturen in vergleichsweise geringen Anteilen. Schätzt man den Sialinsäure-Anteil durch Summieren der Peakflächen aus den Massenspektren ab, so kommt man auf etwa 19 % sialylierte Strukturen bei LEHis 111 im Gegensatz zu etwa 39 % bei AGP.

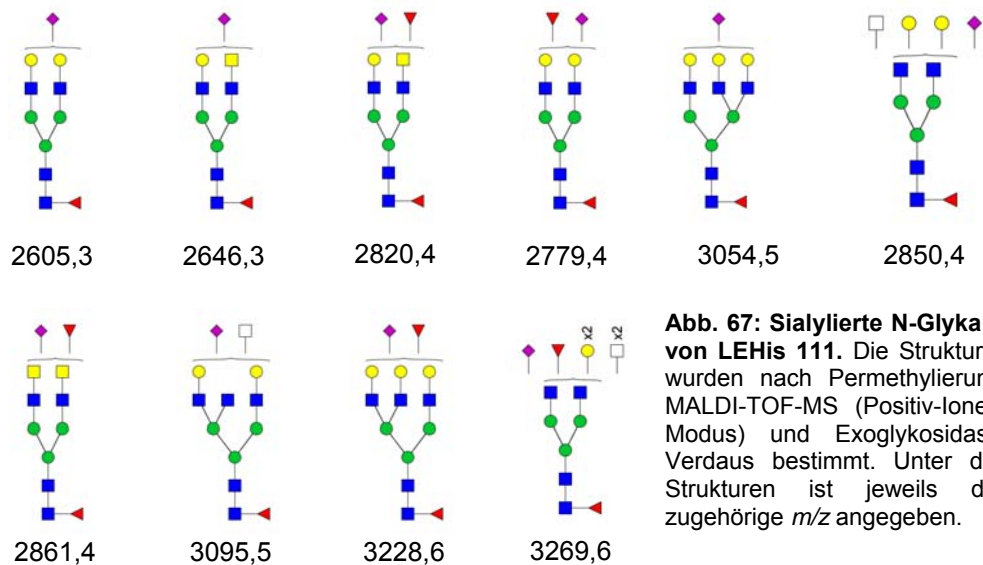


Abb. 67: Sialylierte N-Glykane von LEHis 111. Die Strukturen wurden nach Permethylierung, MALDI-TOF-MS (Positiv-Ionen-Modus) und Exoglykosidase-Verdau bestimmt. Unter den Strukturen ist jeweils das zugehörige m/z angegeben.

Die sialylierten Glykane von LEHis 111 waren biantennär und triantennär. Der im Gegensatz zu den Mutanten geringere Anteil an GalNAc- und Fucoseresten konnte nach Permethylierung erneut festgestellt werden.

Zusätzlich zu den Messungen im Positiv-Ionen-Modus wurden alle Proben im Negativ-Ionen-Modus untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass einige der N-Glykane von LEHis in diesem Modus im Massenspektrometer detektierbar waren. Dies ließ darauf schließen, dass es sich um negativ geladene Modifikationen an den Glykanen handelte, die aufgrund der Masse mit Sulfatresten korrespondieren. Dass es sich tatsächlich um Sulfate handelte, wurde durch Verdau mit Sulfatase

bestätigt. Nach dem Verdau waren keine Signale mehr im Negativ-Ionen-Modus zu sehen (Spektren nicht gezeigt). Durch diesen Befund ließen sich einige *Peaks* in den Spektren der Messungen im Positiv-Ionen-Modus interpretieren, die zuvor nicht zugeordnet werden konnten.

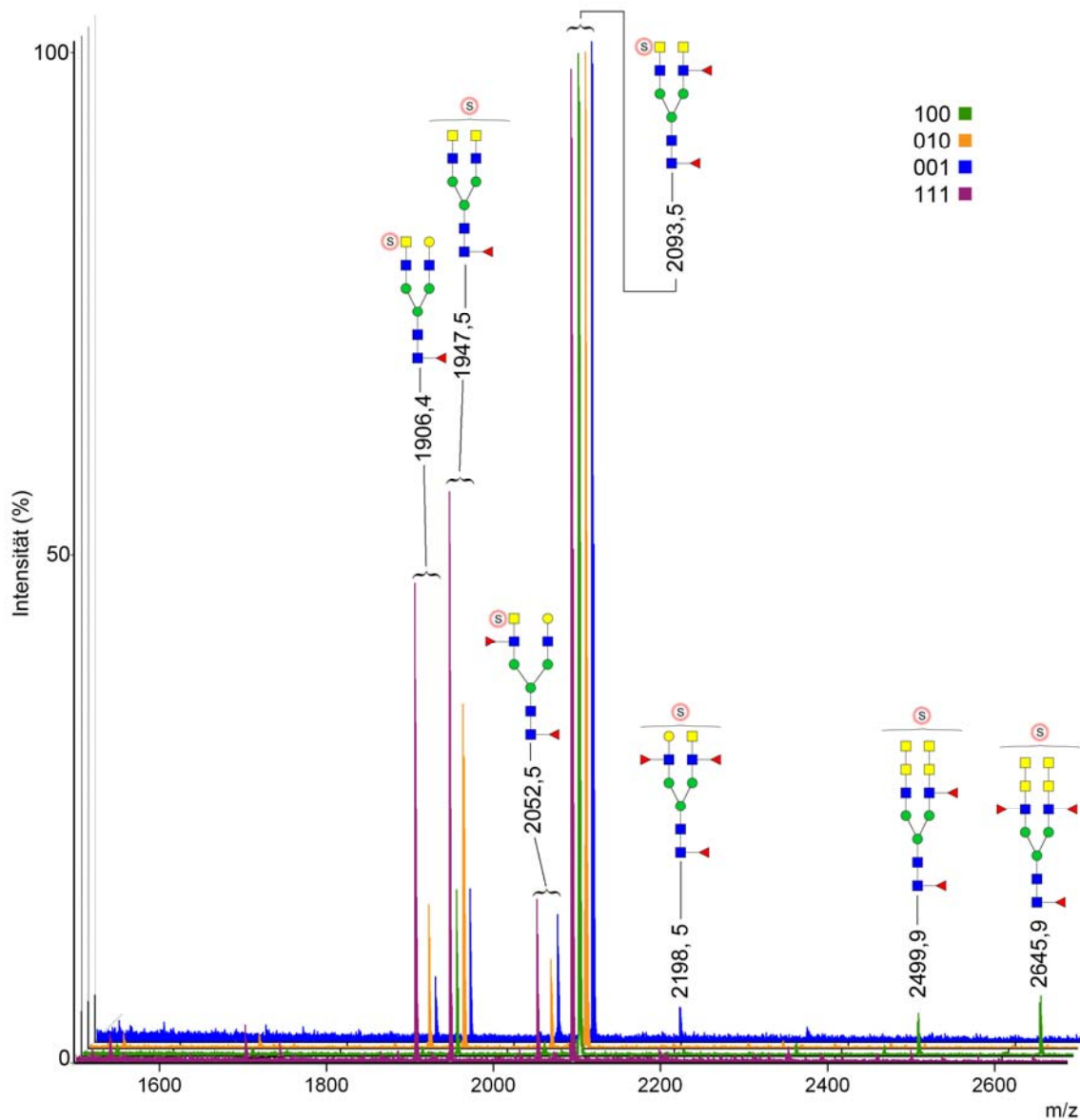


Abb. 68: MALDI-TOF-MS -Spektren der desialylierten *N*-Glykane von LEHis 100, 010, 001 und 111. Die Spektren wurden im Negativ-Ionen-Modus aufgenommen und für die Abbildung hintereinander versetzt dargestellt. Die zu den *Peaks* zugeordneten Strukturen wurden durch Exoglykosidase-Verdau bestätigt.

In der **Abb. 68** sind die Spektren der Messungen im Negativ-Ionen-Modus von den *N*-Glykanen aller LEHis-Mutanten und des Wildtyps, in einer einzelnen Grafik hintereinander gestaffelt dargestellt. Bei diesen sulfatierten *N*-Glykanen handelte es sich um biantennäre Strukturen, die mit GalNAc-Resten an beiden Antennen oder mit jeweils einem Galactose-Rest und einem GalNAc-Rest an jeder Antenne versehen waren. Pro Struktur konnte jeweils ein Sulfatrest identifiziert werden, mit dem einer der beiden Antennen modifiziert war. Der Hauptanteil der *N*-Glykanstrukturen aller

Mutanten wurde von einem biantennären Glykan gebildet, das GalNAc-Reste an den Enden beider Antennen besaß und eine einfache Sulfatierung enthielt ($m/z = 2093,5$). Hierbei war eine Antenne fucosyliert, zusätzlich zu der bei allen Strukturen vorkommenden *core*-Fucose. Vergleicht man die relativen Anteile der verschiedenen Glykanstrukturen, so fällt auf, dass jene Strukturen, die auch Galactosereste an einer der Antennen ($m/z = 1906,4$ bzw. $2052,5$) besitzen, nur in ganz geringen Spuren bei der Mutante 100 vorkamen. Wie bereits bei den Messungen im Positiv-Ionen-Modus gezeigt, unterschieden sich die Glykane von 100 von den anderen Mutanten durch einen weitaus höheren Anteil an GalNAc-Resten. Dafür wurden bei der Mutante 100 die Glykane mit den ungewöhnlichen GalNAc-GalNAc-Antennen, die bereits im Positiv-Ionen-Modus gezeigt wurden, ebenfalls als sulfatierte Varianten detektiert. Auch im Negativ-Ionen-Modus konnten diese Glykane hauptsächlich bei der Mutante 100 nachgewiesen werden. Beim Wildtyp wurden hingegen nur geringe Signale detektiert. Die Mutante 001 unterschied sich von den anderen Mutanten durch einen deutlich detektierbaren Anteil eines dreifach fucosylierten sulfatierten Glykans ($m/z = 2198,5$).

Um die Präsenz von Sialinsäure zu zeigen, die eventuell an den sulfatierten Glykanen zu finden sind, wurden die Proben permethyliert und ebenfalls im Negativ-Ionen-Modus gemessen. Es konnte nur eine einzige sialylierte und gleichzeitig sulfatierte Struktur gefunden werden, und zwar bei der wildtypischen Form von LEHis (111) (**Abb. 69**).

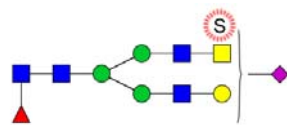


Abb. 69: Sialyliertes und Sulfatiertes N-Glykan von LEHis 111

Exemplarisch für die Exoglykosidase-Verdau, die zur Bestimmung der Glykanstruktur für alle LEHis Mutanten durchgeführt worden waren, wurden die Spektren für die Mutante 010, gemessen im Negativ-Ionen-Modus, in **Abb. 70** dargestellt. In der oberen Reihe sind die vier Haupt-*Peaks* der N-Glykane von LEHis 010 zu sehen, wie sie nach Desialylierung erscheinen. Nach Verdau mit β -Galactosidase und einer Fucosidase, die spezifisch für α 1-3,4 gebundene Fucose ist, wurden nur noch zwei *Peaks* detektiert. Diese Massen korrespondieren mit biantennären Strukturen, die keine antennäre Fucosereste mehr tragen. Glykane, die einen Galactoserest an einer Antenne trugen, wurden degalactosyliert. Die N-Acetyl-Galactosaminreste wurden hingegen nicht abgespalten. Nach Inkubation mit GlcNAc-spezifischer Hexosaminidase wurden die Glykane umgesetzt, bei denen nach Abspaltung der Galactose nun ein frei vorliegender GlcNAc-Rest vorlag. Der *Peak* für die Glykane, die mit GalNAc-Resten substituiert war, blieb dabei bestehen. Im letzten Schritt wurden diese Glykane durch Verdau mit einer Hexosaminidase, die neben GlcNAc- auch GalNAc-Reste abspalten kann, verdaut und somit auf die in der letzten Reihe gezeigte Struktur umgewandelt. Der sulfatierte GalNAc-Rest konnte von dieser Hexosaminidase nicht abgespalten werden.

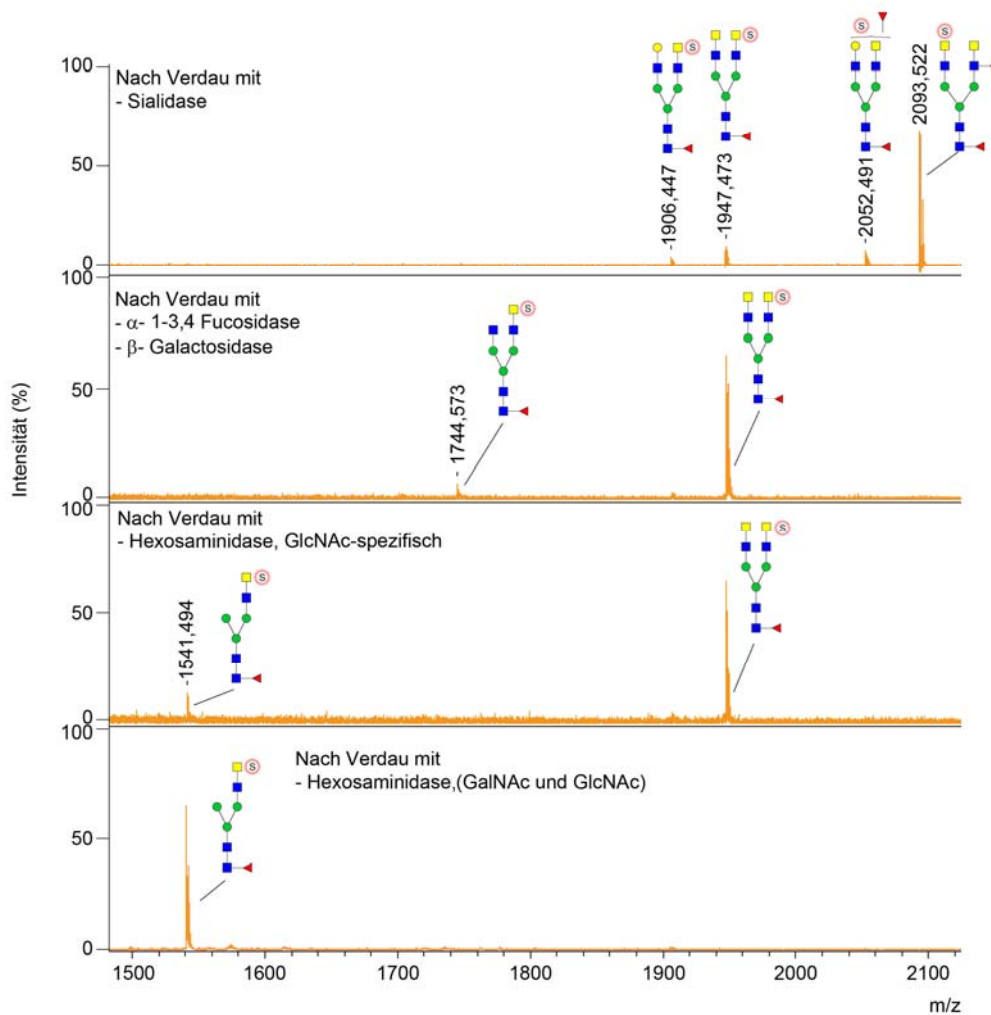


Abb. 70: MALDI-TOF-MS-Spektren der N-Glykane von LEHis 010 nach sequentiellem Glykosidaseverdau. Isolierte N-Glykane wurden mit Sialidase, Fucosidase, Galactosidase und verschiedenen Hexosaminidasen inkubiert und anschließend im Massenspektrometer im Negativ-Ionen-Modus gemessen. Aufgrund dieser Daten konnten die zu den Massen korrespondierenden Strukturen zugeordnet werden.

Wie eingangs erwähnt, wurde bei allen Analysen α -1-saures Glykoprotein (AGP) mitgeführt, das im selben Expressionssystem exprimiert wurde, um zelltypspezifische Merkmale der Glykosylierung von Merkmalen abzugrenzen, die durch den Proteinanteil der Glykoproteine bestimmt werden. In **Abb. 71** sind zum Vergleich zwei Spektren der Messungen im Positiv-Ionen-Modus (oben) und im Negativ-Ionen-Modus (unten) gezeigt. Deutlich ist zu erkennen, dass bei diesem Glykoprotein keinerlei Sulfatierung nachweisbar war, denn im Negativ-Ionen-Modus erschienen keine *Peaks*. Von den im Positiv-Ionen-Modus identifizierten N-Glykanen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Häufigsten in die Grafik eingezeichnet worden. Auch hier fällt auf, dass bei AGP im Gegensatz zu den LEHis-Glykanen keine N-Acetyl-Galactosaminreste an den Antennen zu finden waren. Insgesamt waren die Strukturen außerdem höher antennär und weniger fucosyliert. Somit handelt es sich bei der Modifikation von LEHis mit Sulfatresten und N-Acetyl-Galactosaminresten, sowie der hohen Fucosylierung um Modifikationen, die in Abhängigkeit vom

Proteinanteil von LEHis gebildet werden.

Nach Permethylierung zeigte AGP außerdem einen höheren Anteil tri- und tetraantennärer sowie sialylierter Strukturen als LEHis. Das Potential zu einer vergleichsweise stärkeren Sialylierung, als sie bei LEHis gezeigt werden konnte, ist in dem HEK293F-Expressionssystem offenbar gegeben.

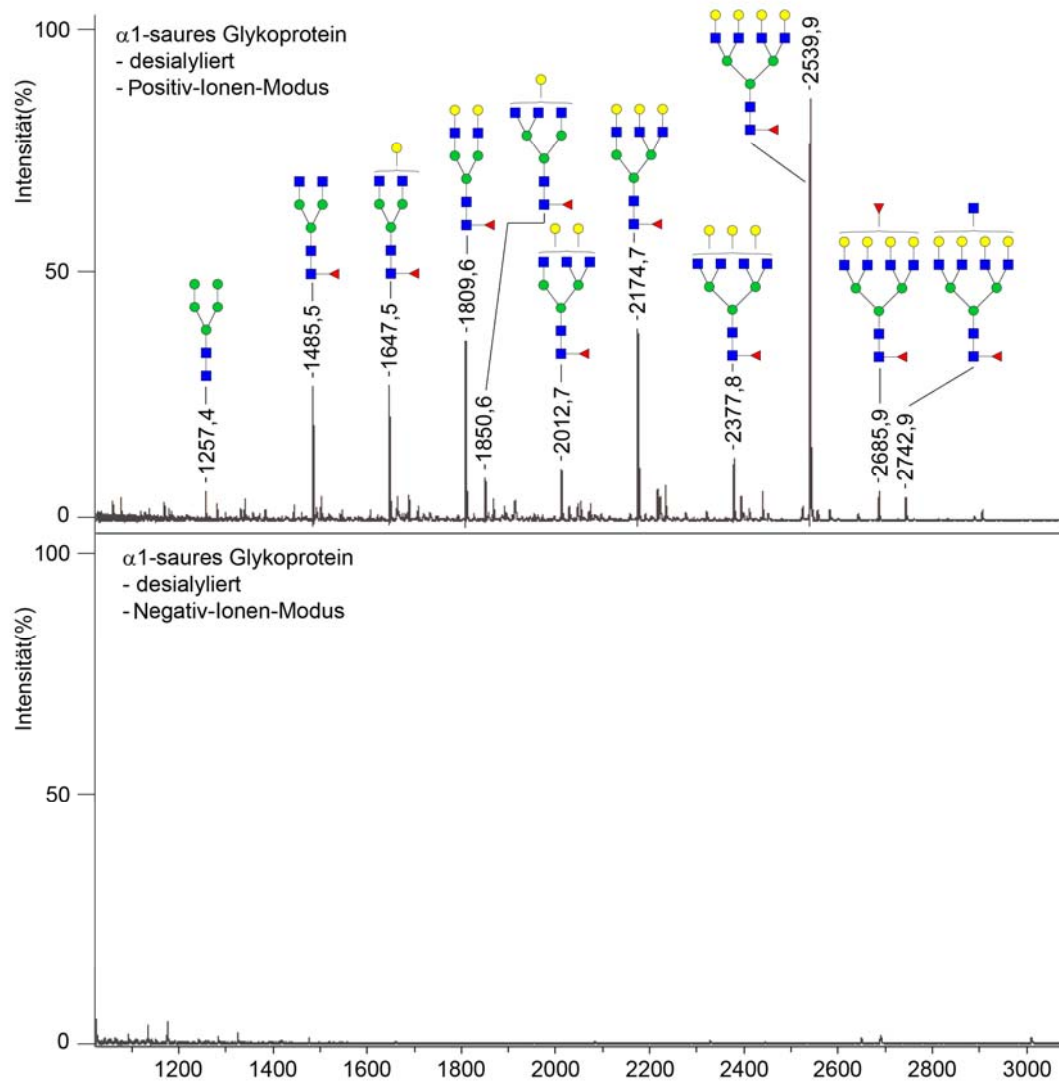


Abb. 71: MALDI-TOF-MS-Spektren der desialylierten N-Glykane vom α -1-sauren Glykoprotein (AGP). In der oberen Reihe ist das Spektrum zu sehen, das im Positiv-Ionen-Modus aufgenommen wurde und in der unteren Reihe jenes, das im Negativ-Ionen-Modus aufgenommen wurde.

4 Diskussion

Leukozyten wandern bei der Immunüberwachung oder im Entzündungsfall aus den Gefäßen in das Gewebe aus. Diese Leukozytenextravasation wird durch das Zusammenwirken einer Reihe von Adhäsionsmolekülen mit ihren Liganden sowie durch Signalketten reguliert. Wenn die Infiltration mit Leukozyten ungebremst fortschreitet, wie es bei entzündlichen Krankheiten der Fall ist, kann es dadurch zu sekundärer Gewebeschädigung kommen. Daher ist es wünschenswert, an dieser Stelle therapeutisch entgegenzuwirken. Der Adhäsionsrezeptor L-Selektin vermittelt im Zusammenspiel mit seinen Liganden und anderen Adhäsionsmolekülen den ersten Schritt bei der Leukozytenextravasation und bietet sich daher als Zielstruktur für eine antiinflammatorische Therapie an (Ehrhardt *et al.*, 2004; Rossi and Constantin, 2008). Die Hemmung der Funktion von L-Selektin führt zur deutlichen Reduktion auswandernder Leukozyten (Jutila *et al.*, 1989). Diese Hemmung kann durch gegen L-Selektin gerichtete inhibitorische Antikörper bewirkt werden, aber auch durch Moleküle, die die Ligandenbindungsstelle von L-Selektin blockieren und mit natürlichen Liganden konkurrieren. Auf der anderen Seite können auch rekombinante L-Selektine die Liganden binden und auf diese Weise mit sich selbst konkurrieren (Ley *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1991).

Um neue Therapeutika zu entwickeln, die über diesen Mechanismus wirken, ist es nötig, die molekularen Grundlagen der Ligandbindung zu verstehen. Kristallstrukturen von Rezeptoren im Komplex mit ihren Liganden geben hierbei den vollständigsten Einblick. Mithilfe von Computersimulationen können an der Struktur mögliche Ligandenanaloga als Inhibitor modelliert werden. Die Kristallstrukturen von E- und P-Selektin im Komplex mit einzelnen Liganden wurden bereits gelöst (Graves *et al.*, 1994; Somers *et al.*, 2000). Weiterhin ist bislang nicht klar, wie die verschiedenen Ligandenspezifitäten der drei Selektine L-, E-, und P-Selektin, zustande kommen. Bisherige Ergebnisse zeigten, dass L- und P-Selektin für ihre Bindung Sulfatreste auf ihren Liganden benötigen, während E-Selektin unabhängig von Sulfatresten an seine Liganden bindet (Varki, 1994). Unterschiede zwischen den Ligandenspezifitäten von L- und P-Selektin wurden kürzlich anhand von Simulationen untersucht (Klopocki *et al.*, 2008). Dabei diente die Kristallstruktur von P-Selektin im Komplex mit PSGL-1 als Vorlage, die PSGL-1-Bindung an L-Selektin computergestützt zu modellieren. Aufgrund dieser Informationen war gezielt eine Mutation in L-Selektin eingebracht worden, die entsprechend der Vorhersage eine Veränderung der Ligandenspezifität bewirkte. Außer der Kenntnis der an der Ligandbindung beteiligten Seitenreste sind Konformationsänderungen von großem Interesse. Durch Konformationsänderungen können Affinitäten verstärkt und Signale ins Innere der Zelle weitergeleitet werden. Ein Beispiel von konformationsbedingter Affinitätsveränderung wurde mithilfe von Kristallstrukturdaten modelliert und an P-Selektin *in vitro* gezeigt (Phan *et al.*, 2006).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kristallstruktur von L-Selektin zu lösen. Um die Kristallstrukturdaten zu erhalten, mußte zunächst ein Expressionssystem gefunden werden, das es ermöglicht, L-Selektin in großen Mengen und funktionell aktiv zu produzieren, um es für Kristallisationsscreens einsetzen zu können.

4.1 **Expression von rekombinantem L-Selektin für die Kristallisation**

Mit dem Ziel, L-Selektin für die Kristallisation zu erhalten, wurde in Vorarbeiten eine Reihe von Expressionssystemen getestet. Verschiedene *E. coli*-basierte Expressionssysteme hatten dabei zu keinem dauerhaft löslichen L-Selektin geführt (Fieger, 1997). Auch in der Literatur wurde beschrieben, dass (bovines) L-Selektin in *E. coli* in der unlöslichen Fraktion angereichert wird (Kashima *et al.*, 1999). In diesen Vorarbeiten wurde der gesamte extrazelluläre Teil von L-Selektin (sL-Selektin) auch in Insektenzellen und Säugerzellen (BHK und K562) exprimiert. Teilweise war sL-Selektin in großen Mengen produziert worden, die für Kristallisations-*Screenings* eingesetzt werden konnten. Bislang konnte jedoch bei diesen Versuchen keine Kristallisationsbedingung gefunden werden. Vermutlich behinderte die Heterogenität der N-Glykane an den 7 Glykosylierungskonsensussequenzen, die in sL-Selektin enthalten sind, eine erfolgreiche Kristallisation.

In Weiterführung dieser Arbeiten wurden für die vorliegende Arbeit L-Selektin-Konstrukte hergestellt, die nur die Lektin- und die EGF-Domäne, die die Ligandenbindung vermitteln, umfassen. Dadurch verringert sich die Anzahl potentieller Glykosylierungsstellen von sieben auf drei. Diese trunkierte Variante wurde in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Expressionssystemen getestet und modifiziert.

4.1.1 **Expression in *Pichia pastoris* und Sf9- Zellen**

Als Eukaryonten sind die Hefe *Pichia pastoris* und Sf9-Insektenzellen in der Lage, N-Glykosylierungsstellen rekombinanter Proteine mit Glykanen zu modifizieren. Da Hefe und Insektenzellen einfachere Glykane herstellen als Säugerzellen, werden Glykoproteine, bei denen die Glykosylierung zur Funktion und Faltung benötigt wird, für Kristallisationsversuche in diesen Expressionssystemen exprimiert. Hierdurch hat man die Möglichkeit, eine einfache und potentiell homogene Glykosylierung zu erreichen. Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche in *E. coli* schien es wahrscheinlich, dass Glykane für die Faltung und Löslichkeit von L-Selektin benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von His-getaggetem, trunkiertem L-Selektin (LEHis) in *Pichia pastoris* zwar erfolgreich nachgewiesen werden, doch wurde das Protein in den Zellen zurückgehalten, statt wie gewünscht in den Kulturüberstand sekretiert zu werden. Durch die Verwendung verschiedener Hefestämme, Expressionsplasmide, Signalpeptide, Kulturtemperaturen, Medien und Glykosylierungsmutationen konnte keine Sekretion des rekombinanten Proteins erreicht werden. Aus welchem Grund L-Selektin in Hefezellen nicht sezerniert wird, bleibt unklar. L-Selektin bindet an Glykane, deren Bausteine auch in der Hefezellwand vorkommen (Stoolman *et al.*, 1984). Dies könnte darauf hinweisen, dass lösliches L-Selektin intrazellulär an Glykane der Zellmembranen des Wirts gebunden wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Glykoformen exprimiert: erstens wildtypisches LEHis, das 3 Glykosylierungsstellen besitzt, und zweitens LEHis, das in allen drei Glykosylierungsstellen mutiert worden war. Auftrennung mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse zeigte, dass die Glykosylierungsstellen in unterschiedlichem Maße glykosyliert

wurden, so dass mono-, di- und triglykosylierte Formen gebildet wurden. Zellfraktionierungsexperimente zeigten, dass diese Glykosylierungsformen in der Membranfraktion vorlagen. Bei der Mutante war im Zellysat noch eine feine Extrabande nachweisbar, die wahrscheinlich L-Selektin mit ungespaltenem Signalpeptid darstellte (**Abb. 9B**).

Da L-Selektin in *P. pastoris* in detektierbaren Mengen exprimiert wurde, wurde versucht, das Protein mit hohen Salzkonzentrationen oder einem milden Detergenz aus den Membranen zu solubilisieren. In Gegenwart von Detergenz ließ sich L-Selektin solubilisieren und konnte an Ni-NTA gebunden werden. Nach Auftrennung der Fraktionen der Ni-NTA-Chromatographie mittels SDS-PAGE wanderten die Proteinbanden mit einem deutlich erhöhtem apparenten Molekulargewicht, was dafür sprach, dass sich hochmolekulare Aggregate gebildet hatten. Aggregiertes Protein ist hingegen für Kristallisationsversuche nicht geeignet. Will man Proteine, die sekretiert werden sollen und daher ein Signalpeptid besitzen, aus dem Zellysat isolieren, muß außerdem eine Strategie entwickelt werden, die es ermöglicht, die beiden Formen des Proteins, d.h. jene mit und ohne Signalpeptid, voneinander zu trennen. Das Hefesystem wurde daher als ungeeignetes Expressionssystem nicht weiter verfolgt.

Insektenzellen werden ähnlich den Säugerzellen kultiviert, doch können sie leicht viral mit dem Baculovirus infiziert werden, was unter anderem einen Vorteil in der gentechnischen Sicherheit darstellt. Humane Zelllinien mit humanen Viren zu infizieren ist mit einem Risiko für den Experimentator verbunden. Insektenzellviren sind dagegen nicht humanpathogen. Virale Transduktion ist die effizienteste Möglichkeit, fremde Gene in Wirtszellen einzubringen. Ein Transfektionsreagenz wurde bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode nur einmal für die Bildung von Baculoviren benötigt, anschließend wurde die Infektivität, die den Viren eigen ist, zur Transfektion genutzt. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung der Insektenzellen als Expressionssystem für Strukturuntersuchungen ist ihre zumeist einfachere und damit homogenere Glykanstruktur. Obwohl Insektenzellen offenbar in der Lage sind, Galactose- und Sialinsäurereste auf die äußeren Antennen der N-Glykane zu übertragen, bilden sie dennoch hauptsächlich Strukturen des Oligomannose-Typs oder insektenzellspezifische Paucimannose-Strukturen aus (Tomiya *et al.*, 2004). Für die Kristallisation sind einfache, homogene Glykane wünschenswert; eine Eigenschaft, die Oligomannose- oder Paucimannose-Strukturen eher erfüllen als komplexe N-Glykane. Bei therapeutisch anzuwendenden Glykoproteinen hingegen ist eine vollständige Sialylierung von Vorteil, da nicht sialylierte Glykoproteine durch den Asialoglykoproteinrezeptor der Leber schnell aus dem Serum entfernt werden (Ashwell and Morell, 1974). Daher wurden Insektenzellen als Expressionssystem für therapeutische Glykoproteine, insbesondere bezüglich ihrer Enzymausstattung für die Glykosylierung, eingehend erforscht.

Es war aus den Vorarbeiten bekannt, dass sich der gesamte extrazelluläre Teil von L-Selektin (sL-Selektin) in Insektenzellen gut exprimieren ließ. Die Expression der verkürzten Variante, die für die vorliegende Arbeit konstruiert worden war, war im Vergleich zum sL-Selektin sehr viel geringer (o. Abb.). In der Western Blot-Analyse von Überstand transfizierter Zellen reagierte der Anti-L-Selektin Antikörper mit zwei Proteinbanden, die im Überstand untransfizierter Zellen nicht vorhanden waren (**Abb. 11A**). Es wurde nicht geklärt, wie die beiden Proteinbanden zustande kamen. Möglicherweise repräsentierte die Doppelbande LEHis mit und ohne Signalpeptid oder in

einer Bande ein Produkt einer proteolytischen Spaltung. Nach Optimierung der Expression waren die beiden Banden auch im silbergefärbten SDS-Gel deutlich zu sehen. Zusätzlich konnte LEHis nicht mittels Ni-NTA-Chromatographie aus dem Kulturüberstand gereinigt werden (**Abb. 11B**). Möglicherweise ist der His-tag der kürzeren L-Selektin Variante (LEHis) nicht zugänglich; denn die längere sL-Selektin-Variante (sL-Selektin) konnte in den Vorarbeiten erfolgreich als His-getaggtetes Protein aus dem Kulturmedium über Ni-NTA aufgereinigt werden. Um auszuschließen, dass sich die in den weiterführenden Arbeiten etablierte Insektenzellkultur von jener aus den Vorarbeiten unterschied und die fehlende Bindung von LEHis an Ni-NTA auf mögliche Veränderungen des Expressionssystems zurückführen ließe, wurde zur Kontrolle nochmals sL-Selektin(His) exprimiert. Diese Form von L-Selektin ließ sich wie zuvor gut exprimieren und aufreinigen. Andere Aufreinigungsmethoden (Anionenaustauschchromatographie) (o. Abb.) erwiesen sich in diesem System ebenfalls als nicht praktikabel. Auch war die Expression von LEHis in Form von zwei Proteinbanden für die Kristallisation nicht geeignet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Expressionsversuche in Insektenzellen nicht weitergeführt und alternativ Säugerzellen als Expressionssystem untersucht.

4.1.2 Expression von L-Selektin in Säugerzellen

Bei der Suche nach einem geeigneten Expressionssystem wurden zuerst CHO-Zellen untersucht. CHO-Zellen sind leicht zu transfizieren, leicht zu kultivieren und sind einer der am häufigsten genutzten Expressionssysteme für rekombinante Proteine. Ein Nachteil dieser Zellen kann darin bestehen, dass es sich nicht um eine humane Zelllinie handelt. In der Folge ist die Glykosylierung von rekombinanten Glykoproteinen aus CHO-Zellen von jenen verschieden, die in humanen Zelllinien exprimiert werden. CHO-Zellen exprimieren zum Beispiel keine core-2-GlcNAc-Transferase und keine Fucosyltransferase IV und VII, welche für die Ausbildung der Glykanstrukturen von Selektinliganden notwendig sind. Wenn rekombinante Glykoproteine für ihre Funktion mit distinkten Glykanen ausgestattet sein müssen, kann die Expression hierfür erforderlicher Glykosyltransferasen in CHO-Zellen durch stabile Transfektion erreicht werden (Huang *et al.*, 2000). Im Falle von L-Selektin ist dies nicht notwendig, da L-Selektin aus CHO-Zellen als Rezeptor funktionell aktiv ist (**Abb. 13B**).

Für die Herstellung von L-Selektin LE in CHO-Zellen wurden zwei verschiedene tags als Grundlage der Reinigung aus dem Zellkulturüberstand verglichen; der 6xHis-tag und eine Fusion mit dem Fc-Teil von humanem IgG. Für die angestrebte Kristallisation war ein kleines Affinitätstag wie das His-tag von Vorteil, da es seltener bei der Kristallisation stört. Dies ist allerdings für jedes Protein verschieden und kann nur empirisch bestimmt werden. Lektin-EGF wurde daher in einer ersten Gruppe von Versuchen als His-getaggte Variante transfiziert, doch konnte keine nennenswerte Expression in CHO-Zellen detektiert werden. Als zweites Konstrukt wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus der Lektin- und der EGF-Domäne von L-Selektin und dem Fc-Teil von humanem IgG („LEIgG“), transfiziert, wobei eine gute Expression erreicht werden konnte. Von den Transfektanten wurden daraufhin stabile Klone etabliert und auf gute Proteinexpression gescreent. **Abb. 12** zeigt, dass die verschiedenen Klone ein unterschiedliches Expressionsniveau hatten. Während die Etablierung stabil transfizierter Klonzelllinien mehr Zeit in Anspruch nimmt, um eine homogene

Expression über einen längeren Zeitraum zu erzielen, ermöglicht die transiente Expression zumeist höhere Expressionsraten innerhalb kürzerer Zeit. Ein großer Fusionsanteil wie der Fc-Teil von humanem IgG muß vor der Kristallisation abgespalten werden. Dazu können Proteaseschnittstellen in die Sequenz eingefügt werden, wodurch das aufgereinigte Protein proteolytisch gespalten werden kann. Anschließend muß der Ansatz erneut mit einer anderen Methode aufgereinigt werden, um die Protease und die Spaltprodukte zu entfernen. Bei der Aufreinigung über Protein A-Sepharose beeinträchtigen Immunglobuline, die im fötalen Kälberserum vorhanden sind, mit dem das Kulturmedium supplementiert war, die Reinheit der Präparation. Daher wurde das Medium der Expressionskultur nach der Anzucht der Klone auf die gewünschte Kulturgröße gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Nach 2-4 Tagen Inkubation in serumfreiem Medium konnte keine Beeinträchtigung der Expression festgestellt werden (**Abb. 12**). Nach der Aufreinigung über Protein A-Sepharose war LEIgG noch nicht rein genug für die Kristallisation, weshalb ein zweiter Aufreinigungsschritt erfolgen mußte. Mit der hierzu gewählten Affinitätssäule, die aus Sepharosegekoppeltem sTyr/sLeX-PAA bestand, wurde neben der Aufreinigung gleichzeitig sichergestellt, dass das aufgereinigte Protein bezüglich seiner Ligandenbindung funktionell war. Das vorgereinigte L-Selektin LEIgG war bindungsaktiv, d.h. es konnte an die sTyr-sLeX-PAA-Säule gebunden werden. Diese Bindung war durch Calcium-Chelatbildung mit EDTA wieder zu lösen, wodurch auch die für die Selektin-Ligandenbindung charakteristische Calcium-Abhängigkeit demonstriert wurde. Wurde aufgereinigtes LEIgG direkt nach der Aufreinigung durch SDS-PAGE und Silberfärbung kontrolliert, erschien die Präparation auf dem Gel homogen. Bei höher konzentrierten Proben und nach einigen Tagen Lagerungszeit bei 4°C änderte sich jedoch das saubere, homogene Erscheinungsbild. Unter diesen Bedingungen waren im silbergefärbten Gel mehrere Proteinbanden zu erkennen, die wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung entstanden waren. Bei diesem CHO-Zell-Expressionssystem gab es somit mehrere Faktoren, die das Ziel, kristallisierbares L-Selektin LE zu erhalten, behinderten. Die Expressionsrate war zwar ausreichend, aber dennoch nicht sehr hoch. Dieses Problem könnte man jedoch durch größere Kulturvolumen kompensieren. Es wären jedoch mindestens 5-10 Liter nötig gewesen, um ein einziges Milligramm L-Selektin zu erhalten. Weitere Verluste durch die Notwendigkeit mehrerer Aufreinigungsschritte und proteolytischer Spaltung müssten dabei noch hinzugezählt werden. Die Kultur hätte zunächst in Gegenwart von serumhaltigem Medium angezchtet werden müssen, um dann zur Expression in serumfreiem Medium weiterkultiviert zu werden. Diese Vorgehensweise war ökonomisch nicht sinnvoll. Weiterhin werden hohe Konzentrationen des Selektionsmittels benötigt, das während der Anzucht vorhanden sein muß.

Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen werden stabile Zelllinien üblicherweise nach ihrer Selektion in Anpassung an größere Kulturvolumina an serumfreie Medien und Suspensionskultur auf Microcarriern adaptiert (Coligan *et al.*, 1995). Dieser Prozeß ist langwierig und führt zunächst zu verminderten Expressionsraten während der Adaptionsphase. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die CHO-Zellen an Serumersatzstoffe zu adaptieren (nicht gezeigt). Dies war nicht erfolgreich, da die Adhärenz der Zellen und die Expressionsrate stark abnahmen. Um die Adaptionsphase zu umgehen, sind bereits an serumfreie Bedingungen adaptierte Zellen kommerziell erhältlich. Die Expression in an serumfreie Bedingungen adaptierte CHO-Zellen wurden für die

vorliegende Arbeit getestet, doch gelang die Etablierung stabiler Linien wegen der verminderten Adhäsivität der Zellen nicht (nicht gezeigt). Bei einer relativ geringen Expressionsrate sollte zunächst versucht werden, ein Expressionssystem zu finden, das eine höhere Expressionsrate bietet.

Daher wurde alternativ die Expression von LEHis und LEIgG in dem HEK293*Freestyle* Expressionssystem untersucht. In diesem System werden speziell adaptierte und selektionierte humane embryonale Nierenzellen (HEK = *human embryonic kidney*) verwendet, die serumfrei in Suspension unter Schüttelbedingungen kultiviert werden. Für die Proteinproduktion in größeren Maßstäben in Schüttelkultur oder Bioreaktorsystemen müssen die Zellen in Suspension vorliegen, da in großen Medienvolumen der Sauerstoffeintrag und die optimale Verteilung der Nähr- und Abfallstoffe gewährleistet werden muß. Eine hohe Expressionsrate wird in dem HEK293*Freestyle*-System durch transiente Proteinexpression über einen kurzen Zeitraum von nur 3-4 Tagen erreicht. Diese Methode ist ungleich schneller einsetzbar als die Etablierung von Einzelklonen, was viel Zeit und Selektionsmittel benötigt. Kurze Expressionsphasen, gefolgt von schneller Aufreinigung, gewährleistet zudem, daß das rekombinante Protein relativ frisch für Kristallisationsansätze eingesetzt werden kann. LEHis und LEIgG wurden in die HEK293F-Zellen transfiziert und die Expression untersucht. Es zeigte sich sogleich eine deutlich stärkere Expression als bei den zuvor getesteten CHO-Zellen (**Abb. 12**). In HEK293F-Zellen war es zudem möglich, die His-getaggte Variante von L-Selektin zu exprimieren, die wegen des kürzeren Tags für die Kristallisation im Gegensatz zu der IgG-Fusion bevorzugt verwendet werden sollte. Die Konzentration löslichen LEHis war zudem im HEK293F-System höher als jene von LEIgG. LEHis wurde in den Pilotexperimenten zu ca. 2,5 mg/L in HEK293F-Zellen exprimiert und konnte über Ni-NTA aufgereinigt werden. Dabei zeigten sich nach SDS-PAGE 4 Banden von ~19 bis ~32 kDa auf dem Gel (**Abb. 21**). Diese vier Banden wurden alle vom polyklonalen anti-L-Selektin Antikörper erkannt. Nach PNGase F-Verdau blieb nur die unterste Bande bei ca. 19 kDa erhalten. Damit wurde gezeigt, dass LEHis als Mischung aus vier unterschiedlich glykosylierten Formen exprimiert wird. Die Unterschiede des apparenten Molekulargewichtes korrelierten mit einer unterschiedlichen Anzahl besetzter Glykosylierungsstellen. Dies wurde durch das Bandenmuster von LEHis-Formen, die in ihren Glykosylierungsstellen systematisch mutiert worden waren, bestätigt (**Abb. 57**). In HEK293F-Zellen exprimiertes LEHis umfasste somit eine Form, welche vollständig mit drei *N*-Glykanen modifiziert war, eine Form mit zwei Glykanen, eine Form mit nur einer einzelnen besetzten Glykosylierungsstelle und nicht-glykosyliertes LEHis. Jedes *N*-Glykan trug dabei zu einer Erhöhung des apparenten Molekulargewichtes um ca. 4,3 kDa bei. Bei der rekombinanten Expression von L-Selektin-IgG-Chimären (Watson *et al.*, 1990) und gesamten extrazellulären L-Selektins (Fieger *et al.*, 2001) wurden solche sichtbaren Glykosylierungsstufen nicht beobachtet. Die größeren L-Selektin-Konstrukte erschienen wegen ihrer hohen Glykananteile als „Schmier“ über einen bestimmten Molekulargewichtsbereich auf SDS-PAGE-Gelen. Für andere rekombinante Glykoproteine jedoch, wie z.B. sCD 2, wurden nach Expression ebenfalls verschieden abgestufte Proteinbanden, die durch unterschiedliche Besetzung mit Glykanen entstehen, beobachtet (Davis *et al.*, 1993). In Abschnitt 4.3 werden die *N*-Glykane von L-Selektin weiterführend diskutiert.

Da sich LEHis in diesem Expressionssystem gut in ausreichenden Mengen exprimieren ließ und zudem mit schonenden Methoden aufreinigbar war, wurde von der weiteren Entwicklung einer

Aufreinigungsstrategie für LEIgG abgesehen. Die Expression und Aufreinigung von LEHis wurde anschließend optimiert und an die Erfordernisse für die Kristallisation angepaßt.

4.1.3 Aufreinigung von L-Selektin (LE)-Varianten

In einem ersten Schritt konnte LEHis aus dem Kulturüberstand transfizierter HEK293F-Zellen mittels Ni-NTA aufgereinigt werden (**Abb. 16**). Beim Hochskalieren der Expressionskultur und mit steigenden Mengen Kulturüberstand, der über die Ni-NTA-Säule gegeben wurde, mußte die Ni-NTA-Aufreinigung angepaßt werden, da die Ni-Ionen durch mit einem nicht weiter identifizierten Inhaltsstoff im Kulturmedium (Komplex-Bildung) von der Säule gespült wurden. Dieses Phänomen konnte dadurch behoben werden, dass dem Medium vor der Aufreinigung 1 mM NiSO₄ zugegeben wurde. Als nächstes wurde eine alternative spezifische Aufreinigungsmethode für L-Selektin gesucht, da die Kapazität der zur Verfügung stehenden sTyr/sLeX-PAA-Säule nur für ca. 100 µg Protein ausreichte. Durch den SELEX-Prozeß waren einzelsträngige DNA-Aptamere mit Bindungsspezifität für L-Selektin hergestellt worden (Hicke *et al.*, 1996) die für die Affinitätschromatographie geeignet waren (Romig *et al.*, 1999). Das Aptamer ist in der Lage, die sLeX-Bindungsstelle von L-Selektin zu blockieren. Analog zu den Angaben in der Literatur wurde die Basensequenz für das Aptamer für die vorliegende Arbeit kommerziell synthetisiert und biotinyliert und eine Aptamer-Affinitätsäule hergestellt. Die Reinigungsleistung war sehr gut, es ließen sich unspezifisch gebundenen Proteine in den Eluatfraktionen nachweisen. Außerdem erwies sich die Säule als kompatibel mit dem Elutionspuffer der Ni-NTA-Säule, was einen Dialyseschritt zwischen einzelnen Aufreinigungsschritten überflüssig machte (**Abb. 21B**). Dadurch können Verluste durch Zwischenschritte vermieden werden. Die Aptamersäule war erstaunlich stabil, es wurden selbst nach vielen Monaten wiederholter Benutzung keine Degradationserscheinungen beobachtet. Nach Aufreinigung großer Kulturvolumina war es jedoch nötig, die Säule unter stringenten Bedingungen zu waschen und zu regenerieren, um ihre hohe Reinigungsleistung aufrecht zu erhalten. Dafür war eine Inkubation mit 6 M Guanidiniumchlorid/0,2 M Essigsäure und 70 % Ethanol mit anschließenden ausführlichem Wasch- und Reäquilibrierungsschritten eine geeignete Methode. Auch nach wiederholter Reinigung unter diesen relativ harschen Bedingungen war keine Beeinträchtigung der Funktion der Aptamersäule zu erkennen.

Für die Aptamer-Affinitätschromatographie (AAC) der ungetaggtten LE-Variante 010 direkt aus dem Kulturüberstand wurden die Parameter zur optimalen Bindung an das Aptamer bestimmt. In der Originalveröffentlichung, die die Idee der Aptamer-Affinitätschromatographie vorstellte, wurde der pH-Wert für die Durchführung der AAC nicht genannt (Romig *et al.*, 1999). Kompetitive Bindungsstudien, die zeigten, dass das Aptamer die sLeX-Bindungsstelle von L-Selektin inhibiert, waren bei pH 8 durchgeführt worden (Hicke *et al.*, 1996). Bislang waren die Aufreinigungen über die Aptamersäule als nachfolgender Schritt nach der Ni-NTA-Chromatographie durchgeführt worden, und fanden daher bei dem für die Ni-NTA optimalen pH 8 statt. Bei der Untersuchung der Parameter für die AAC konnte allerdings festgestellt werden, dass ein pH-Wert von 8 zu nicht optimaler Reinigungsleistung führt. Bei pH 8 mussten höhere Konzentrationen EDTA eingesetzt werden, um LE 010 von der Säule zu eluieren. Zusätzlich konnten im Eluat der AAC, die bei pH 8 durchgeführt worden war, unspezifisch gebundene Proteine nachgewiesen werden. NaCl-Konzentrationen von

mehr als 150 mM, die bei der Ni-NTA-Chromatographie verwendet wurden, um unspezifische Bindungen zu verringern, zeigten sich ebenso als nicht mit der AAC kompatibel. Die besten Reinigungserfolge bei der AAC wurden bei pH 7 und 150 mM NaCl beobachtet (**Abb. 43**). Dabei reichte eine EDTA-Konzentration von 20 mM im Elutionspuffer für die Auflösung der Bindung aus.

4.1.4 Trennung der Glykoformen von L-Selektin

Für die Kristallisation wird möglichst homogenes Protein benötigt. Da LEHis als Gemisch von vier Formen mit unterschiedlicher Anzahl besetzter Glykosylierungsstellen exprimiert wurde, mußte ein Weg gefunden werden, nur eine einzelne Form zu erhalten. Da die Glykoformen auf dem SDS-Gel unterschiedliche apparente Molekulargewichte zeigten, wurde zunächst versucht, diese mittels Gelfiltration zu trennen. Auf einer Sephadex 75 (10/30) Säule konnten die Glykoformen nicht getrennt werden (**Abb. 22**). In **Abb. 27** wurde die Anionenaustauschchromatographie von LEHis gezeigt, mit deren Hilfe zwar die PNGase F abgetrennt werden konnte, nicht jedoch das restliche glykosylierte L-Selektin. Andere in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigten Versuche mit Anionenaustauschern waren ebenfalls nicht zur Trennung der Glykoformen geeignet. Die Heparin-Affinitätschromatographie ist zugleich ein Kationenaustauscher und eine Ligandenaffinitätssäule. Mittels Heparin-Chromatographie konnten die Glykoformen teilweise getrennt werden. Diese Methode schien Erfolg versprechend, daher wurden die Versuchsbedingungen bei einer Reihe unterschiedlicher Puffer, verschiedener Gradienten und Fraktionsgrößen variiert (nicht gezeigt). Es konnte jedoch keine vollständige saubere Trennung der Glykoformen erreicht werden. Die Trennung der Glykoformen sollte bei einem Ionenaustauscher aufgrund der Ladung der Glykane erfolgen, da das Proteingerüst in der Mischung gleich sind. Möglicherweise gibt es Überschneidungen in den Ladungszuständen zwischen den Glykoformen. Vorstellbar ist, dass einfach glykosyliertes LEHis den gleichen Ladungszustand hat wie ein zweifach glykosyliertes LEHis, bei dem nur ein Glykan eine geladene Seitenkette besitzt. Geladene Strukturen auf N-Glykanen sind zum Beispiel Sialinsäurereste oder Sulfatreste. Solche Modifikationen wurden bei der Glykananalyse auch gefunden (s. Abschn. 3.14). Die chromatographische Trennung der Glykoformen war somit mit den versuchten Methoden nicht möglich.

4.1.5 Verminderung der Glykosylierung von L-Selektin

Nachdem die chromatographische Trennung der unterschiedlich glykosylierten LEHis-Formen nicht möglich war, wurden andere Strategien mit dem Ziel, die N-Glykosylierung von LEHis zu vermindern, verfolgt. Dazu wurde zunächst versucht, die N-Glykane enzymatisch durch Einsatz von PNGase F zu entfernen. Bei allen getesteten Bedingungen war die Abspaltung der N-Glykane jedoch nicht vollständig zu erreichen. Auf dem SDS-PAGE-Gel konnte weiterhin eine schwache Proteinbande zusätzlich zu der Bande, die nicht-glykosyliertes LEHis repräsentierte, nachgewiesen werden. Durch Einsatz höherer Enzymmengen oder verlängerter Inkubationszeiten konnte dieses Ergebnis nicht verbessert werden. Oft lassen sich Glykoproteine nur unter denaturierenden Bedingungen vollständig deglykosylieren. Ein denaturierender Ansatz kam hier hingegen nicht in Frage, da das Protein anschließend kristallisiert werden sollte. Interessanterweise ließ sich LEHis

unter nativen Bedingungen teilweise deglykosylieren, ohne Aggregate zu bilden, was ein Hinweis darauf ist, daß die N-Glykane von L-Selektin nicht für die Erhaltung der Löslichkeit notwendig sind. Da eine vollständige Deglykosylierung nicht möglich war, war es notwendig, eine weitere Aufreinigung durchzuführen, um die verbleibenden glykosylierte Formen von der deglykosylierten Form abzutrennen. Mithilfe einer Gelfiltration oder Ionenaustauschchromatographie ließen sich die Glykoformen nicht sauber trennen (s. Abschn. 3.4.5). Daher wurde eine Trennung mittels Lektin-Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose versucht (nicht gezeigt), womit es jedoch nicht möglich war, die verbleibenden glykosylierten Formen von LEHis zu binden. Das Lektin Concanavalin A (ConA) bindet *high mannose*, hybride und bestimmte komplexe Glykane (Kobata and Endo, 1992). Neben dem „*bisecting*-GlcNAc“ (s. 1.4) inhibiert auch die Fucosylierung von N-Acetyl-Glucosaminresten an einem äußeren Arm der Antennen die Bindung an ConA. Solche fucosylierten GlcNAc-Reste wurden bei der Glykananalyse von LEHis in der vorliegenden Arbeit gefunden (3.14). Daher ist es wahrscheinlich, dass verbleibendes LEHis mit solchen antennär fucosylierten Glykanen modifiziert war, die nicht von der ConA-Sepharose gebunden wurden.

PNGase F konnte jedoch leicht durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose von L-Selektin abgetrennt werden. Durch die nachträgliche enzymatische Behandlung mit PNGase F und erneute Aufreinigung verringert sich allerdings die Gesamt-Proteinausbeute und verlängerte die Zeit bis zum Kristallisationsansatz. Um solche zusätzlichen Schritte zu vermeiden, wurde versucht, die Glykosylierung direkt während der Biosynthese zu inhibieren. In einer weiteren Gruppe von Versuchen wurde der Expressionskultur 24 Stunden nach der Transfektion Tunicamycin (TM) zugesetzt. Die 24 Stunden Vorinkubation waren notwendig, um eine erfolgreiche Transfektion zu gewährleisten. In mehreren Vorversuchen war dieser frühest mögliche Zeitpunkt der Tunicamycin-Zugabe bestimmt worden (nicht gezeigt). LEHis wurde in Gegenwart von Tunicamycin in nicht-glykosylierter Form in den Kulturüberstand sekretiert und ließ sich aus dem Kulturüberstand erfolgreich mittels Ni-NTA bzw. sTyr/sLeX-PAA aufreinigen (**Abb. 28**). In der Eluatfraktion dieser Aufreinigung waren allerdings noch Spuren von glykosyliertem LEHis nachweisbar. Wie bei der enzymatischen Deglykosylierung bestand somit weiterhin die Notwendigkeit der Abtrennung der verbleibenden glykosylierten LEHis-Formen, die bis zum Zeitpunkt der Zugabe von Tunicamycin bereits gebildet worden waren. Um diesen Anteil bereits gebildeter glykosylierter Proteine aus dem Kulturüberstand auszuschließen, wurde das Kulturmedium vor der TM-Zugabe ausgetauscht. Diese Vorgehensweise ist allerdings nur in kleinem Maßstab praktikabel und nicht für eine große Expressionskultur geeignet. Die Expressionsrate wurde zudem durch den Einfluß von Tunicamycin drastisch herabgesetzt (**Abb. 29**). Diese Herabsetzung der Expressionsstärke hätte durch größere Kulturvolumina ausgeglichen werden müssen, die allerdings die vorhandenen Kapazitäten überstiegen.

Als dritte Strategie zur Verminderung der Glykosylierung wurden die 3 Glykosylierungskonsensussequenzen von LEHis durch zielgerichtete Mutagenese einzeln und in allen möglichen Kombinationen ausgeschaltet (**Abb. 30**). Nach Expression und Aufreinigung dieser Glykosylierungsmutanten konnten Varianten identifiziert werden, die die gewünschte verminderte N-Glykosylierung aufwiesen. Bei den Mutanten LEHis 010 und 100 wurde jeweils nur eine einzelne, einfach glykosylierte Form in den Kulturüberstand sekretiert, da die Sekretion von nicht-

glykosyliertem LEHis in diesen Fällen durch die Mutation N139Q unterdrückt wurde (s. Diskussion in Abschn. 4.3.1). Die nicht-glykosylierte Variante LEHis 000(S) mit den Aminosäureaustauschen N22Q, N66Q und N139S (s. 4.3.1) konnte im Kulturüberstand nach Auftrennung mittels SDS-PAGE ebenso in Form einer einzelnen Bande nachgewiesen werden (**Abb. 32**). Die Varianten LEHis 000(S) und 100 hatten eine deutlich schwächere Sekretionsrate als 010 (**Abb. 58**). Daher wurde als Grundlage für eine Optimierung des Expressionssystems die Variante 010 für die Kristallisation ausgewählt. Die Proteinbande von LEHis 010 erschien nach Aufreinigung bei der Kontrolle durch SDS-PAGE und Silberfärbung homogen. Mittels Massenspektrometrie zeigte sich jedoch, dass das verbleibende *N*-Glykan eine Mikroheterogenität aufwies (s. Abschn. 3.14.2).

4.1.6 Optimierung des Expressionssystems und Anpassung an größere Kulturvolumina

Das Expressionssystem mußte optimiert und für das Ziel, LEHis im Milligramm-Maßstab herzustellen, angepaßt werden. Die Stärke der Expression in HEK293F-Zellen war abhängig von einer niedrigen Passagenzahl der Zellen. Die anfänglich im 30 ml-Maßstab erreichten Expressionsraten von ca. 2,5 mg/L konnten im größeren Maßstab nicht erreicht werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Expansion der Zellsuspension auf höhere Volumina mehrere Passagen durchgeführt werden müssen, wonach die Zellen zum Zeitpunkt ihrer Transfektion eine höhere Passagenzahl aufweisen als frisch aufgetaute Zellen, die nach nur 1-2 Passagen im kleinen Maßstab transfiziert werden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung bestätigt, dass auch im kleineren Maßstab die Expressionsrate niedriger war, wenn die Zellen einige Male passagiert worden waren. Eine weitere Verringerung der Expression wurde beobachtet, wenn die Zellen im 6-well-Format transfiziert wurden, beispielsweise um Transfektionsbedingungen miteinander zu vergleichen. Dort wurden lediglich maximale Expressionsraten von ~160 µg/L erreicht. Die maximal erreichte Expressionsrate in allen Versuchen lag zwischen 0,5 mg/L und 2,5 mg/L. Diese erreichte Expressionsstärke ist im Vergleich zu der in der Literatur üblicherweise als hoch eingestuft von 20-200 mg/L als eher niedrig einzustufen. Der Hersteller gibt zur Expressionsrate von β -Galactosidase im *Freestyle*-System einen Wert von 200 mg/L an (Invitrogen).

Die anfänglich bestimmten Expressionsraten von maximal 2,5 mg/L konnten nicht im Liter-Maßstab erreicht werden, woraus die Notwendigkeit erwuchs, wiederholte Transfektionen an der Kapazitätsgrenze von 4 L Kulturvolumen durchzuführen. Für wiederholte transiente Transfektion in diesem Maßstab war das Transfektionsreagenz *293fectin*, das Teil des *Freestyle*-Expressionssystems war, aufgrund seiner hohen Kosten wirtschaftlich nicht vertretbar. Es wurden daher einige Transfektionsreagenzien in ihrer Effizienz in diesem System verglichen. Neben der Calciumphosphat-Methode ist nur noch die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) sehr kostengünstig (Durocher *et al.*, 2002; Ehrhardt *et al.*, 2006). Die Effizienz jedes Transfektionsreagenz hängt unter Anderem von der effektiven Komplexbildung des Reagenz mit der Plasmid-DNA ab. Daher wurden die Test-Transfektionen mit jedem der Transfektionsreagenzien in einer Reihe verschiedener Bedingungen durchgeführt. Nach den Transfektionen unter Einsatz von PEI wurden in der Western Blot Analyse der Kulturüberstände die stärksten LEHis-Signale detektiert (**Abb. 19**). In

diesem Versuch lag das optimale DNA:PEI-Verhältnis bei etwa 1:4. In weiteren Versuchen konnte dieses Optimum reproduziert werden; es bewegte sich stets zwischen 1:4-1:5 (vgl. auch **Abb. 20**). Da das optimale DNA:PEI-Verhältnis für jedes individuelle Plasmid verschieden ist, war es notwendig, dieses für das später genutzte, ungetaggte LE-Konstrukt neu zu bestimmen. Für LE 010 lag das zur Transfektion optimale DNA:PEI-Verhältnis bei 1:3-1:3,5 (**Abb. 39**).

Bei der Analyse der L-Selektin-cDNA-Sequenz wurde beobachtet, dass das native Signalpeptid von L-Selektin nicht als solches von dem Vorhersageprogramm „SignalP“ (Bendtsen *et al.*, 2004) erkannt wurde. Sollte dieser *in silico*-Befund auch auf die *in vivo*-Situation zutreffen, könnte dies zu einer verminderten Sekretionseffizienz führen. Es wurde daher untersucht, ob ein Signalpeptid eines anderen Proteins, das in dem verwendeten Expressionssystem eine hohe Expressionsrate aufwies, zu einer Erhöhung der Sekretionsrate von LEHis führen kann. Um diese Idee zu testen, wurde in dem Expressionsplasmid von LEHis das native Signalpeptid gegen jenes von CD30 ausgetauscht. Zusätzlich wurden weitere Modifikationen am Translationsstart von LEHis, mit dem Ziel, die Expressionsrate zu steigern, vorgenommen. Das L-Selektin-Konstrukt aus den Vorarbeiten (Fieger, 1997), das als Basis für alle anderen Konstrukte diente, hatte ein längeres Signalpeptid. Dies wurde für die Varianten „1ATG“ und „Kozak“ wie in Abschn. 5.2.12 beschrieben verkürzt, da der Translationsstart vermutlich an einem weiter 3' liegenden Startcodon lag. Für diese Annahme spricht, dass das Startcodon der verkürzten Konstrukte gegenüber der längeren Variante in 5'-Richtung eine optimale Kozaksequenz besitzt. Nach Transfektion der modifizierten Konstrukte konnte bei keiner der getesteten Varianten eine deutliche Verstärkung der Expression nachgewiesen werden. Bei dem Konstrukt, das das Signalpeptid von CD30 enthielt, war die schwächste Expressionsrate mittels ELISA bestimmt worden. Somit konnte die Annahme nicht bestätigt werden, dass das Signalpeptid von CD30 einen effektiveren Translationsstart ermöglichen und somit eine stärkere Sekretion von LEHis bewirken könnte. Ebenso ist das Signalpeptid von L-Selektin offenbar nicht für die relativ geringe Expression des LEHis-Konstruktes verantwortlich.

Nachdem das Expressionssystem zur Expression größerer Mengen LEHis etabliert war und erste Kristallisationsscreens keine Kristalle erbrachten, wurden verschiedene Ansätze zur Entfernung des Affinitätstags verfolgt. Eine Variante von LEHis, die zwischen der L-Selektin Sequenz und dem His-tag eine Thrombinschnittstelle enthielt, konnte zwar exprimiert und aufgereinigt, jedoch nicht mit Thrombin geschnitten werden (**Abb. 37**). Vermutlich war die Schnittstelle in diesem Konstrukt nicht zugänglich, denn die Funktionalität des Thrombins war gegeben, wie unter den verwendeten Bedingungen an einem anderen Protein kontrolliert worden war (nicht gezeigt). Da die für L-Selektin spezifische Aptamer-Affinitätssäule zur Aufreinigung zur Verfügung stand, ergab sich die Möglichkeit, auf ein Affinitätstag zu verzichten. Um diese Möglichkeit zu testen wurde das LE 010-Konstrukt ohne Affinitätstag kloniert und in HEK293F-Zellen transfiziert. LE 010 ohne Affinitätstag konnte mithilfe der AAC in einem Schritt aus dem HEK293F-Kulturüberstand aufgereinigt werden (**Abb. 38**). Darüberhinaus war es funktionell aktiv, wie durch Bindung an die sTyr/sLeX-Säule demonstriert wurde (**Abb. 38**). Somit wurde dieses neue, ungetaggte LE 010 als Grundlage für die weitere Optimierung des Expressionssystems herangezogen.

In dem zur Verfügung stehenden Schüttelbrutschrank waren 15 Plätze für 1 L-Erlenmeyerkolben vorhanden, in denen die HEK293F-Zellen kultiviert wurden. Es war nötig, diese

Kapazität maximal auszunutzen, um die nötige Menge Expressionskultur zu inkubieren. Dazu mußte getestet werden, ob eine Expressionskultur in einem als maximal angesetzten Volumen von 400 ml für jeden 1 L-Kolben zu einer ausreichenden Proteinausbeute führt. Daher wurde der Einfluß der Füllhöhe der Erlenmeyerkolben und die Dichte der ausgesäten Zellen auf die Vitalität, Aggregatbildung, das Wachstum und die Proteinexpression untersucht. Wie in **Abb. 40C** gezeigt war, hing die Aggregatbildung von der Füllhöhe des Kolbens ab. Bei 300 ml und 9×10^5 Z/ml wurden die wenigsten Aggregate beobachtet. Gleichzeitig wurde bei diesem Volumen die stärkste Proteinexpression gemessen. Auch in dem Handbuch des Herstellers (Invitrogen) wird darauf hingewiesen, dass das Wachstum der HEK293F-Zellen möglichst in Form einzelner Zellen anzustreben ist. Die Vitalität und das Zellwachstum verringerte sich mit steigendem Kulturvolumen, jedoch hatte eine geringere Vitalität oder geringeres Wachstum keinen negativen Einfluß auf die Proteinexpression. Die Aggregatbildung wurde ebenfalls von der Schüttelfrequenz beeinflusst, wobei jedoch die Grenze zu finden war, an der die Zellen bedingt durch zu hohe Scherkräfte das Wachstum einstellten. In dem zur Verfügung stehenden Schüttler war der Kompromiß zwischen einigen Zellaggregaten und zu hohen Scherkräften bei 96 ± 4 rpm ermittelt worden. Diese Untersuchungen wurden an einer Serie von Kulturkolben durchgeführt und geben daher einen ersten Eindruck und keine signifikante Darstellung von Zusammenhängen. Es konnte hierdurch aber ermittelt werden, dass nicht unbedingt hohe Wachstumsraten anzustreben sind, um eine hohe Proteinexpression zu erreichen. Somit konnten die Kulturkolben mit 400 ml Volumen beschickt werden, ohne dass es zu großen Einbußen in der Proteinexpression kam.

4.2 **Kristallisation der L-Selektin Variante LE 010**

Die L-Selektin Variante LE 010 konnte erfolgreich kristallisiert werden. Nachdem erste Kristallisationsbedingungen gefunden waren, wurden auch der Wildtyp 111 und das nichtglykosylierte 000(S) bei dieser und einer Reihe ähnlicher Kristallisationsbedingungen getestet. Diese Varianten kristallisierten nicht. Möglicherweise kam dem Glykan an Position 66 eine konformationsstabilisierende Rolle zu, die die Kristallisation ermöglichte.

Die anfänglich erhaltenen Mikrokristalle ergaben nach Messung an der hauseigenen Drehanode im Institut für Kristallographie (FU Berlin) ein viel versprechendes Beugungsmuster, so dass eine Reihe von Versuchen unternommen wurden, die Auflösung des Beugungsmusters zu verbessern. Die anfänglich erhaltenen Kristallisationsbedingungen unterschieden sich kaum von jenen, die nach den Ergebnissen einiger *Fine Screens* reproduzierbar Kristalle erbrachten. Nach diesen *Fine Screens* wurden einzig das Ammoniumacetat aus den initialen Screens durch Ammoniumsulfat ersetzt. Die Kristallstruktur von L-Selektin ist nur im Zusammenhang mit einem gebundenen Liganden biologisch informativ. Des weiteren können Liganden zu einer Stabilisierung der Konformation im Kristall führen und so eine höhere Auflösung ermöglichen. Daher wurde versucht, das Aptamer, das sich für die Aufreinigung bereits bewährt hatte, zusammen mit LE 010 zu kristallisieren. Das Aptamer ist zwar kein physiologischer Ligand, blockiert aber die sLeX-Bindungsstelle und kann in vivo die Leukozytenextravasation inhibieren (Hicke *et al.*, 1996). Der Komplex von LE 010 mit dem Aptamer wurde gefiltert, um überschüssiges Aptamer abzutrennen.

Der *Peak* im Chromatogramm war weniger symmetrisch wie jener von LE 010, allerdings war der *Peak* deutlich gegenüber dem des LE 010 verschoben, was auf eine erfolgreiche Komplexbildung hinwies (**Abb. 47**). Zudem konnte das Aptamer in den *Peak*fraktionen nach nativer PAGE durch Ethidiumbromidfärbung im Gel nachgewiesen werden. Nach Einsatz dieser Probe in Kristallisationsscreens konnten Kristalle gefunden werden, doch erzeugten diese leider kein Beugungsmuster.

Das Tetrasaccharid sialyl Lewis X (sLeX) konnte den Kristallisationsansätzen einfach zugefügt werden, wodurch das Kristallwachstum nicht beeinträchtigt wurde. Aufgrund fehlender Nachweismethoden für sLeX konnte nicht nachgewiesen werden, ob der Ligand in der Lösung oder im Kristall tatsächlich an L-Selektin gebunden vorlag. Dies würde man erst nach Auflösung der Röntgenstruktur erkennen können. Für die folgenden Kristallisationsansätze wurde anschließend immer sLeX zu der Proteinlösung hinzugegeben. Das Screening nach Additiven war erfolgreich. Die Zugabe von Praseodym(III)Acetat führte dazu, dass die Kristalle deutlich größer wuchsen. Durch die so verbesserten Kristalle und verbesserte Meßbedingungen am ESRF in Grenoble konnte die anfängliche Auflösung von ~ 14 Å auf eine maximale Auflösung von ~ 7 Å verbessert werden. Dieser Wert war allerdings für eine Strukturbestimmung nicht ausreichend. Es wurde weiterhin versucht, LE010 nach reduktiver Methylierung zu kristallisieren (Rauert *et al.*, 2007) oder *in situ* mit α -Chymotrypsin zu verdauen (Dong *et al.*, 2007). Nach Durchführung dieser Methoden konnten allerdings keine Kristalle in den Screenings erhalten werden. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung des Proteinanteils von LE 010, das zur Kristallisation verwendet wurde, konnten keine ungewöhnlichen Modifikationen oder Peptid-Heterogenitäten detektiert werden, die eine Erklärung für die nicht zu verbessernde Qualität der Kristalle bieten würden. Die Primärsequenz entsprach ebenfalls der Erwartung. Einzig das *N*-Glykan an Asparagin 66 besaß eine Mikroheterogenität, wie auch bei der Glykananalyse in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde (3.14). Vermutlich bewirkt eben diese Mikroheterogenität des *N*-Glykans, dass die Auflösung des Beugungsmusters von LE 010 Kristallen nicht verbessert werden konnte.

Während sich die Versuche für die vorliegende Arbeit bereits auf die Verfeinerung der erhaltenen Kristalle konzentrierten, wurden Kristallstrukturdaten von L-Selektin, das die Lektin- und EGF-Domäne umfasste und ohne gebundenen Liganden vorlag, in die *RCSB Protein Data Base* eingepflegt (Mehta and McEver, 2008). Nachdem nun die Struktur des freien L-Selektins bekannt war, wurden Versuche unternommen, diese Struktur nach der Methode des molekularen Ersatzes auf die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten von LE 010-Kristallen im Komplex mit sLeX anzuwenden. Es konnten dabei jedoch keine strukturellen Details wie Seitenkettenorientierungen aufgelöst werden.

Aus dem Datenblatt der veröffentlichten Kristallstruktur (PDB Code 3CFW) ließ sich ersehen, dass die Autoren L-Selektin (LE) in einer CHO-Zelllinie exprimiert hatten, welche einen Defekt in der *N*-Acetyl-Glucosaminyltransferase I (GlcNAc-TI) besaß (CHO *Iec1* Zellen (Stanley *et al.*, 1975)). Glykanen aus diesen Zellen werden nicht zu komplexen Glykanstrukturen aufgebaut. Im Wildtyp überträgt die GlcNAc-TI einen GlcNAc-Rest auf das aus 2 GlcNAc-Resten und 5 Mannoseresten bestehende Vorläuferglykan. Da dieser Weg in CHO *Iec1*-Zellen durch eine nichtfunktionelle GlcNAc-TI inhibiert ist, sollte die Glykanstruktur von rekombinant in diesen Zellen exprimierten

Glykoproteinen somit weiterhin aus 2 GlcNAc-Resten und 5 Mannoseresten bestehen. Weitere Glykosyltransferasen sind von dem vorhergehenden Schritt abhängig, da das Vorläuferglykan kein Substrat für die Enzyme ist, die im Biosyntheseweg der GlcNAc-TI nachfolgen. Im Gegensatz zu Glykanstrukturen aus wildtypischen CHO-Zellen sind die Glykanstrukturen aus CHO/*lec1*-Zellen somit deutlich homogener und könnten zu einer höheren Auflösung eines Röntgenbeugungsmusters führen. Analog zu den Angaben in der PDB-Datenbank wurde daraufhin versucht, L-Selektin LE 111 in CHO *lec1* Zellen zu exprimieren. Es konnten jedoch in unserem Falle keine ausreichenden Ausbeuten erhalten werden, um das Protein in Kristallisationsscreens einzusetzen. Auch mit einem IgG-Fusionsprotein, das mit einer Thrombinschnittstelle versehen war, konnten trotz der Etablierung von stabilen Klonzelllinien keine guten Ausbeuten erreicht werden. Daher konnten in unserem Labor bislang keine Kristallisationsscreens mit LE aus CHO *lec1* Zellen durchgeführt werden.

In der Literatur gibt es Beispiele für erfolgreiche Kristallisation und Strukturaufklärung von Glykoproteinen, die in CHO *lec*-Zelllinien produziert wurden. So wurde eine lösliche Form des Glykoproteins CD2 in einer CHO *lec*-Zelllinie (CHO *lec3.2.8.1* (Stanley *et al.*, 1975)) exprimiert, zur Kristallisation gebracht die Röntgenstruktur erfolgreich gelöst. Die Glykane wurden als Man5GlcNAc2 identifiziert und waren somit Endoglykosidase H-sensitiv. Dennoch wurden die Glykane hierbei vor der Kristallisation enzymatisch entfernt (Bodian *et al.*, 1994; Davis *et al.*, 1993). Es kann nach Expression in einer Zelllinie, die definierte einfache Glykanstrukturen ausbildet, also trotzdem nötig sein, die Glykane zu entfernen. Durch Verdau mit Endoglykosidase H bleibt ein GlcNAc-Rest am Asparaginrest der Konsensussequenz erhalten. Bei der Abspaltung von N-Glykanen durch PNGase F hingegen wird das gesamte N-Glykan abgespalten und der Asparaginrest zu einem Asparaginsäurerest umgewandelt. Eventuell ist der verbleibende GlcNAc-Rest nach Endoglykosidase H-Verdau eben jener Faktor, der die Kristallisation nach Deglykosylierung ermöglicht. In einer biochemischen Studie konnte ein konformationsstabilisierender Effekt der Basis-GlcNAc-Einheiten am Beispiel der Adhäsionsdomäne von CD2 aufgezeigt werden (Hanson *et al.*, 2009). Sollte eine Möglichkeit gefunden werden, L-Selektin in ausreichenden Mengen in CHO *lec1* Zellen zu exprimieren, so sollte man also einen Versuch unternehmen, die Glykane mithilfe von Endoglykosidase H abzuspalten und anschließend Kristallisationsscreens durchführen.

Zwei weitere Unterschiede zu der Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit und den Autoren, die die Kristallstruktur erfolgreich lösen konnten, sind aus dem Datenblatt zu ersehen. Mehta *et al.* verwendeten das Expressionsplasmid pEE14, das ein Glutaminsynthetase-Gen enthält. Mit diesem Plasmid ist es möglich, durch Titration mit Methionin-Sulfoximin (MSX) eine Genamplifikation und somit eine höhere Expressionsrate zu erzielen (Cockett *et al.*, 1990). Zweitens gibt es in der Sequenz des kristallisierten L-Selektin-Konstruktes im C-terminalen Bereich geringe Abweichungen zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten. Während das ungetaggte LE 010 auf die Aminosäuresequenz (...)QCQFVI endet, befindet sich am C-Terminus des von Mehta *et al.* verwendeten L-Selektin die Sequenz (...) QCQFVQVDPRLID. Die letzten 8 Aminosäuren wurden als Expressionstag beschrieben und entstammen dem Protein C. Über dieses *tag* können Proteine mithilfe einer Affinitätsäule mit einem monoklonalen Antikörper (HPC4 z.B. von Roche) aufgereinigt werden. Diese beiden Unterschiede zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukte und Methoden könnten zur Verbesserung der Expressionsrate beigetragen haben und somit die

erfolgreiche Kristallisation mit hoher Auflösung ermöglicht haben.

Mithilfe der CD-Spektroskopie konnte die strukturelle Integrität des in der vorliegenden Arbeit aufgereinigten LE 010 bestätigt werden. Die Stabilität war innerhalb von 15-37°C gegeben. Erst ab 42°C konnte eine beginnende Denaturierung festgestellt werden. Nach vollständiger Denaturierung ab 65°C fiel Protein aus der Lösung aus konnte nicht renaturiert werden. Da nun die Kristallstruktur veröffentlicht worden war, konnten die beschriebenen Anteile an α -Helices und β -Faltblattstrukturen mit den in der CD-Spektroskopie gemessenen verglichen werden. Der Anteil α -helikaler Strukturen wurde in der Kristallstruktur als 14 % angegeben. Aus den CD-Spektren von LE 010 wurden 18 % berechnet. Diese beiden Werte befinden sich innerhalb ähnlichen Bereiches. Der Anteil von β -Faltblattstrukturen war für die Kristallstruktur als 32 % angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden 31,28 % errechnet, was sehr gut mit den Werten für L-Selektin aus der Datenbank übereinstimmt. Zusammen mit der Bindungsfähigkeit des Konstruktes an seinen Liganden und an das L-Selektin spezifische Aptamer scheint es wahrscheinlich, dass das in der vorliegenden Arbeit benutzte Konstrukt in seiner nativen Konformation vorlag.

4.3 Charakterisierung der LEHis Glykosylierungsmutanten

L-Selektin besitzt 7 potentielle N-Glykosylierungsstellen in seiner extrazellulären Domäne. Über die Funktion der Glykane von L-Selektin ist bislang nur wenig bekannt. 1991 konnte gezeigt werden, dass L-Selektin auf der Spitze der Mikrovilli von Neutrophilen mit sLeX dekoriert ist, wodurch sich die Möglichkeit ergibt, dass L-Selektin hierdurch als Ligand für die endothelialen Selektine E- und P-Selektin fungieren kann (Picker *et al.*, 1991). Einige Jahre später konnte die direkte Bindung von E-Selektin an L-Selektin nachgewiesen werden (Zollner *et al.*, 1997). Inwieweit diese Bindung eine Rolle bei der Extravasation spielt, ist durch das Zusammenspiel vieler verschiedener Adhäsionsmoleküle, die sich in ihrer Funktion ergänzen, schwierig aufzulösen. L-Selektin, das ebenfalls in löslicher und funktionell aktiver Form im Blutserum zu finden ist, weist abhängig von seinem Ursprung unterschiedliche Molekulargewichte auf, die sich durch Modifikation mit Zelllinien-spezifischen N-Glykanen erklären lassen (Griffin *et al.*, 1990; Prystas *et al.*, 1993; Tedder *et al.*, 1990) (vgl. 1.7.3). Die physiologische Funktion veränderter Glykosylierung von L-Selektin ist bislang nicht bekannt.

Bei der Herstellung rekombinanten L-Selektins für biochemische und therapeutische Zwecke können verschiedene Produktions-Zelllinien zum Einsatz kommen, die über unterschiedliche Enzymausstattungen verfügen und somit zu veränderter Glykosylierung des rekombinanten Proteins führen können. Eine veränderte Glykosylierung kann wiederum einen Einfluss auf die Stabilität, Expressionsrate, Struktur und Funktion haben (Conradt *et al.*, 1995; Cumming, 1991). Daher ist es notwendig, die Glykane und den Einfluss unterschiedlicher Glykanstrukturen auf die Funktion zu charakterisieren. Die N-Glykane von rekombinatem sL-Selektin aus BHK und K562-Zellen waren als Ganzes charakterisiert worden (Fieger *et al.*, 2001; Gohlke *et al.*, 1999; Gohlke *et al.*, 2000). Abhängig von der exprimierenden Zelllinie hatte sL-Selektin unterschiedliche Ladungszustände und Ligandbindungseigenschaften. Die Bedeutung und Besetzung der einzelnen Glykosylierungsstellen hingegen war nicht untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit beziehen sich die Versuche zur Charakterisierung der *N*-Glykane auf die ersten drei Glykosylierungsstellen von L-Selektin, die innerhalb der Lektin- und EGF-Domäne liegen.

4.3.1 Expression und Sekretion von LEHis Glykosylierungsmutanten

Durch zielgerichtete Mutagenese der Glykosylierungs-Konsensussequenzen von LEHis, sowohl einzeln als auch in Kombination, wurden alle 8 möglichen Glykosylierungsvarianten von LEHis hergestellt und zur leichteren Identifizierung mit einem Drei-Ziffern-Code versehen (**Abb. 30**). Alle Mutanten wurden in HEK293F-Zellen exprimiert. In der Western Blot Analyse des Kulturüberstandes und der Zellysate konnte jeweils die entsprechend ihrer möglichen Glykosylierungsstufen erwartete Anzahl von Proteinbanden detektiert werden (**Abb. 31**). Allerdings bildeten jene Varianten eine Ausnahme, die die Mutation N139Q enthielten. Bei diesen fehlte jeweils die ~19 kDa-Bande, die nicht-glykosyliertes LEHis repräsentiert. Daher konnte bei LEHis 000 keine Proteinbande im Kulturüberstand detektiert werden, da bei dieser Variante keine intakte Glykosylierungsstelle vorhanden war. Im Zellysate jedoch konnte die erfolgreiche Expression von LEHis 000 nachgewiesen werden. LEHis 000 wurde also in den Zellen synthetisiert, konnte aber nicht sekretiert werden. Da nicht-glykosylierte Formen von L-Selektin z.B. synthetisch in Gegenwart von Tunicamycin oder auch unter normalen Kulturbedingungen, sekretiert wurde und im Zellkulturüberstand nachweisbar war, schien es unwahrscheinlich, dass das fehlende Glykan die Ursache für die fehlende Sekretion war. So enthielten die Glykoformen von LEHis 111, 011, 101 und 001 nicht-glykosyliertes LEHis, repräsentiert durch die Proteinbande bei ~19 kDa. Wie erwähnt, fehlte die nicht-glykosylierte Form nur bei den Varianten, die die Mutation N139Q trugen (110, 010, 100 und 000). Dies sprach dafür, daß die ausgetauschte Aminosäure an dieser Stelle ungünstig war und verhinderte, dass Protein sekretiert wurde. Interessanterweise wurde die Sekretierbarkeit der entsprechenden Glykosylierungsmutante durch Anheftung von mindestens einem *N*-Glykan an anderer Stelle innerhalb des Proteins wiederhergestellt. So war zum Beispiel bei der Mutante 010 nur eine einzige Proteinbande, jene von einfach glykosyliertem LEHis, im Überstand nachzuweisen. Die Mutation N139Q führte hierbei dazu, dass der nicht-glykosylierte Anteil von LEHis 010 in den Zellen verblieb und das Glykan an Position N66 führte dazu, dass die einfach glykosylierte Form von LEHis 010 sekretiert wurde. Dies macht deutlich, dass Glykane dabei helfen können, Proteine in den sekretorischen Weg zu leiten, die ohne Glykan in der Zelle zurückgehalten worden wären. Bei 001 waren somit zwei Formen im Überstand zu sehen, denn hier war die Glykosylierungsstelle an N139 unberührt und es konnte daher nicht-glykosyliertes und einfach glykosyliertes LEHis sekretiert und im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

Die Aminosäuresequenzen der EGF-Domänen sind innerhalb der Familie der Selektine und zwischen verschiedenen Spezies sehr ähnlich. Die Sequenzen von Selektinen aus verschiedenen Spezies wurden verglichen und dahingehend untersucht, ob es an homologer Stelle zu N139 von L-Selektin eine alternative Aminosäure gibt, die zu funktionellem Protein führen könnte (NCBI Protein-Protein BLAST (Altschul *et al.*, 1997)). Dabei fand sich, dass beim P-Selektin der Maus an

homologer Stelle zu N139 von L-Selektin ein Serin vorkommt. Neben P-Selektin der Maus (*Acc. No.* NP_035477.1) findet sich dieses Serin auch noch bei P-Selektin der Ratte (*Acc. No.* NP_037246.1), sowie E-Selektin der Ratte (*Acc. No.* NP_620234.1) und der Maus (*Acc. No.* NP_035475.1). Bei diesen Spezies ist diese Position somit nicht glykosyliert. Eine zwischen den Spezies nicht konservierte Glykosylierungsstelle ist ein wichtiger Hinweis darauf, ob dem Glykan an der Position eine wichtige Funktion zukommt. Zusammen mit der Beobachtung, dass nichtglykosyliertes LEHis in anderen Versuchen sekretiert wurde, solange es nicht die Mutation N139Q enthielt, zeigte auch der Sequenzvergleich, dass das fehlende Glykan an Position 139 nicht zu Beeinträchtigung der Sekretion führen sollte. Ob an der Position alternativ eine mögliche O-Glykosylierung des Serins vorkommt, wurde nicht untersucht. Es wurden allerdings im Lektin-Blot keine O-Glykane bei LEHis gefunden (nicht gezeigt). Um die Vermutungen zu bestätigen, wurden also weitere Mutanten generiert, bei denen alternativ zu Glutamin ein Serin für das Asparagin 139 ausgetauscht wurde. Diese Mutation führte bei Expression in HEK293F-Zellen zu sekretierbarem, nichtglykosylierten LEHis 000(S). Zusätzlich wurde die der N139S-Austausch bei der Variante 110(S) vorgenommen und es konnte nach Expression und Western Blot-Analyse des Kulturüberstandes deutlich die zusätzliche Bande bei ~19 kDa, die nun trotz des fehlenden Glykans sekretiert werden konnte, nachgewiesen werden (**Abb. 32**). Dies bestätigte die Annahme, dass das Glykan an N139 nicht für die Sekretion benötigt wurde und der Aminosäureaustausch N139Q die Sekretion nichtglykosylierten LEHis verhinderte.

Die Anteile der Glykoformen in der Mischung von der Glykoformen von wildtypischem LEHis schienen nicht gleich zu sein. Die Signale jener Formen auf dem Western Blot, die mehr Glykosylierungsstellen besetzt haben, erschienen stärker als jene mit weniger Glykanen. Dies war auch im Bandenmuster der Glykosylierungsmutanten zu beobachten, wobei z.B. bei der Mutante 011 die einfach glykosylierte Form stärker in der Mischung vorzukommen schien als die mit zwei Glykanen besetzte Form. Obwohl sich gezeigt hatte, daß die *N*-Glykane von L-Selektin LEHis nicht obligatorisch für die Sekretion sind, konnte ein deutlicher Einfluß der Glykane auf die Menge des in den Kulturüberstand sekretierten Proteins beobachtet werden. Mittels L-Selektin-spezifischem ELISA wurde die LEHis-Konzentration des Überstandes transfizierter Zellen bestimmt. Statt LEHis 000, welches wegen des ungünstigen Aminosäureaustausches nicht sezerniert werden konnte, wurde die Serin-Variante 000(S) benutzt, da diese sekretiert wurde (s.o.). Die Mutanten 100 und 000(S) hatten die niedrigste Expressionsrate, die nahe an der Detektionsgrenze in der jeweiligen Verdünnung lag. Die zweitniedrigste Expressionsrate hatten die Mutanten 010 und 110. Alle vier Varianten, bei denen ein Glykan an der dritten Position (EGF-Domäne) fehlte, wurden also weniger stark sekretiert als die vier Varianten, die ein Glykan an dieser Position trugen (siehe **Abb. 58** orange gefärbte Balken gegenüber braun gefärbten Balken). In diesen beiden Gruppen wurden jeweils jene beiden Mutanten stärker exprimiert, die ein Glykan in der zweiten Position (N66) trugen. Es war also nicht die reine Anzahl der Glykane, die die Sekretionsrate beeinflusste, denn die Variante 110 z.B. hatte nur eine Mutation und zwei Glykane, wurde aber schlechter exprimiert als 001, welches zwei Mutationen und nur ein Glykan besaß. Der Unterschied zwischen 010 und 110, sowie 100 und 000(S) war gering. Hier scheint der Einfluß der ersten Glykosylierungsposition auf die Sekretion nicht so ausgeprägt zu sein. Von jeweils zwei Mutanten, die sich nur in der Mutation der ersten Position unterschieden,

wurde die an dieser Stelle glykosylierte Form stärker exprimiert.

N-Glykane haben eine wichtige Funktion bei der Qualitätskontrolle und Faltung von Glykoproteinen, die den sekretorischen Weg in der Zelle einschlagen (Helenius and Aebi, 2001; Imperiali and O'Connor, 1999). Glykoproteine werden während der Translation mit einem Vorläuferglykan modifiziert, welches nach Abspaltung zweier Glucosereste als monoglykosylierte Form ein Substrat für Lektinchaperone Calnexin und Calreticulin (CNX/CRT) sind, die die Faltung unterstützen und kontrollieren (Bedard *et al.*, 2005). Die Oxidoreduktase ERp57 ist mit diesen Chaperonen assoziiert und sorgt für die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken. Ein Glykoprotein wird erst weiter in den sekretorischen Weg eingeschleust, wenn es seine native Konformation erreicht hat, andernfalls wird es zum Abbau ins Proteasom weitergeleitet. Bis dahin durchläuft es einen Zyklus von Deglycosylierung und Reglycosylierung und entsprechender Assoziation mit den Lektinchaperonen (Caramelo and Parodi, 2008). Das ER-Chaperon und Hsp70-Familienmitglied BiP (*grp78*), das an exponierte hydrophobe Bereiche bindet, kann bereits vor den Lektinchaperonen mit der wachsenden Polypeptidkette assoziiert sein. Eine feste Assoziation mit BiP führt zu veränderter Sekretion und intrazellulärem Abbau. Für den Koagulationsfaktor VIII und tPA (*tissue Plasminogen Activator*) konnte eine verstärkte Assoziation mit BiP und eine verminderte Sekretion beobachtet werden, wenn diese Glykoproteine zum Beispiel durch Mutation der Glykosylierungsstellen nicht glykosyliert waren (Dorner *et al.*, 1987). Ob solch ein Mechanismus für die L-Selektin Glykosylierungsmutanten ebenfalls in Frage kommt, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Eine Assoziation von L-Selektin mit BiP könnte nicht nur während der Translation und Sekretion stattfinden, sondern auch extrazellulär mit dem membranständigen L-Selektin. BiP wird in hohen Konzentrationen in synovialer Flüssigkeit gefunden und ist an der Regulation von autoinflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis beteiligt (Panayi and Corrigan, 2006). Für ein anderes Mitglied der Hsp70-Familie, nämlich Hsc70, konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits eine Assoziation mit L-Selektin nachgewiesen werden (Harms, 2002).

4.3.2 Bindungsfunktion der LEHis Glykosylierungsmutanten

Bei der Expression von wildtypischem LEHis in HEK293F-Zellen wurden 4 Glykoformen in den Kulturüberstand sekretiert. Diese repräsentieren Formen von LEHis mit drei, zwei und einer besetzten Glykosylierungsstelle sowie nicht-glykosyliertes LEHis. Alle Formen, inklusive der nichtglykosylierten Form, waren bindungsaktiv, wie durch Affinitätschromatographie an Heparin und sTyr/sLeX-PAA gezeigt wurde (**Abb. 18**, **Abb. 23**). Dabei war die Bindungsstärke der nicht-glykosylierten Form von LEHis an Heparin und sTyr/sLeX stärker als jene der vollständig glykosylierten Form. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da in der Literatur zuweilen Glykoproteine beschrieben werden, die ohne ihre Glykane nicht sekretierbar, falsch gefaltet oder nicht funktionell sind (Cumming, 1991). Es ist dabei allerdings zu unterscheiden, ob die Ursache für eine Fehlfaltung oder fehlende Funktionalität bei der Glykosylierung zu suchen ist, oder ein aus anderen Gründen ungeeigneter Expressionswirt genutzt wurde. Andererseits werden auch Glykoproteine beschrieben, die nach Abspaltung der Sialinsäuren oder Galactosereste eine höhere Bindungsaktivität aufweisen, und auch nach Abspaltung aller ihrer Glykane keinen Funktionsverlust *in vitro* zeigen (Grinnell *et al.*, 1991; Moyle *et al.*, 1975).

Ein interessanter Befund war die teilweise Trennung der Glykoformen von LEHis 111 durch die Heparinchromatographie (**Abb. 23**). Die Heparin-Sepharose-Säule stellte in diesem Falle sowohl einen Kationenaustauscher als auch eine Affinitätsmatrix dar, da Heparin als Ligand für L- (und P-) Selektin beschrieben ist (Nelson *et al.*, 1993; Skinner *et al.*, 1989). Ein NaCl-Stufengradient bewirkte bereits ab einer Konzentration von 60-80 mM NaCl eine Elution der höher glykosylierten Formen von LEHis. Mit zunehmendem Salzgehalt des Puffers konnten in den Eluatfraktionen jene Formen, die mit weniger Glykanen besetzt waren, nachgewiesen werden. Bei der physiologischen Salzkonzentration von ca. 150 mM waren alle vier Glykosylierungsstufen im Eluat nachweisbar. Die weniger stark glykosylierten Formen hingegen ließen sich erst ab ca. 220 mM NaCl quantitativ eluieren. Diese Formen assoziierten also stärker an Heparin als jene mit einer höheren Anzahl von besetzten Glykosylierungsstellen. Das ist konsistent mit den Ergebnissen der Bindungsanalyse der LEHis Glykosylierungsmutanten an sTyr/sLeX-PAA mittels Oberflächenplasmonresonanz. Auch in der direkten Bindung an sTyr/sLeX-PAA zeigte die nichtglykosylierte Variante von LEHis die stärkste Bindung (**Abb. 61**).

Die Messungen der Affinität von LEHis an sTyr/sLeX im BIAcore-System waren bezüglich der relativen Signalstärken im Äquilibriumbereich Chargen-abhängig nicht immer reproduzierbar. Somit zeigen die Ergebnisse der Messungen lediglich eine Tendenz an. Die Tendenz jedoch, dass stärker glykosyliertes LEHis ein geringeres Bindungssignal als weniger glykosylierte Varianten erzeugten, war stets beobachtet worden. Ebenso zeigte die nicht-glykosylierte Form von LEHis stets das größte Bindungssignal. Auch die Form der Bindungskurven war trotz teilweise unterschiedlicher relativer Signalstärken im Äquilibriumsbereich reproduzierbar. Der Grund für eine variable Reproduzierbarkeit war zum einen, dass es sich bei den Proteinpräparationen um Mischungen verschiedener Glykoformen handelte, die jeweils unterschiedlich zusammengesetzt waren. Eine vollständige Trennung der Glykoformen war nicht möglich (vgl. **Abb. 23** und **Abb. 22**), und so mussten für die Bindungsuntersuchungen die aus den Kulturüberständen gereinigten Mischungen verwendet werden. Bei den Aufreinigungen mittels AAC war beobachtet worden, dass sich immer auch etwas LEHis in den Durchlaufraktionen befand. Wenn die stärker glykosylierten Formen auch schwächer an die AAC-Matrix banden, wurden diese im Waschschrift zuerst herausgewaschen. Das könnte dann dazu geführt haben, dass sich in der einen Charge aufgereinigten LEHis mehr stärker bindendes LEHis befand als in einer Anderen. Außer diesen Gründen kommt auch als Fehlerquelle in Frage, dass die unterschiedliche Glykosylierung von LEHis einen Einfluß auf die Proteinbestimmung haben könnte, wonach die folgenden Ungenauigkeiten dann zu unterschiedlicher Signalstärke geführt haben könnten.

Ein weiterer Grund ist in der schwachen Affinität der monomeren L-Selektin-Formen zu suchen. Am Kurvenverlauf der Sensorgramme war zu erkennen, dass die Bindung durch sehr schnelle *on*- und *off*-Raten bestimmt wird. Nach Ende der Injektionsphase fiel das Bindungssignal direkt wieder annähernd auf die Basislinie zurück. Für seine biologische Funktion als Adhäsionsrezeptor, der das Rollen der Leukozyten vermittelt, ist diese Art der Bindung essentiell. Nur durch schnelles Knüpfen und Aufheben von Bindungen kann eine Rollbewegung des Leukozyten gewährleistet werden. Da die Affinität eines einzelnen L-Selektin-Moleküls zu seinem Liganden gering ist, liegt L-Selektin auf den Spitzen der Mikrovilli in geclusterter Form vor. Damit ist

gewährleistet, dass bei der Rollbewegung des Leukozyten eine kontinuierliche Abfolge schneller Bindungen benachbarter L-Selektin-Moleküle erfolgen kann. Eine Verstärkung der Bindung durch Dimerisierung konnte im Zellsystem nachgewiesen werden (Li *et al.*, 1998). Multimerisiert man L-Selektin durch Kopplung an einen Träger, so ist zu beobachten, dass das Bindungssignal auch nach der Injektionsphase auf einem gewissen Niveau erhalten bleibt und sehr viel langsamer abfällt, als bei den Messungen der LEHis-Monomere in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. In multimerisierter Form können verschiedene auf demselben Gerüst benachbarte L-Selektin-Moleküle nacheinander Bindungen eingehen und damit die Bindung des Gesamtmoleküls erhalten. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit anhand der Bindung von multimerisierten Fusionsproteinen demonstriert (**Abb. 56**).

Bei der Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Bindung von LEHis 111 an sTyr/sLeX fiel auf, dass das Bindungssignal im Äquilibriumbereich bei einem pH-Wert von 6,7 um etwa 55 RU erhöht war (**Abb. 60**). Möglicherweise kam es bei diesem pH-Wert zu Ladungen an Seitenketten des Proteingerüsts oder der N-Glykane, die die Ligandbindung verstärken. Dies ist ein interessanter Nebenbefund, da in Entzündungsherden üblicherweise eine lokale Acidose beobachtet wird. Eine verstärkte Bindung von L-Selektin an seine Liganden bei entsprechend erniedrigtem pH könnte somit zu verstärkter Adhäsion und nachfolgender Extravasation der inflammatorischen Zellen führen, die im Entzündungsherd neben der Eliminierung von Pathogenen auch zu Schäden in gesundem Gewebe führen können.

4.3.3 Analyse der N-Glykane an N22, N66 und N139

Bei der systematischen Mutagenese der ersten drei N-Glykosylierungsstellen sind drei LEHis-Varianten entstanden, die jeweils nur ein einzelnes Glykan an N22, N66 oder N139 besaßen. Somit konnten die N-Glykane der ersten drei Positionen von L-Selektin erstmals einzeln untersucht werden. In Kooperation mit Dr. rer. nat. Véronique Blanchard und Dr. rer. nat. Matthias Kaup der AG Glykodesign und Glykoanalytik (Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité Campus Mitte) wurden die Glykane analysiert. Neben den L-Selektin-Formen wurde zur Kontrolle α -1-saures Glykoprotein (AGP) in demselben Expressionssystem (HEK293F) exprimiert, aufgereinigt und in den Analysen mitgeführt. Somit sollte es möglich sein, die zelltypspezifische Glykosylierung von jener zu unterscheiden, die vom Proteinanteil beeinflusst wird. Zur Analyse wurden die Glykane von den Proteinen abgetrennt und entweder desialyliert oder permethyliert. Durch Permethylierung ist es möglich, N-Glykane mit Sialinsäureresten im Massenspektrum zu detektieren. Zusätzlich wurden alle Proben sowohl im Negativ-Ionen-Modus sowie im Positiv-Ionen-Modus gemessen. Hierdurch konnten zusätzlich Sulfat- oder Phosphatreste im Massenspektrum detektiert werden.

Bei der Monosaccharidanalyse stellte sich heraus, dass in den N-Glykanen der LEHis-Mutanten N-Acetyl-Galactosamin-Einheiten zu finden sind. Dieser Glykanbaustein wurde für L-Selektin bislang nur in geringen Spuren beschrieben (Gohlke *et al.*, 2000). Gohlke *et al.*, die die gesamten N-Glykane von sL-Selektin aus BHK Zellen untersucht hatten, hatten N-Glykane mit einer GalNAc-GlcNAc- („LacdiNAc“)-Antenne nur in sehr geringen Mengen gefunden. Bei den Analysen

der vorliegenden Arbeit zeigte sich allerdings ein sehr viel größerer Anteil von *N*-Acetyl-Galactosaminresten (**Tabelle 3**). Bei AGP aus HEK293F-Zellen waren sowohl in der Monosaccharidanalyse als auch mittels Massenspektrometrie keine GalNAc-Reste detektierbar. Hierbei handelte es sich somit um eine Glykanmodifikation, die offenbar durch die Proteinsequenz von L-Selektin determiniert wird. In der Literatur gibt es nur wenig beschriebene Glykoproteine, die *N*-Acetyl-Galactosaminreste in ihren *N*-Glykanen besitzen. Dies sind unter anderem humanes tPA (*tissue plasminogen activator*) (Chan *et al.*, 1991), bovines Lactotransferrin (Coddeville *et al.*, 1992), humane Urokinase (Bergwerff *et al.*, 1992), humane Kallidinokinase (Tomiya *et al.*, 1993), Bienengift Phospholipase A₂ (Kubelka *et al.*, 1993), bovines CD36 (Nakata *et al.*, 1993) und rekombinantes humanes Protein C aus HEK293 Zellen (Yan *et al.*, 1993). Die klassischen Vertreter von Glykoproteinen mit (sulfatierten) GalNAc-GlcNAc-Antennen sind die Glykoproteinhormone LH (Luteinisierendes Hormon/Lutropin) und TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon/Thyreotropin) (Baenziger and Green, 1988). Daher wurde die für die Addition von GalNAc-Resten verantwortliche GalNAc-Transferase zunächst als „Glykoproteinhormon GalNAc-Transferase“ bezeichnet (Smith and Baenziger, 1988). Die Autoren Smith und Baenziger schlugen als Konsensussequenz für die GalNAc-Transferase das Motiv P-X-R/K vor, das 6-9 Einheiten aminoterminal der *N*-Glykosylierungsstelle liegen soll (Smith and Baenziger, 1992). Allerdings wurden auch einige mit GalNAc modifizierte Glykoproteine gefunden, denen diese Sequenz fehlt (u.A. (Beckmann *et al.*, 1985; Pennica *et al.*, 1983)). Für die alpha-Untereinheit von hCG (humanes Choriongonadotropin) wurde diese Konsensussequenz genau untersucht wobei die basischen Aminosäuren in der Sequenz ...PLRSKKTMLVQK~~NT~~SE...(rot markiert) aminoterminal der *N*-Glykosylierungsstelle (grün markiert) als essentielles Erkennungsmotiv für die GalNAc-Transferase gefunden wurden (Mengeling *et al.*, 1995). In der Sequenz von L-Selektin ist ein ähnliches basisches Muster aminoterminal der ersten *N*-Glykosylierungsstelle vorhanden (...NWQRARRFCRD~~NY~~TDL...), welches allerdings mit geringerem Abstand zur *N*-Glykosylierungsstelle steht. In der Nähe der anderen Glykosylierungsstellen ist kein solches Muster zu finden. Ob das oben genannte Muster basischer Aminosäurereste tatsächlich für die Modifikation der *N*-Glykane von L-Selektin mit GalNAc-Resten verantwortlich ist, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Dafür spricht, dass der Anteil der GalNAc-Reste auf den Antennen des Glykans in der ersten Position, die wahrscheinlich die Konsensussequenz für die GalNAc-T enthält, von allen Mutanten am höchsten war.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der *N*-Glykane der einzelnen Positionen von LEHis ergaben, dass es sich bei allen Varianten hauptsächlich um biantennäre Glykane handelt. Fast alle Strukturen besaßen einen (*core*-)Fucoserest an der Basisstruktur. Zusätzlich fanden sich an den Antennen ebenfalls häufig Fucosereste. Die Antennen waren mit Galactose- oder *N*-Acetyl-Galactosaminresten substituiert. Es gab nur wenige triantennäre Strukturen bei der Variante 100, 001 und 111, sowie eine tetraantennäre Struktur bei dem wildtypisch glykosylierten LEHis (111). AGP hingegen zeigte einen deutlich höheren Anteil tri- und tetraantennärer *N*-Glykane. Die drei LEHis-Mutanten besaßen einen unterschiedlichen relativen Anteil jener biantennären Strukturen, die sich hauptsächlich um das Vorhandensein von Fucose- oder Galactoseresten an den Antennen unterscheiden. Die Glykane der wildtypischen Form zeigen in ihrer Gesamtheit die größte

Variabilität. Hier waren kleinere, aber auch größere Strukturen, die bei den Mutanten nicht zu detektieren waren, vorhanden. Man könnte bei der wildtypischen Form von LEHis eine Mischung der Strukturen, die bei den Einzelmutanten gefunden wurden, erwarten. Andererseits sind die relativen Mengenverhältnisse der detektierten Massen beim Wildtyp oder bei den Einzelmutanten unterschiedlich, denn die Gesamtmenge der Glykane des Wildtyps ist dreifach erhöht, da der Wildtyp an drei Positionen glykosyliert war. Somit können einzelne Strukturen, die bei den Einzelmutanten gut detektierbar sind, beim Wildtyp aufgrund relativer arbiträrer Intensitätseinheiten im Spektrum unter der Detektionsgrenze liegen. Allerdings ist nicht klar, wie das Vorhandensein oder das Fehlen eines Glykans in der einen Position eines an jeweils anderer Stelle beeinflusst. Dazu müssten die *N*-Glykane der einzelnen Positionen als Fraktionen der Wildtypform analysiert werden. Eine Trennung der Glykoformen des Wildtyps war jedoch wie bereits erwähnt (**Abb. 22**) nicht möglich.

Alle Glykanstrukturen wurden mittels Exoglykosidase-Verdau und anschließender erneuter Messung überprüft. Die in den Massenspektren eingezeichneten Strukturen stellen somit jene Strukturen dar, die kombinatorisch aus den Ergebnissen geschlussfolgert werden konnten.

Bei der Mutante 100 wurden besondere *N*-Glykane identifiziert, deren antennäre GlcNAc-Reste offenbar mit zwei aufeinanderfolgenden GalNAc-Resten substituiert sind. Beim Wildtyp sind die entsprechenden Peaks in den Spektren in nur sehr geringem Anteil enthalten. Wie auch bei den anderen identifizierten Glykanstrukturen wurden diese GalNAc-GalNAc-Antennen durch Exoglykosidase-Verdau bestätigt. Es konnte in der Literatur keine Beschreibung für Glykanstrukturen mit zwei aufeinander folgenden GalNAc-Einheiten, weder für *N*- noch für *O*-Glykane, gefunden werden. Einzig ein Glykosphingolipid unbekannter Funktion, das so genannte *Forssman Antigen*, besitzt terminal an einer Globosid-Struktur zwei aufeinander folgende GalNAc-Reste (Siddiqui and Hakomori, 1971). Daher gehen wir davon aus, dass es sich bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit um die erste Beschreibung von antennären GalNAc-GalNAc-Resten auf *N*-Glykanen handelt.

Neben den *N*-Acetyl-Galactosaminresten an den Antennen der *N*-Glykane von LEHis fiel in den Analysen der hohe Anteil antennärer Fucosereste auf. Das Motiv GalNAc β (1-4)[Fuc α (1-3)]GlcNAc β (1-2)-R, das durch diese antennäre Fucose entsteht, wird in der Literatur als „PC-293 Determinante“ bezeichnet, da es zuerst auf rekombinantem Protein C aus HEK293 Zellen gefunden wurde (Yan *et al.*, 1993). Dieses Glykanmotiv ähnelt dem Blutgruppenantigen Lewis X, das allerdings einen Galactoserest an Stelle des GalNAc-Restes besitzt. Diese Variante wird in anderen Studien daher auch als „GalNAcLeX“ bezeichnet (Yang *et al.*, 2000). Das Lewis X- Motiv, in seiner sialylierten Variante als sialyl Lewis X, ist als prototypischer Ligand aller Selektine bekannt. Die strukturelle Verwandtschaft zu GalNAc LeX bzw. der PC-293 Determinante war daraufhin untersucht worden, und es konnte gezeigt werden, dass die Glykane von humanem rekombinantem Protein C in der Lage sind, E-Selektin-vermittelte Zelladhäsion zu hemmen (Grinnell *et al.*, 1994). Dies war überraschend, da die Sialinsäure innerhalb des sLeX-Motivs, das bei GalNAc-LeX fehlt, als essentiell für die Selektinbindung angesehen wird. Eine andere Studie (Yuen *et al.*, 1994) konnte allerdings demonstrieren, dass E-Selektin effektiv an sulfatierte LewisX/A Strukturen bindet, obwohl Sulfatierung eher ein Kennzeichen von P- und L-Selektin-Liganden ist (Varki, 1997). Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob L-Selektin eventuell über seine GalNAc-LeX- Strukturen,

sofern sie denn auf physiologisch prozessiertem L-Selektin auch vorhanden sind, an sich selbst oder andere Selektine bindet. Wenn es durch Assoziation der Lektindomäne von L-Selektin mit den *N*-Glykanen von anderen L-Selektinmolekülen zu einer gewissen Konkurrenz und Selbstinhibition kommt, würde dies die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verstärkte Bindung von nichtglykosyliertem L-Selektin erklären.

Abgesehen von der Möglichkeit, modulierend auf die Ligandbindung einzuwirken, haben *N*-Glykane ebenfalls die Funktion, als Substrat für den Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) zu fungieren. Durch Bindung und anschließender Internalisierung werden Glykoproteine aus dem Serum entfernt und abgebaut (*clearance*) (Ashwell and Harford, 1982; Schwartz, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass der ASGPR mit höherer Affinität an GalNAc-terminierte als an Gal-terminierte Glykane bindet (Chiu *et al.*, 1994). In dieser Studie erwiesen sich biantennäre Glykane mit dem GalNAc-LeX-Motiv als effizientere Liganden. In einer weiterführenden Untersuchung stellte sich heraus, dass die Fucosereste kaum einen Einfluss auf die Bindung an den ASGPR haben. Somit unterscheidet der ASGPR lediglich zwischen bi- und triantennären Glykanen, die mit Gal-Resten oder GalNAc-Resten substituiert sind (Yang *et al.*, 2000).

Durch Permethylierung und anschließende massenspektrometrische Untersuchungen konnte in der vorliegenden Arbeit auch die Sialylierung der *N*-Glykane von L-Selektin untersucht werden. Der Anteil sialylierter Strukturen war im Vergleich zu AGP insgesamt gering. So wurden für die LEHis-Mutante 010 nur drei und für 001 fünf sialylierte Strukturen gefunden, für die wildtypische Form von LEHis hingegen 10. Dabei ist jede gefundene Struktur mit maximal einem Sialinsäurerest modifiziert. Bei dem AGP aus demselben Expressionssystem wurden deutlich mehr und höher sialylierte Strukturen gefunden. Die geringe Sialylierung liegt somit offenbar nicht nur in der Kapazität der Zellen begründet. Des Weiteren lässt die geringe Sialylierung vermuten, dass die hier untersuchten L-Selektin-Formen ein sehr gutes Substrat für den ASGPR sind und dass sie daher eine sehr geringe Halblebenszeit im Blutserum hätten.

Bei den massenspektrometrischen Messungen im Negativ-Ionen-Modus konnte überraschenderweise nachgewiesen werden, dass die *N*-Glykane von LEHis aus HEK293F-Zellen mit Sulfatresten modifiziert sind. Dieser Befund wurde durch Verdauung mit Sulfatase und erneuter Messung bestätigt (o Abb.). Bei AGP wurden hingegen keinerlei Sulfate gefunden. Dies spricht dafür, dass es sich um eine vom Proteinanteil des L-Selektins bestimmte Modifikation handelt. Dass HEK293 Zellen in der Lage sind, sulfatierte GalNAc-Glykanstrukturen auszubilden, wurde in der Literatur bereits beschrieben (Smith *et al.*, 1992). Sulfatierte *N*-Glykane wurden bislang nicht für L-Selektin beschrieben. Bei der Analyse von rekombinantem L-Selektin aus BHK Zellen wurden keine Sulfatmodifikationen gefunden (Gohlke *et al.*, 1999; Gohlke *et al.*, 2000), vermutlich weil den BHK Zellen die Enzymausstattung dazu fehlt. Ebenso fehlt CHO-Zellen die Ausstattung, GalNAc-Reste und sulfatierte GalNAc-Reste zu bilden (Grossmann *et al.*, 1995; Van den Nieuwenhof *et al.*, 2000). Nach Transfektion entsprechender Glykosyltransferasen und Sulfotransferasen können jedoch auch CHO-Zellen rekombinante Glykoproteine mit sulfatierten GalNAc-Resten modifizieren (Kawar *et al.*, 2005). Es scheint wahrscheinlich, dass natives L-Selektin aus dem Serum ebenfalls mit Sulfaten modifiziert ist. Dies wurde allerdings bislang nicht untersucht. Gegenwärtig wird in unserem Labor versucht, lösliches L-Selektin mittels AAC aus Blutserum zu reinigen, was sich aufgrund der hohen

Konzentration anderer Serum Inhaltsstoffe und Inhibition der zur Verfügung stehenden Ligandenaffinitätssäulen durch die Antikoagulanzen Heparin und EDTA schwierig gestaltet. Hier muß zunächst ein Aufreinigungsprotokoll etabliert werden.

Biantennäre sulfatierte GalNAc-Termini sind eigentlich klassische Glykanstrukturen für die Glykoprotein hormone LH (Luteinisierendes Hormon/Lutropin) und TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon/Thyreotropin) (Baenziger and Green, 1988). Es sind allerdings einige wenige andere Glykoproteine beschrieben, deren *N*-Glykane ebenfalls auf SO₄-GalNAc-R enden. Dies sind unter anderem bovines Pro-Opiomelanocortin (POMC) (Siciliano *et al.*, 1993; Skelton *et al.*, 1992), rekombinanter TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) (Smith *et al.*, 1992), Tamm-Horsfall Glykoprotein (Hard *et al.*, 1992) und sekretierte *Carbonic Anhydrase VI* (Hooper *et al.*, 1995). Die Funktion sulfatierter GalNAc-Termini der Glykoprotein hormone wird hauptsächlich darin gesehen, durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor die schnelle Entfernung aus der Zirkulation zu gewährleisten. Dieser SO₄-GalNAc-GlcNAc-spezifische Rezeptor wurde auf hepatischen Zellen identifiziert (Fiete *et al.*, 1991). Nach Klonierung der cDNA wurde entdeckt, dass der isolierte Rezeptor identisch mit dem unabhängig beschriebenen Makrophagen-Mannoserezeptor ist, und dass dieser in der Lage ist, Mannosereste und sulfatierte GalNAc-Termini an unabhängigen Bindungsstellen zu binden (Fiete and Baenziger, 1997; Fiete *et al.*, 1997). Hierbei werden sulfatierte Glykane an der cysteinreichen Domäne des Mannoserezeptors gebunden, während Mannosestrukturen an den Lektindomänen des Mannoserezeptors gebunden werden (Fiete *et al.*, 1998). Der Mannoserezeptor wird nicht nur auf Makrophagen exprimiert sondern auch auf lymphatischen Gefäßen und ist dort in die Kontrolle der Lymphozytenextravasation eingebunden (Marttila-Ichihara *et al.*, 2008). Interessanterweise wurde der Mannoserezeptor in unabhängigen Studien als L-Selektin-Ligand beschrieben (Ijala *et al.*, 2001). Durch seine Position auf lymphatischen Endothelien und seiner Bindungsfähigkeit an L-Selektin scheint es wahrscheinlich, dass L-Selektin-vermitteltes Auswandern von Lymphozyten in lymphatische Gewebe durch Bindung an den Mannoserezeptor reguliert wird. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint es weiterhin möglich, dass diese Bindung über die cysteinreiche Domäne des Mannoserezeptors an die sulfatierten *N*-Glykane des L-Selektins geschieht. Ob dies der Fall ist, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Eine weitere funktionelle Bedeutung der Sulfatreste könnte in einer direkten Beteiligung an der Bindung an andere Selektine bestehen. Die Sulfatreste könnten hier analog zu Tyrosinsulfatresten, wie sie in der Selektinbindungsregion von PSGL-1 nachgewiesen wurden, fungieren.

Zusammengefaßt ließ sich aus den Daten der Massenspektrometrie zusammen mit sequentiellen Exoglykosidase-Verdaus ersehen, dass die *N*-Glykane von rekombinantem LEH₁ aus HEK293F-Zellen hauptsächlich vom biantennären, komplexen Typ waren. Dabei waren eine oder beide der Antennen terminal mit *N*-Acetyl-Galactosaminresten statt mit den üblicheren Galactoseresen substituiert. Außerdem konnten sulfatierte Strukturen nachgewiesen werden. *N*-Acetyl-Galactosaminreste und sulfatierte Strukturen wurden bei AGP aus demselben Expressionssystem nicht gefunden. Die verschiedenen Massen, die in den Spektren zu finden waren, korrespondierten mit Strukturen, die sich zum Großteil alle von diesen drei Grundstrukturen

ableiten und sich nur durch das Vorhandensein von Fucosen und/oder Sulfaten unterscheiden (**Abb. 72**).

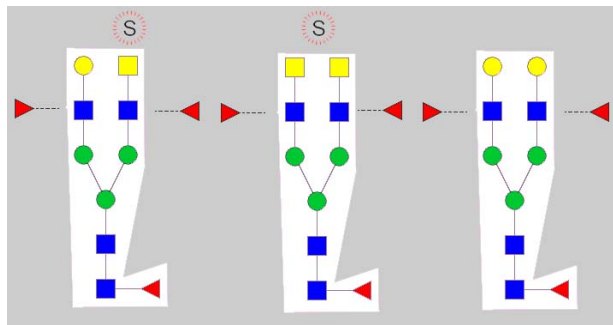


Abb. 72: Die Hauptstrukturen der Glykane von LEHis. Von diesen Strukturen (hervorgehoben in weiß) lassen sich mit wenigen Ausnahmen alle anderen gefundenen Strukturen durch Addition von Fucose oder Sulfat ableiten.

Es handelte sich bei den sulfatierten GalNAc-terminierten *N*-Glykanen um spezielle *N*-Glykane, die typisch für Glykoprotein hormone angesehen werden und ansonsten nur auf einigen wenigen anderen Glykoproteinen beschrieben wurden. Zusätzlich zu diesen biantennären Strukturen wurde nur ein geringer Anteil anderer, höherantennärer Strukturen gefunden. Die Sialylierung der LEHis-Mutanten war im Gegensatz zu AGP relativ gering, wobei die wildtypische Form am stärksten sialyliert war. Bei der Mutanten 100 wurden Strukturen gefunden, die an beiden Antennen zwei aufeinander folgende GalNAc-Reste besaßen. Diese Struktur ist höchst ungewöhnlich und wurde unseres Wissens noch nicht in der Literatur beschrieben. *N*-Glykane mit dieser Modifikation wurden nur bei der Mutante 100 beobachtet und waren beim Wildtyp nur in geringen Spuren zu detektieren.

Das Vorhandensein sulfatierter Glykanstrukturen von rekombinantem L-Selektin deutet zusammengefasst auf eine spezifische Funktion dieser *N*-Glykane hin, die eine direkte Bindung an andere Selektine oder den Makrophagen-Mannoserezeptor vermitteln könnten. Künftige Untersuchungen müssen überprüfen, ob ähnliche oder gleiche *N*-Glykane auch auf physiologisch gebildetem L-Selektin nachweisbar sind.

5 Material und Methoden

5.1 Pufferlösungen

Standard – Laborchemikalien wie Puffersubstanzen, Salze, Alkohole, Säuren etc. wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Sigma, Merck KgA oder Carl Roth im Reinheitsgrad p.A. bezogen.

PBS	TBS	
<ul style="list-style-type: none"> 8,33 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O 1,67 mM KH₂PO₄ 150 mM NaCl 	<ul style="list-style-type: none"> 0,15 M NaCl 20 mM Tris HCl pH 7,5 	
TBSB	TBSCa	TBST
<ul style="list-style-type: none"> TBS 0,1 % Brij 58 	<ul style="list-style-type: none"> TBS 2 mM CaCl₂ 	<ul style="list-style-type: none"> TBS 0,1 % Tween-20

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Klonierungsvektoren

Für die Konstruktion verschiedener Expressionsplasmide wurden die von Abschnitt 5.2.2-5.2.11 aufgeführten molekularbiologischen Methoden angewendet. Die Vektoren, in die zur Zwischenklonierung L-Selektin-Sequenzen eingebracht wurden, sind in **Abb. 73-Abb. 75** graphisch dargestellt. Die MCS (multiple cloning site) ist unter der Plasmiddarstellung jeweils als Sequenz mit den entsprechenden Schnittstellen gezeigt.

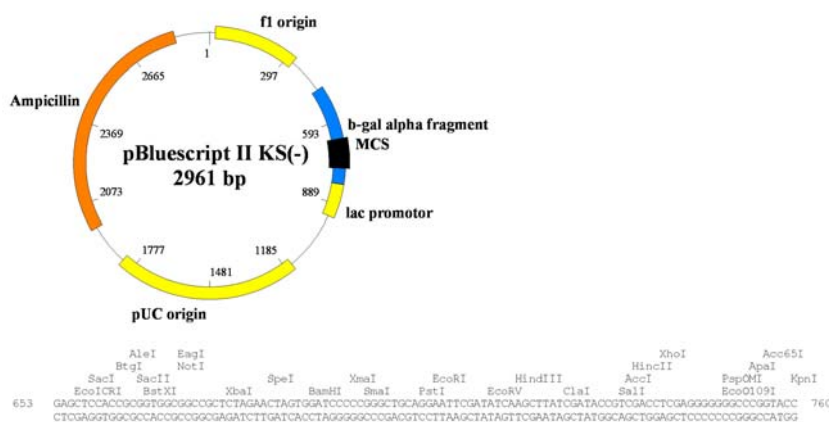


Abb. 73: pBluescript II KS (-) von Fermentas; wurde zur Zwischenklonierung benutzt.

LB-Medium	TSS (Transformation and storage solution), 10 ml
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 10 g/L Trypton ▪ g/L Hefeextrakt ▪ g/L NaCl ▪ 1 ml 1N NaOH ▪ pH 7,5 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 8,5 ml LB – Medium ▪ 1g PEG 8000 ▪ 0,5 ml DMSO ▪ 0,5 ml 1M MgCl₂

Bakterienstämme

- *E. coli* XL-1blue
- *E. coli* DH5 – α
- *E. coli* TOP10 (Invitrogen)
- *E. coli* DH10 Bac (Invitrogen)

5.2.3 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurde die gewünschte Anzahl chemisch kompetenter *E. coli* aus der Lagerung bei -80°C entnommen und 5' auf Eis inkubiert. 0,5 μg Plasmid oder 5 μl eines 20 μl -Ligationsansatzes wurden zu den Zellen dazugegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung 2 Minuten bei 42°C inkubiert und wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 350 μl LB wurde das Reaktionsgefäß für 45 Minuten bei 37°C geschüttelt und nach Ende der Inkubationszeit auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C oder ca. 72 h bei Raumtemperatur sind nach erfolgreicher Transformation auf der Platte Kolonien zu sehen. Wurden die *E. coli* mit einem Plasmid transformiert, das ein Gen für die β -Galactosidase enthält, so war es möglich, dass diese Bakterien X-Gal in einen blauen Farbstoff umwandeln. X-Gal und IPTG (zur Induktion der Genexpression) wird dazu zum LB-Agar hinzu gegeben. Diesen Umstand macht man sich zunutze, um durch Blaufärbung von Kolonien auf der Platte gleich erkennen zu können, ob das gewünschte Insert bei der Ligationsreaktion in das Plasmid integriert wurde. Diese Plasmide sind dann so konstruiert, dass das beta Galactosidase-Gen die Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) überspannt. Wird nun ein DNA- Stück integriert, so wird das beta Galactosidase Gen auseinander gerissen und das Enzym kann nicht mehr funktionell hergestellt werden; folglich bleiben die Kolonien weiß, während sich Kolonien mit dem Leervektor blau färben.

LB-Agar:	Antibiotika
<ul style="list-style-type: none"> ▪ LB-Medium ▪ 15 g/L Agar ▪ Ggf. Pro Platte: ▪ 40 μl X-Gal (2 mg/ml stock in DMSO) ▪ 10 μl IPTG (1M) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonz.) (Roth) ▪ Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonz.) (Roth) ▪ Gentamycin (Invitrogen) ▪ Tetracyclin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonz.)

5.2.4 Colony-PCR

Um transformierte Bakterienkolonien daraufhin zu überprüfen, ob sie das gewünschte Plasmid enthalten, wurden Colony-PCRs durchgeführt (siehe auch PCR). Mittels spezifischer Primer lässt sich so auch gleich feststellen, ob das Insert in der gewünschten Orientierung in das Plasmid integriert wurde. Dazu wurde jeweils 10 µl steriles ddH₂O in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt, mit einer Pipettenspitze jeweils eine Kolonie von der Agarplatte abgenommen und in dem H₂O suspendiert. Die Spitze wurde zur späteren Kontrolle und Nummerierung auf einer Masterplatte ausgestrichen. Die PCR-Gefäße mit der Bakteriensuspension wurden verschlossen, 5 Minuten bei voller Leistung in der Mikrowelle behandelt und anschließend bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden sie aus dem Gefrierschrank entnommen und der vorbereitete PCR-Mix hinzu gegeben. Das PCR-Programm wurde gestartet und nachdem das Gerät auf 80°C hoch geheizt hatte, wurden die Reaktionsgefäße hineingestellt.

PCR – Mix (1 Ansatz):

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 5 µl MgCl₂ – Lösung (1M stock)
- 1 µl dNTPs (10 mM each stock)
- 1 µl forward Primer (10 pM stock)
- 1 µl reverse Primer (10 pM stock)
- 0,5 µl Taq Polymerase
- 26,5 µl H₂O

Gesamtvolumen 40 µl + 10 µl
Bakteriensuspension in H₂O

Programm:

95°C-10'; (95°C-30''; 52-58°C- 30''; 72°C-1')x35; 72°C-10'; 15°C-∞

5.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA- Fragmente wurden mittel Agarose- Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV–Beleuchtung wurden die Fragmente sichtbar gemacht und daraufhin entweder analysiert/dokumentiert, oder ausgeschnitten und nach Aufreinigung zur Klonierung weiter verwendet. Die Gele wurden in einer Konzentration von 0,8-1,5 % hergestellt. Die DNA- Fragmente wandern entsprechend ihrer negativen Ladung zur Positiven Elektrode durch das Gel und ergeben ein Bandenmuster.

TAE–Puffer 50 x

- 242 g Tris
- 100 ml 0,5 M EDTA
- 57,1 ml Eisessig
- Ad 1 L H₂O
- pH 8,2 mit Eisessig eingestellt

6 x Probenpuffer

- 40 % Sucrose
- 0,25 % Bromphenolblau (Merck)
-

Ethidiumbromid- Färbelösung

- 5 µl von 1 % stock (Merck) auf 50 ml H₂O

Kits zur DNA-Aufreinigung

- Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research)
- MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)

DNA-Molekulargewichtsstandards

- 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)
- 100 bp Ladder (Invitrogen)

5.2.6 Plasmidpräparation

Je nach dem, wie viel Plasmid aufgereinigt werden sollte, wurden unterschiedliche Mengen LB mit Antibiotikum und einer frisch transformierten Bakterienkolonie über Nacht bei 37°C schüttelnd angezogen. Nach Abzentrifugieren der Kultur wurden die Bakterien mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA über eine Silica-basierte Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Dazu wurden Plasmidpräparationskits unterschiedlicher Größe benutzt und die Anweisungen des Herstellers befolgt. Alle Plasmide wurden in sterilem 10 mM Tris-HCl pH 8,5 gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop–Spektralphotometer (Thermo).

Plasmidpräparationskits (Macherey-Nagel)

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| ■ Nucleobond Plasmid Mini Kit | ■ Nucleobond PC 2000 (Mega Kit) |
| ■ Nucleobond PC 100 (Midi Kit) | ■ Nucleobond PC10000 (Giga Kit) |
| ■ Nucleobond PC 500 (Maxi Kit) | |

5.2.7 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Um spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren, wurden PCRs durchgeführt. Da die amplifizierten DNA-Fragmente anschließend für ein Expressionsplasmide eingesetzt werden sollten, musste eine Polymerase mit *proof reading*-Aktivität verwendet werden, um Fehler in der Sequenz zu vermeiden. In einen Ansatz wurde die DNA, von der der Sequenzabschnitt abgelesen werden sollte, spezifische Primer, dNTPs, und Polymerase in entsprechendem Puffer zusammengegeben. Der Ansatz wurde in einer PCR-Maschine zunächst auf 95°C erhitzt, wobei die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen aufschmelzen. Dann wurde die Temperatur zu 52-58°C abgesenkt, der so genannten *Annealing*-Temperatur, bei der die spezifischen Primer entsprechend ihrer Basenabfolge komplementär an die Matrizen-DNA anlagern können. Anschließend wurde die Temperatur auf 72°C erhöht, was das Temperaturoptimum der *Pfu*-Polymerase darstellt. Jetzt kann die Polymerase, ausgehend von den gebundenen Primern, aus den dNTPs aus der Reaktionsmischung entsprechend der Matrize komplementär an den DNA- Matrizen- Einzelstrang einen Doppelstrang synthetisieren. Nach der Synthesephase wurde der Ansatz wieder auf 95°C erhitzt, wobei wiederum alle doppelsträngigen DNA–Stücke aufgetrennt wurden. Dieser Zyklus wurde ca. 35-mal wiederholt, wodurch ein spezifisches DNA-Fragment stark amplifiziert wird. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, kontrolliert, und das gewünschte Fragment aus dem Gel für die Weiterverwendung extrahiert und aufgereinigt.

PCR-Mix (1Ansatz)	Programm:
<ul style="list-style-type: none"> ■ 5 µl 10x Pfu Polymerase Reaktionspuffer (incl. MgCl₂) (Fermentas) ■ 1 µl dNTPs (10 mM each) (Fermentas) ■ 1 µl forward Primer (10 pM) (Metabion) ■ 1 µl reverse Primer (10pM) (Metabion) ■ 0,5 µl Pfu Polymerase (Fermentas) ■ 41,5 µl ddH₂O, steril 	95°C – 2'; (95°C – 30''; 52-58°C – 30''; 72°C – 45'') x35; 72°C – 2'; 15°C-∞
Kits für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten	
<ul style="list-style-type: none"> ■ DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research) ■ Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) 	

5.2.8 Mutagenese

In einigen Fällen wurde die Sequenz von L-Selektin gezielt verändert. Dazu wurden Primer entworfen, die an den gewünschten Stellen nicht mit der Originalsequenz übereinstimmen. Diese wurden in einer PCR eingesetzt, wodurch das PCR-Produkt anschließend die gewünschte Sequenz hat und durch Restriktion und Ligation in den gewünschten Expressionsvektor kloniert werden kann.

Für die Mutagenese der Glykosylierungsstellen von L-Selektin wurde eine andere Methode gewählt: zwei komplementäre Primer, die den zu mutierenden Bereich und die Mutation enthalten, werden in einer PCR-Reaktion (mit *Phusion high-fidelity DNA Polymerase*, BioLabs) eingesetzt (siehe PCR 5.2.7). Bei dieser PCR wird die Elongationszeit so verändert, dass in der Zeit das gesamte Plasmid synthetisiert werden kann. Das Ausgangsplasmid ist durch die Synthese in *dam+* *E. coli*-Stämmen methyliert, während das neu synthetisierte Plasmid nicht methyliert ist. Das Restriktionsenzym Dpn I schneidet lediglich methylierte DNA; wenn man also den PCR-Ansatz mit Dpn I verdaut, wird das Originalplasmid fragmentiert, während das durch die Polymerase synthetisierte Plasmid mit der eingeführten Mutation intakt bleibt. Der verdaute Ansatz wurde anschließend mittels DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research) von Enzymen und kleinen DNA-Fragmenten aufgereinigt und in *E. coli* transformiert (siehe 5.2.3).

5.2.9 Restriktionsverdau, Ligation, Dephosphorylierung

Mittels Restriktionsverdau wurden PCR-Produkte, DNA-Fragmente bzw. Plasmide an den jeweils spezifischen Sequenzmotiven geschnitten. Dazu wurde die zu schneidende DNA zu 0,5-5 µg in einem 15 µl – Ansatz mit 0,5-1 µl Enzym in seinem entsprechenden Puffer für 1 Stunde beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms (meist 37°C) inkubiert. Einzelne Fragmente wurden in der gewünschten Anordnung in einer Ligationsreaktion ligiert. Dazu wurden die Fragmente in einem Verhältnis von 20 fmol zu 60 fmol (Vektor:Insert) in einem 15 µl Ansatz mit 0,5 µl Ligase und deren

Puffer zusammengegeben und 1 Stunde bei 22°C inkubiert. 4-6 µl des Ligationsansatzes wurden in *E. coli* transformiert. Bei der Restriktion eines Plasmides mit nur einem Enzym wurde vor der Ligation mit dem gewünschten Insert noch eine Dephosphorylierung vorgenommen, um einen einfachen Ringschluß zu verhindern. Dazu wurde das Plasmid in einem 15 µl – Ansatz mit 0,5 µl CIAP versetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde außer zur Konstruktion auch dazu benutzt, fertig klonierte Plasmide anhand des Fragmentmusters auf dem Gel zu kontrollieren. In **Tabelle 4** sind die nach Rsa I-Verdau entstehenden Fragmente des Expressionsvektors pcDNA3:LEHis (Glykosylierungsvarianten) (vgl. 5.2.12) aufgelistet.

Enzyme (Fermentas)	Enzyme (Fermentas)
<ul style="list-style-type: none"> ■ Bam H I, Hind III, Eco RI, Xho I, Sal I, Rsa I, Bgl II, Sac I, Pst I, Kpn I, Not I, Cpo I, Ehe I, Ehe II, Eco RV, Kpn 2I 	<ul style="list-style-type: none"> ■ T4 Ligase
<ul style="list-style-type: none"> ■ CIAP (<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Klenow Fragment

Tabelle 4: Fragmentgröße in Basenpaaren nach Verdau von pcDNA3:LEHis Glykosylierungsmutanten mit Rsa I

LEHis 010	LEHis 000	LEHis 011	LEHis 001	LEHis 101	LEHis 111	LEHis 110	LEHis 100	110 (S)	000 (S)
2418	2418	2418	2418	2418	2418	2418	2418	2418	2418
1751	1751	1751	1751	1751	1751	1751	1751	1751	1751
				574	574			574	
						550	550		
487	487	487	487	487	487	487	487	487	487
		375	375						375
351	351								
255	255	255	255	255	255	255	255	255	255
199	199	199	199						199

Fragmente, die kleiner als 170bp sind, waren bei allen Mutanten identisch.

5.2.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte im Sequenzierautomaten (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) mit den Reagenzien und nach Protokoll der Firma Applied Biosystems. Der erste Schritt ist eine PCR-Reaktion mit einer Mischung aus Deoxyuncleotiden (dNTPS) und fluoreszenzmarkierten Dideoxynucleotiden (ddNTPs), sowie einem spezifischem Primer. Von diesem Sequenzierprimer ausgehend synthetisiert die in der Reaktionsmischung enthaltene Polymerase wie bei einer PCR den komplementären DNA-Strang zum Matrizenstrang und baut dabei dNTPs ein. Wird jedoch durch Zufall statt eines dNTPs ein Dideoxynucleotid eingebaut, so wird ab hier die Polymerasereaktion gestoppt, da an Dideoxynucleotide keine weiteren Nucleotide chemisch verknüpft werden können. So entstehen statistisch verschieden große Fragmente, die jeweils an ihrer letzten Base durch das

ddNTP fluoreszenzmarkiert sind. Nach der Amplifikationsreaktion wurden die Proben mit 10 µl sterilem H₂O zu 20 µl Gesamtvolumen verdünnt und mittels Gelfiltrations-Säulchen aufgereinigt. Das Eluat wurde für 15' bei 37°C in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurden 20 µl TSR-Reagenz (ABI) bzw. *HiDi Formamide* (ABI) hinzu gegeben. Dann wurde die Probe für 2 Minuten auf 96°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde in spezielle Röhrchen umgefüllt und im Sequenzierautomat in einer Kapillare gemäß ihrer Größe aufgetrennt.

Reaktionsmischung für 1 Ansatz:	Programm:
<ul style="list-style-type: none"> ■ 2 µl DNA (100 ng) ■ 0,5 µl Primer (10 pmol) ■ 2 µl BDT v.1.1 (Big Dye Terminator, ABI) ■ 1 µl 5x Reaktionspuffer (ABI) ■ 4,5 µl H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 96°C – 1'; (96°C-10''; 50°C – 5''; 60°C – 4')x25; 10°C-∞

Kits

- Big Dye v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Nucleoseq (Macherey –Nagel)
- *Template Suppression Reagent* oder *HiDi Formamide* (Applied Biosystems)

5.2.11 Oligonucleotide

Die in folgender Tabelle aufgelisteten Primer und das L-Selektin Aptamer (Romig, TS, et al., 1999) wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

Tabelle 5: Name und Sequenz der verwendeten Oligonucleotide

Name	Sequenz 5´-3´
BGH rev	tagaaggcacagtcgagg
CD30leader L-Sel	gggttttcagaataatggtaagtccaggctcgtagcgccccag
CH3 His rev	tgtcactcgagttaccggagacagggagag
EGF – Ser mut rev	acagttgcaggtgtagctattgatgattctac
EGF IgG Bam rev	cgccgatccagttaccttgaatcacaactgacactg
EGF/IgG rev. Bam H I	cgcgatccacttactaccttgaatcacaactgacactg
Fwd mut L2 N1Q	gaccagtacacagatctggtgccatacaa
his stop rev	cctcagtgggtgggtgggtg
IgG hinge Xhol fwd	ccgctcgagcccaaatctgtgacaaaactcac
L1 fwd	accagagggacctgtggaacatcttc
L1 rev	gaagatgtccacagctgcctctgggt
L2 fwd	gacaattacacagatctggtgccatacaa
L2 rev	ttgtatggcaaccagatctgtgaattgtc
L3 fwd	gcctgccacaaaactgaaggcagccctc
L3 rev	gagggtgcctcagttgtggcaggc
LAM 600F	gggtactatggcccca
LAM BE	caagaggatccatgggctgcaga

LAM R480	gcaggcgtcatcgttcc
Leader L-Sel BamHI	aaggatccgccacatggtatttccatgg
Lektin rev. Xho	tttctcgagagaagctgtgtaacagagggc
L-sel – Ca2mut fwd	gatgcaggcaaatggctgctgcagcctgccacaaacta
L-Sel 1ATG fwd	aaggatccgccatggtgtttccctggaagtgcagagcacc
L-sel Bam Kozak	aaggatccgccatggtgtttccatggaaatgctc
L-Sel Bgl II IgG	aaagatctacttaccttgtaagtcagcagctcggg
L-Sel EGF Stop Eco	cggaattctcaaatcacaactgacactg
L-Sel rev Not I	aaagcggccgctcaaatcacaactgacactg
L-Sel Thrombin rev	aaaactcgaggctgccgcggggaccagaaactgacactggggcccatagtacc
L-Sel-Ca1mut fwd	ggagatggtgagcccctgctcaagaagaacaaggag
M13 fwd	gtaaacgacgcccagtg
M13 rev	ggaaacagctatgaccatg
N1/Q	gccgagaccagtacacagatttagttgcc
N2/Q	ggtgggaaccagaaatcttactg
N3/Q	gtagaaatcatcaatcagtacacctgcaactg
pET22b-sL/Xho	ctaatcattgactcgagttgtccaattttga
pPic9-Lektin XhoI	tctctcgagaaaagagaggcttgactaccattattc
pPic9-Lektin Xho I-fwd	tctctcgagaaaagagaggcttgactaccattattc
P-Sel pep fwd	gatcctatggcgaatgggtggatggttgac
Rev His-Tag End Xba I	gctctagatgagtggtgg
Rev mut L2 N1Q	ttgatggcaaccagatctgtgactggctc
Sel n-Xho 4010	cgctctcgagaaaagatggactaccattattctg
Sel-N-EcoR I	ttagcgaattctggactaccattattctg
SP6	atttaggtgacactatag
T3	attaaccctactaaagg
T7 verkürzt	taatacgactcactataggg
Thrombin rev BamHI	acggatccactacctccgcccgtgccgcggggaccagaaactg
5'-AOX1	gactggtccaattgacaagc
3'-AOX1	gcaatggcattctgacatcc
α factor sequencing primer	tactattgccagcattgctgc
COMP fwd Agel	tttaccggtggatgctgcccgcagatgcttcgggaactg
COMP rev Xho I	tttctcgaggctgctccgcccgggggtgcgggctgcatcccgcacgctcacactc
Camel linker fwd Sall/Age I	tttgtcagccccagccccagcacaagcctcagcacaagccccgagcctgagaccggtttt
Camel linker rev Agel	aaaaccggtctcaggctcgggctttgg
Fcm fwd BamHI	cggatccgtgattgctgagctgcctccc
Fcm rev Xho I	tttctcgagtccggagccgtagcaggtgccagctgtgctc

L-selektin Aptamer:

5'-(optional: Biotin-) gcggtaaccagtagcaaggtgctaacgtaattgg-3'

5.2.12 L-Selektin-Expressionsplasmide

In **Abb. 76** ist eine Karte des Plasmides pcDNA3 gezeigt, das für die Expression in Säugerzellen benutzt wurde. In **Tabelle 6** sind die Konstrukte aufgelistet, die mit den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen molekularbiologischen Methoden hergestellt wurden.

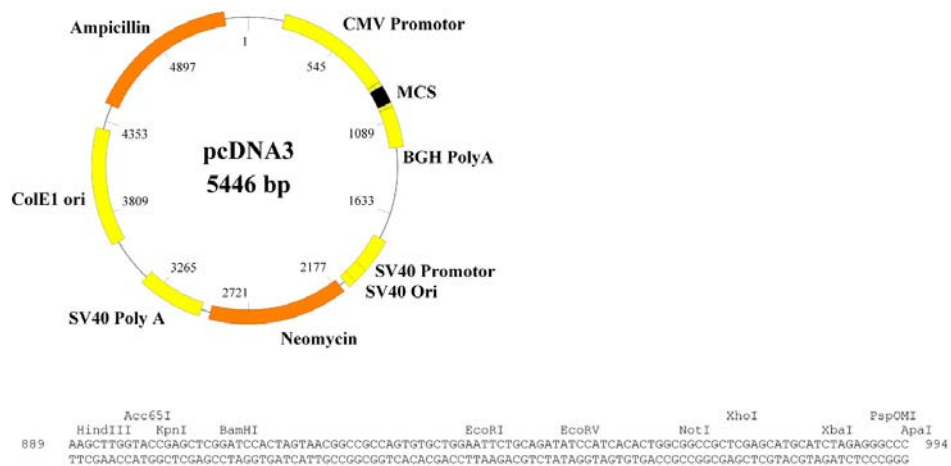


Abb. 76: pcDNA3 von Invitrogen; In diesen Vektor wurden die L- Selektin Sequenzen für die Expression in Säugerzellen kloniert.

Für die Expression in *Pichia pastoris* und *Sf9*-Zellen wurde die L-Selektin Sequenz von diesen Ausgangskonstrukten durch PCR oder Restriktion/Ligation in die entsprechenden Vektoren umkloniert. Umklonierungen in sind in den jeweiligen Abschnitten beschrieben. Die beiden Basis-Konstrukte pcDNA3:LEHis und pcDNA3:LEIgG gab es in mehreren Varianten (vgl. **Tabelle 6**). „Wt“ bezeichnet den Wildtyp, „N22Q“ z. B. bedeutet, dass das Codon für das Asparagin (N) 22 zum Codon für Glutamin (Q) mutiert wurde (ATT→CAG). Entsprechendes gilt für „N66Q“ und „N139Q“ etc. Bei „N139S“ wurde das ATT Codon des Asparagins 139 zu AGC (für Serin) mutiert. Durch diese Mutationen wurden Glykosylierungs-Konsensussequenzen zerstört, und der Übersichtlichkeit halber wurden die entstehenden Glykomutanten mit einem Code versehen, wobei eine „1“ für eine intakte Glykosylierungsstelle steht und eine „0“ für eine mutante. Die Glykomutanten und eine Wildtyp-Startvariante sind am 5' Bereich der Signalsequenz verkürzt (Beginn der Proteinsequenz mit MIFPW... statt des ursprünglichen MGCRRTRE....) und haben am putativen Translationsstart eine optimierte Kozaksequenz (s. **Abb. 77**). Die „CD30 leader“-Variante besitzt statt des L-Selektin-eigenen Signalpeptides jenes von CD30 und war über EcoR I in pcDNA3 inseriert. Die „1ATG“-Variante enthält stumme Mutationen im Signalpeptid, die dazu führen, dass nur ein einziges ATG-codon am putativen Translationsstart übrig bleibt. Ein Vergleich der Sequenzen ist in **Abb. 77** zusammengestellt.

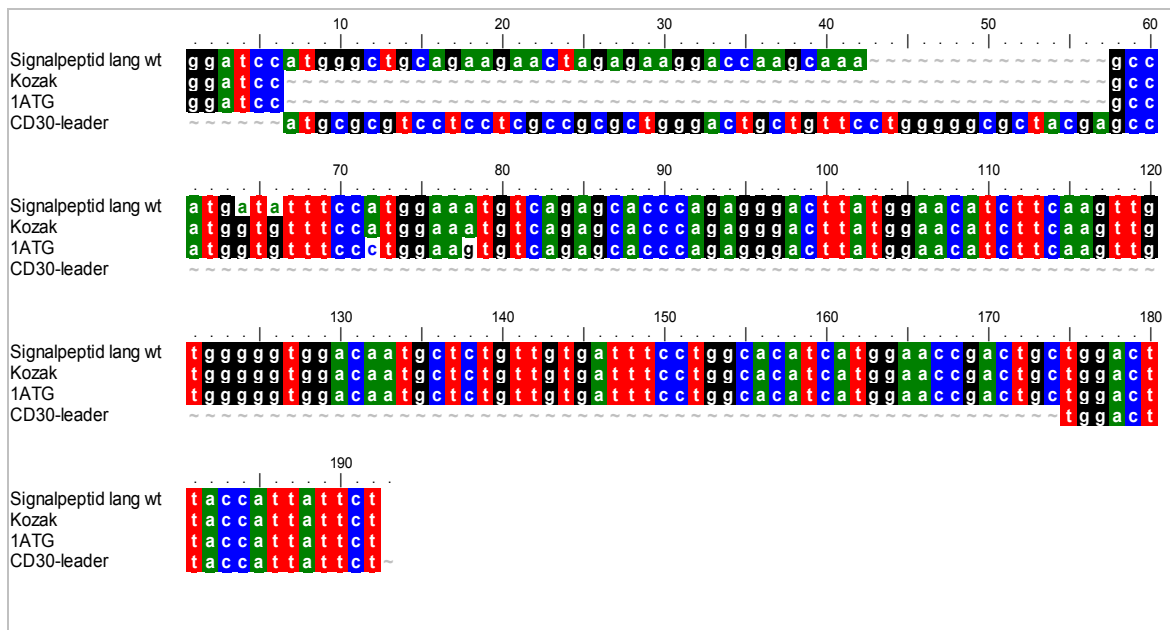


Abb. 77: Vergleich der verschiedenen L-Selektin- Sequenzen für den Translationsstart- und Signalpeptidbereich. Das Ende des Signalpeptides befindet sich bei Position 174.

Tabelle 6: Zusammensetzung von L-Selektin-Expressionsplasmiden. Die Sequenzen basieren auf Konstrukten aus der Dissertation von C.B. Fieger, 1998. (NCBI Entrez Nucleotide Acc. No. AJ246000)

Name	Zusammensetzung	Varianten (Code für Glykomutanten)
pcDNA3: LEHis	Der pcDNA3- Vektor wurde mit BamHI und Xho I geschnitten. Die L-Selektin Sequenz vom Signalpeptid bis zur EGF- Domäne wurde dazwischen eingefügt.(gga tcc atg ggc tgc aga aga act.....cc cag tgt cag ttt). Die EGF- Domäne schließt mit einer XhoI- Schnittstelle ab. Dahinter wurde ein Stück des Vektors pET22b+ (XhoI-EcoRV) eingefügt, das das His-tag und ein Stop-codon enthält. (ctc gag cac cac cac cac tga gat ccg gct ...aat aac tag c). Die EcoRV- Schnittstelle ist mit einem Stück aus pBluescript II KS(-) (EcoRV-at caa gct tat cga tac cg-Sall) ligiert. Die abschließende Sall-Schnittstelle wurde mit XhoI von pcDNA3 ligiert (t cga gca tgc atc ...)	wt (111) N22Q (011) N66Q (101) N139Q (110) N22Q, N66Q (001) N22Q, N139Q (010) N66Q, N139Q (011) N22Q, N66Q, N139Q (000) N22Q, N66Q, N139S (000(S)) "Kozak" "CD30-leader" "1ATG"
pcDNA3: LEIgG	Die L-Selektin Sequenz vom Signalpeptid bis EGF-Domäne (gga tcc atg ggc tgc aga aga act.....cc cag tgt cag ttt gtg att caa) wurde am 5'- Ende mit BamHI in den Vektor pcDNA3 ligiert. Nach der EGF Domäne folgt eine 5'-splice acceptor site und die Sequenz des humanen IgG Fc- Teils (ggt aag tgg atc cgg agg gag ggt gtc tgc.....gtg gca tga ggg agg ca) bis NotI, mit dem das Konstrukt am 3'-Ende im pcDNA3 Vektor ligiert ist. Das Konstrukt enthält Intronsequenzen und wird nach der Transkription gespleißt, so dass eine Fusion von L-Selektin Lektin-EGF mit humanem IgG Fc- Teil entsteht.	wt (111) N22Q, N66Q, N139Q (000)
pcDNA3:LE	Durch PCR wurde von pcDNA3: LEHis (111, 010, 000(S)) mit den Primern „LambE“ und „L-Sel EGF Stop Eco“ amplifiziert und mithilfe der Restriktionsschnittstellen Bam H I und Eco R I in den Vektor pcDNA3 eingefügt Dies ist das L-Selektin-Lektin-EGF- Konstrukt ohne Affinitätstag.	N22Q, N139Q (010) wt (111) N22Q, N66Q, N139S, (000(S))

pcDNA3: LECOMPHis	Mithilfe der Primer „COMP fwd Agel“ und „COMP rev XhoI“ wurde ein PCR-Fragment der Pentamerisierungsdomäne des humanen COMP mit den gewünschten Schnittstellen an den Enden erzeugt. Als Templat diente eine cDNA aus der IMAGE cDNA clone collection (RZPD clone ID: IMAGp998J1511439). Mithilfe der Primer „Camel linker fwd Sall/Agel“ und „Camel linker rev Agel“ wurde die Sequenz einer Linkerregion generiert, die der hinge-region von IgG aus dem Kamel entspricht. Die Fragmente wurden ligiert und über die Schnittstellen Sall /XhoI in pcDNA3:LEHis (XhoI geschnitten) inseriert.	wt
pcDNA3: LEIgM	Mithilfe der Primer „Fcm fwd BamHI“ und „Fcm rev XhoI“ wurde ein PCR-Fragment des Fc μ - Teils von humanem IgM (Acc. No. AAH73767) mit den gewünschten Schnittstellen generiert. Lektin-EGF wurde mit BamHI aus pcDNA3:LEIgG geschnitten und in pCRIIblunt TOPO: IgM zwischenkloniert. Hieraus wurde das Gesamte Fragment in pcDNA3 über Hind III und XhoI umkloniert.	wt

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Expression rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris*

Die Expression rekombinanter Proteine in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* wurde mit den Materialien und nach dem Protokoll des *Pichia Expression Kit* von Invitrogen durchgeführt. Es wurden die in dem Kit enthaltenen Hefestämme GS115 (Genotyp *his4*; Phänotyp Mut⁺) und KM71 (Genotyp *arg4, his4 aox1::ARG4*; Phänotyp Mut^S, Arg⁺) verwendet. Die Phänotypen dieser Stämme macht man sich für die Evaluation von Integrationsereignissen zunutze. Das AOX1 Gen codiert für eine Alkoholoxigenase, die der Hefe ermöglicht, auf Methanol als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die Expression ist auf dem Transkriptionslevel in einem Repressions/Derepressions-Mechanismus, gekoppelt mit einem Induktionsmechanismus durch Methanol, reguliert. Bei einem Verlust des AOX1-Gens ändert sich der Phänotyp zu Mut^S (Methanol ut^Silisation slow), das heißt die Zellen wachsen langsam auf Methanolmedium. Der Methanolmetabolismus wird nun nur noch vom Genprodukt des AOX2-locus bewerkstelligt, das allerdings wesentlich schwächer exprimiert wird. Mut⁺ bezieht sich auf den Wildtyp, der schnell auf Methanolmedium wächst. Die verwendeten Stämme sind außerdem auxotroph für Histidin (*his4*), ein Marker, der sich gut komplementieren lässt.

Aus dem Kit wurden die Vektoren pHilS-1 und pPIC9 verwendet. Die L-Selektin-Inserts wurden durch PCR mit den Primern „Sel-N-EcoRI“ und „L-Sel EGF Stop Eco“ (s. **Tabelle 5**) vom pcDNA3:LEIgG -Vektor (s. **Tabelle 6**) (wt bzw. N22Q/N66Q/N139Q) amplifiziert. Die PCR Produkte wurden dann über die EcoR I-Schnittstellen in pHilS-1 und pPic9 ligiert. Die Vektoren enthielten eine Sequenz, die für das α -factor prepro Peptid von *Saccharomyces cerevisiae* codiert, die das zu exprimierende Protein in den sekretorischen Apparat dirigiert. Dadurch sollen rekombinante Proteine in den Kulturüberstand sekretiert werden. Das Gen für das zu exprimierende Protein wurde hinter diese Signalsequenz eingefügt. Anschließend folgt im Vektor das HIS4- Gen, sowie ein Translationsterminationssignal. Flankiert wird diese Expressionskassette von Teilen des AOX1-

Gens; durch dessen im 5'-Bereich vorhandenen Promotor die Expression reguliert wird.

Die fertigen Plasmide wurden mit Sac I linearisiert. Diese Schnittstelle befindet sich im 5'-AOX1-Promotorbereich und führt dazu, dass das transformierte Plasmid durch homologe Rekombination an den die Expressionskassette flankierenden AOX1-Sequenzen in das *Pichia* Genom integriert (*Omega Insertion*). Dadurch wird das genomische AOX1-Gen durch die Expressionskassette des Vektors ersetzt. Wird nun der AOX1-Promotor durch Zugabe von Methanol als einzige Kohlenstoffquelle aktiviert, so wird statt des AOX1-Gens die Expressionskassette transkribiert. Da sich in der Expressionskassette außerdem noch das HIS4 Gen befindet, verändert sich bei erfolgreicher Insertion der Phänotyp der Hefe von His⁻ zu His⁺.

Für die Transformation des linearen Plasmids wurden über Nacht 5 ml *Pichia pastoris* – Vorkultur in 5 ml YPD-Medium bei 30°C im Schüttelinkubator angezogen. Am nächsten Morgen wurden 0,1-0,5 ml dieser Über Nachtkultur in 100 ml YPD verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde 5 Minuten bei 1500g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 100 ml eiskaltem sterilem H₂O resuspendiert. Die Suspension wurde erneut wie oben abzentrifugiert und das Pellet anschließend mit 50 ml eiskaltem sterilem H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 4 ml eiskalter steriler 1-molarer Sorbitollösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 300 µl 1-molarer Sorbitollösung resuspendiert. Davon wurden 80 µl–Aliquots auf Eis gelagert für die Elektroporation benutzt. 80 µl Zellsuspension wurde mit 5-20 µg DNA vermischt, in eine Elektroporationsküvette gegeben (0,4 cm Spalt) und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Küvette in den Elektroporator gestellt (Gene Pulser II, Bio-Rad) und bei 1,5 kV und 25 µF elektroporiert. Sofort danach wurden 250 µl eiskalte 1-molare Sorbitollösung dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen in 100-600 µl Aliquots auf RDB (-His)-Platten ausplattiert und mindestens 2 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die Kolonien, die auf histidindefizienten Platten wachsen konnten, wurden mittels direktem PCR-Screening mithilfe der 5'-AOX1- und 3'-AOX1-Primer auf Insertion überprüft. Dazu wurde etwas Zellmaterial von der Platte abgekratzt und in 30 µl H₂O resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurde zum PCR-Mix (Pro Ansatz: 5 µl 10 x PCR- Puffer, 5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTPs (10 mM je), 1 µl 5'-AOX1 Primer (10 pM), 1 µl 3'-AOX1-Primer (10 pM), 22 µl H₂O) hinzugegeben. Diese Mischung wurde 90 Sekunden in der Mikrowelle bei maximaler Leistung behandelt. Anschließend wurden die Ansätze bei -80°C eingefroren, wieder aufgetaut und in den vorgeheizten PCR-Block gestellt, in dem dann nach Zugabe von je 5 µl Taq-Polymerase (0,16 U/µl) das Programm gestartet wurde (95°C-1'; (95°C-1'; 54°C-1'; 72°C-1')x30; 72°C-10', 15°C-∞). Positive Klone wurden dann zur Expression angezogen. Dazu wurde etwas Zellmaterial von der Masterplatte in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 5 ml YPD gegeben, mit Gaze abgedeckt und bei 30°C schüttelnd inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Hefen abzentrifugiert und in Glycerol-Medium (BMG oder BMGY) resuspendiert. Nach weiteren zwei Tagen wurde die Kultur zur Induktion der Expression 1/10 verdünnt in Methanolmedium (BMM oder BMMY) umgesetzt. Alle 24 Stunden wurde 100% Methanol zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugegeben. Nach ca. 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden Inkubation wurde eine Probe von 500 µl abgenommen, durch Zentrifugation in Medium und Zellen getrennt, und durch SDS-PAGE und Western Blot auf Proteinexpression analysiert. Die Expressionsbedingungen wurden in folgenden Punkten variiert: Inkubation bei 26°C, 28°C, 30°C; pH

-Wert des Mediums: BMMY pH 4, pH 5, pH 6,5. Außerdem wurden die o. g. verschiedenen Vektoren, L-Selektin-Varianten (Wildtyp und Glykosylierungsstellen- Mutante) und Hefestämme getestet, sowie Minimal- oder Komplexmedien.

<p>YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ■ 1 % Hefeextrakt ■ 2 % Pepton ■ 2 % Dextrose 	<p>MD/MM (Minimal Dextrose Medium/Minimal Methanol Medium)</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ■ 1,34 % YNB (Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat ohne Aminosäuren) ■ 4×10^{-5} % Biotin ■ 2 % Dextrose oder 0,5 % Methanol ■ Ggf. 15 g/L Agar hinzugeben
<p>BMG/BMM (Buffered Minimal Glycerol/Buffered Minimal Methanol Medium)</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ■ 100 mM Kaliumphosphat pH 6,0 ■ 1,43 % YNB ■ 4×10^{-5} % Biotin ■ 1 % Glycerin oder 0,5 % Methanol 	<p>BMGY/BMMY (Buffered Glycerol/Methanol Complex Medium)</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ■ 1 % Hefeextrakt ■ 2 % Pepton ■ 100 mM Kaliumphosphat pH 6,0 ■ 1,34 % YNB ■ 4×10^{-5} % Biotin
<p>RD (Regeneration Dextrose Medium)</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ■ 1 M Sorbitol ■ 2 % Dextrose ■ 1,34 % YNB ■ 4×10^{-5} % Biotin ■ 0,005 % Aminosäuren (je L-Glutaminsäure, L-Methionin, L-Lysin, L-Leucin, L-Isoleucin) ■ Ggf. für Platten 20 g/L Agar hinzufügen 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 1 % Glycerin oder 0,5 % Methanol

reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5' gekocht. Anschließend wurden die Fraktionen durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

5.3.3 Solubilisierung von Proteinen aus der Membranfraktion

Für die Solubilisierung von Proteinen aus der Membranfraktion wurden die Zellen zunächst wie unter Punkt 5.3.2 beschrieben fraktioniert. Der Überstand von 15 ml Zellysate wurden nach einem ersten Zentrifugationsschritt, 5' bei 355g, in der Ultrazentrifuge (Beckmann) 60 Minuten bei 4°C und 36000rpm im Ti60 Rotor (Beckmann) abzentrifugiert. Das Pellet wurde aus dem Zentrifugenröhrchen gelöst und in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gebracht. Dort wurde es mit einem Pistill in 500 µl TBS, 1 mM EDTA homogenisiert und in zwei Aliquots aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit 40 µl einer 100 mg/ml Lösung n-octyl-β-D-maltopyranosid (Sigma) in TBS versetzt und zu 2 ml mit TBS/EDTA aufgefüllt. Die andere Hälfte wurde mit 4 M MgCl₂-Lösung zu einer Endkonzentration von 1,3 mol/L versetzt. Die Suspensionen wurden 1 Stunde auf Eis gerührt. Anschließend wurden die Proben erneut wie oben in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in Dialyseschläuche gefüllt (SpectraPor, 3K MWCO, Spektrum) und 1 Stunde bei 4°C auf je 1 L TBS dialysiert. Anschließend wurde der Dialysepuffer erneuert und über Nacht fertig dialysiert.

5.3.4 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen: Sf9

5.3.4.1 Konstruktion von Baculovirus-DNA (Bacmid)

Die Expression von L-Selektin-Varianten in Insektenzellen erfolgte mit dem Material und angelehnt an das Protokoll des *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System* von Invitrogen. Das in dem Kit enthaltene Donor-Plasmid pFastBacHTA enthält ein N-terminales 6x His-tag mit einer TEV- (*Tobacco etch virus*) Proteaseschnittstelle, die in diesem Falle jedoch nicht erwünscht war. Also wurde der Vektor wie folgt modifiziert: 1. Verdau mit Cpo I (pos. 4038, direkt hinter der Promotorsequenz) und Ehe I (pos. 4121, direkt hinter der Sequenz für die TEV-Proteaseschnittstelle), 2. Reinigung der DNA mit *DNA Clean & Concentrator Kit* (Zymo), 3. Auffüllreaktion der überhängenden 5'-Enden mit Klenow Fragment. Dazu wurden in einem 20 µl-Ansatz 0,5 µl Klenow Fragment (Fermentas) mit entsprechendem Puffer und 0,5 µl dNTPs zu ca. 4 µg DNA hinzu gegeben und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 4. Erneute Aufreinigung der DNA. 5. Blunt-Ligation mittels T4 DNA Ligase (Fermentas): Zugabe von 0,5 µl Ligase und entsprechendem Ligase-Puffer (Fermentas) in einem 15 µl-Ansatz zu aufgereinigter DNA. Das entstehende Plasmid enthält keine TEV-Proteaseschnittstelle mehr und ist weder mit Ehe I noch mit Cpo I spaltbar. In dieses modifizierte Plasmid wurde L-Selektin Lektin-EGF-His, das mit Bam HI und Hind III aus pcDNA3:LEHis geschnitten worden war, über die Bam HI und Hind III-Schnittstellen der *Multiple cloning site* eingebracht. Das fertige Konstrukt wurde in den *E. coli* Stamm DH10Bac transformiert. Dieser Stamm enthält ein Bacmid (bMON14272), auf dem ein *mini-F replicon*, ein Kanamycin-Resistenzmarker und ein Segment für das LacZα-Peptid enthalten ist. Innerhalb des LacZα-Gens befindet sich eine Anlagerungsstelle für das bakterielle Transposon Tn7 (*mini-attT7*). Die Transposase wird von einem Helfer Plasmid (pMON7124) codiert, das sich ebenfalls in DH10Bac

befindet und eine Tetrazyklin-Resistenz vermittelt. Die rekombinanten Bacmide entstehen durch Transposition des mini-Tn7 – Elements, das auf dem pFastBacHTA Donor Plasmid codiert ist, in die *mini-attT7*-Anlagerungsstelle des Bacmids. Dadurch wird in dem Bacmid das gewünschte Gen eingefügt und das im Bacmid enthaltene LacZ α -Gen separiert, wodurch die Bakterien die Fähigkeit verlieren, spaltbare chromogene Substanzen wie X-Gal in einen blauen Farbstoff umzuwandeln. Somit lässt sich auf dem entsprechenden Substrat in Gegenwart des Induktors IPTG anhand der Farbe der Bakterienkolonie erkennen, ob eine Transposition vom Donor Vektor in das Bacmid erfolgt ist (*blue-white screening*). Die DH10Bac Bakterien wurden in LB mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin angezogen und nach dem TSS-Protokoll chemisch kompetent gemacht (s. 5.2.2). 100 μl kompetente *E. coli* DH10Bac wurden in ein vorgekühltes 15 ml – Röhrchen gegeben, 1 ng pFastBacHTA::L-Selektin Konstrukt hinzu gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden ohne Schütteln und eine Inkubation von 2 Minuten auf Eis. Dann wurden 900 μl SOC – Medium hinzu gegeben und bei 37°C und 225 rpm 4 Stunden geschüttelt. Nach dieser Inkubationszeit wurde eine 10fach Verdünnungsreihe hergestellt und 100 μl jeder Verdünnungsstufe (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , etc.) auf LB Agarplatten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, 7 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin, 100 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal und 40 $\mu\text{g/ml}$ IPTG ausplattiert. Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurden weiße Kolonien gepickt und analysiert. Dazu wurde das Bacmid nach folgendem Protokoll isoliert: Eine Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37°C in 2 ml LB mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin, 7 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin angezogen. 1,5 ml der Über Nachtkultur wurde bei 20800g für 1 Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in 0,3 ml P1 resuspendiert. Dann wurden 0,3 ml P2 hinzu gegeben und sachte vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,3 ml P3 hinzu gegeben und vermischt. Diese Mischung wurde für 5-10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 20800g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 0,8 ml Isopropanol versetzt. Nach 5-10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die so gefällte DNA bei 20800g für 15 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Wiederum wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 40 μl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen. Die Transformanten wurden mittels PCR analysiert. 100 ng präpariertes Bacmid wurden dazu mit 5 μl 10 x PCR-Puffer, 1 μl dNTPs (10 mM each), 1,5 μl MgCl₂ (50 mM), 2,5 μl Primermix (1,25 μl je 10 μM M13 fwd. (-40) und M13 rev.), 38,5 μl H₂O und 0,5 μl Taq Polymerase (Fermentas) versetzt und bei folgendem Temperaturzyklus inkubiert: 93°C-3' (94°C-45''; 55°C-45''; 72°C-5') x 35; 72°C-7'. Die erwarteten Fragmente sind: ~300 bp für das Bacmid allein und 2300bp + Größe des Inserts bei einem transponierten Bacmid.

Alkalische Lyse: Puffer 1 (P1)

- 50 mM Tris HCl, pH 8,0
- 10 mM EDTA
- 100 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA

Alkalische Lyse: Puffer 2 (P2)

- 200 mM NaOH
- 1 % SDS (w/v)

SOC-Medium

Alkalische Lyse: Puffer 3 (P3)

- 3,0 M Kaliumacetat
 - pH 5,5
 - 1 ml 2M Mg²⁺ (1M MgCl₂, 1M MgSO₄) zufügen
 - pH 7, sterilfiltrieren
-
- 200 µl 1M NaCl
 - 666 µl 1M KCl
 - 0,55 g Hefeextrakt
 - 2 g Trypton
 - ad 98 ml ddH₂O
 - lösen, autoklavieren, auf 55°C abkühlen

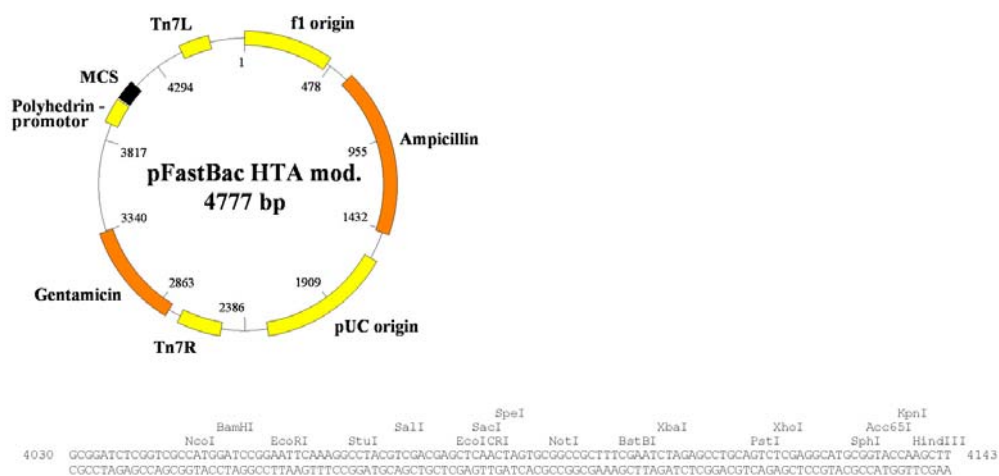


Abb. 80: pFastBac HTA (Invitrogen) mod. = modifizierte Form ohne His-Tag und TEV-Protease-Schnittstelle. Beschreibung der Modifikation im Text, Abschnitt 5.3.4.1.

5.3.4.2 Kultivierung von Sf9-Zellen

Die Insektenzellen Sf9 wurden in *Grace's Insect culture medium* (Invitrogen) mit 10 % FCS (PAA) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA) bei 27°C kultiviert. Alle 3-4 Tage nach der Aussaat erreichten die adhären wachsenden Zellen 100 % Konfluenz und wurden subkultiviert. Dazu wurden die Zellen unter der Sterilbank von der Zellkulturflasche mit einem Zellheber abgeschabt und die Zellzahl bestimmt. Das Medium wurde 5' bei 500xg abzentrifugiert und abgesaugt. Das Zellpellet wurde in frisches Medium aufgenommen und zu 3-5 x 10⁴ Zellen pro cm² Wuchsfläche erneut ausgesät.

5.3.4.3 Kryokonservierung von Sf9-Zellen

Zur Kryokonservierung wurden Zellen in der gewünschten Menge expandiert und in ihrer *Mid-log* Phase geerntet. Das Einfriermedium (frisches Kulturmedium, 10 % FCS mit 7,5 % DMSO) wurde auf 4°C vorgekühlt. 1-2x10⁷ Zellen pro ml wurden nach dem Abzentrifugieren in dem Einfriermedium resuspendiert. In Cryoröhrchen (Nunc) wurden sie im Einfriergerät (*Nicool LM10*, Air

Liquide) 30 Minuten auf Stufe 3 und 10 Minuten auf Stufe 10 abgekühlt und anschließend im Flüssigstickstoff-Tank aufbewahrt.

5.3.4.4 Transfektion von Sf9-Zellen

Zur Transfektion von Bacmiden in Sf9 Zellen und damit Generierung von Baculoviren wurden in einer 6-well Zellkulturschale 9×10^5 Zellen pro well ausgesät. Mindestens 1 Stunde wurden die Zellen inkubiert um sich an den Schalenboden anzuheften. Die aufgereinigte Bacmid-DNA wurde auf 500 ng/ μ l in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 eingestellt. 2 μ l dieser Lösung wurden in 100 μ l un-supplementiertem Medium verdünnt. 6 μ l Cellfectin (Invitrogen) wurde in 100 μ l un-supplementiertem Medium verdünnt. Anschließend wurden die beiden Verdünnungen zusammengegeben und 15 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 2 ml un-supplementiertem Medium gewaschen. Zu den DNA:Lipid-Komplexen, die sich jetzt geformt haben sollten, wurden 0,8 ml un-supplementiertes Medium hinzu gegeben und vermischt. Diese Lösung wurde nun auf die Zellen pipettiert und 5 Stunden bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen Vollmedium (mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) ausgetauscht. Die Zellen wurden in den folgenden 72 Stunden auf Anzeichen einer Infektion unter dem Lichtmikroskop untersucht. In der frühen Phase der Infektion sind erhöhte Zelldurchmesser und eine erhöhte Nucleusgröße zu erkennen (24 h). In der späten Phase (24-72 h) stellen die Zellen das Wachstum ein, erscheinen granulär und beginnen, sich vom Untergrund loszulösen. In der sehr späten Phase (>72 h) lysieren die Zellen und die zusammenhängende Zellschicht löst sich auf. Sobald die Zellen Anzeichen der Infektion zeigten, wurde 2 ml Kulturüberstand abgenommen und 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und als P1 Baculoviralen *stock* bezeichnet, da sich die Viren im Kulturüberstand befinden. Dieser *stock* wird bei 4°C lichtgeschützt gelagert und kann nun zu nachfolgenden Infektionen verwendet werden.

5.3.4.5 Baculovirus-Titerbestimmung

Zur Infektion mit der optimalen MOI (*multiplicity of infection*) muss der Virustiter im P1 *stock* bestimmt werden. Dies wurde mit dem Rapid Titer Kit von BD Biosciences nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

5.3.4.6 Proteinexpression in Sf9-Zellen

Zur Untersuchung der für die Proteinexpression optimalen MOI wurden im 6-well Format je $0,5 \times 10^6$ Zellen pro well ausgesät, 1 Stunde anhaften gelassen, verschiedene Mengen des P1 oder P2 baculoviralen *stock* mit entsprechend bestimmter MOI hinzu gegeben (MOI 1- 5) und nach 48 Stunden Inkubation mittels SDS-PAGE und Western Blot die Proteinexpression analysiert. Um nach der Proteinexpression im analytischen Maßstab im präparativen Maßstab zu wechseln, wurden die o.g. Mengen lediglich hochskaliert. Um den Virus-Stock zu amplifizieren wurden 2×10^6 Zellen pro well einer 6-well Schale (9,6 cm²) ausgesät, 1 Stunde anhaften gelassen, eine einer MOI von 0,5-1 entsprechende Menge P1 *stock* hinzu gegeben und für 48h bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand wie zuvor abgenommen, zentrifugiert und als P2 Virus-*stock* gelagert. Eine

Wiederholung dieser Prozedur führt zu P3, und P4.

5.4 Expression rekombinanter Proteine in CHO-Zellen

5.4.1 Zellkultur

CHO-K1 (*chinese hamster ovary cells*, DSMZ Braunschweig) wurden in DMEM (*high glucose* mit L-Glutamin, PAA) mit 10 % FCS (Biochrom AG) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) in Standard-Zellkulturschalen oder -Flaschen (BD Falcon, Nunc oder Sarstedt) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle 3-4 Tage, nach Erreichen von 100 % Konfluenz, wurden die Zellen in neues Medium umgesetzt. Dazu wurde der alte Kulturüberstand unter der Sterilbank abgesaugt, die Zellschicht einmal mit PBS (PAA, 37°C) gewaschen und mit ca. 2 ml pro 100 cm² mit Trypsin/EDTA (Invitrogen) versetzt. Nach 1-2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur lösten sich die Zellen ab und wurden unter Zugabe von ca. 10 ml Vollmedium abgespült und in ein 50 ml- Zentrifugenröhrchen überführt (Mengenangaben für eine 100 cm²-Schale, für größere Schalen und Flaschen wurde entsprechend mehr der Lösungen eingesetzt). Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 500g wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Lebendzellzahl wurde mittels Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden bei jedem Umsetzen etwa um den Faktor 1:10 verdünnt.

CHO *lec 1* (*chinese hamster ovary cells, lec 1 mutation*, (Stanley *et al.*, 1975)) wurden von ATCC unter der Nummer CRL-1735 bezogen. Grundsätzlich wurden diese Zellen analog der CHO-K1 Zellen behandelt. Die Zellen wurden bei der Passagierung zur permanenten Kultur zu 3x10⁴ Zellen/ml in α -MEM (PAA) mit 10 % FCS (Biochrom AG) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA) ausgesät. Für die Proteinproduktion wurden 1,7 x 10⁷ Zellen pro Hyperflask ausgesät und 10 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Produktion wurde außerdem FCS mit sehr geringem IgG-Gehalt verwendet (FCS *ultra-low IgG*, GIBCO).

5.4.2 Kryokonservierung von CHO-Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und 5' bei 500 x g sedimentiert. Das Pellet wurde mit kaltem Einfriermedium zu 2-3 x 10⁶ Zellen/ml resuspendiert und in Cryoröhrchen (Nunc) überführt. Im Einfrierautomaten (Nicoool LM10, Air Liquide) wurden sie 30 Minuten auf Stufe 3 und 10 Minuten auf Stufe 10 abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen im Stickstofftank aufbewahrt.

Einfriermedium

- 5 % DMSO (v/v) in Vollmedium

5.4.3 Transfektion von CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden mit *ExGen500* (Fermentas) nach Protokoll des Herstellers oder mithilfe von Polyethylenimin (Aldrich #40872-7; 25 kDa) transfiziert. Am Tage vor der Transfektion wurden

die Zellen so ausgesät, dass sie am Tage der Transfektion zu 80 % Konfluenz erreicht haben sollten. Pro 1×10^6 Zellen wurden 1 µg DNA und 1-5 µg Polyethylenimin (PEI) eingesetzt. Für einen 30 ml-Ansatz wurde die DNA in 1ml serumfreies Medium oder 1 ml 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Ebenso wurde die PE-Lösung (0,45 mg/ml in H₂O, pH neutralisiert) in 1 ml serumfreiem Medium verdünnt. Bei einem größeren Transfektionsansatz wurden die Mengen entsprechend skaliert. Die DNA-Verdünnung wurde langsam unter Mischen zu der PEI-Verdünnung hinzu gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die so gebildeten DNA:PEI-Komplexe wurden dann zu den Zellen dazugegeben. Ein Medienwechsel ist nicht nötig und nach 1-3 Tagen kann der Kulturüberstand auf den Gehalt rekombinanter Proteine überprüft werden. Mit dem Vektor pcDNA3 (s. 5.2.12) transfizierte Zellen erhalten eine Geneticin-Resistenz und können durch Zugabe von 0,5 - 1 mg/ml Geneticin (G418, Biochrom AG) 24 Stunden nach der Transfektion unter Selektionsdruck gestellt werden, wenn eine stabile Transfektion erwünscht ist. Nach ca. 2-3 Wochen ist die Selektion abgeschlossen und die Zellen können mit 0,2 mg/ml Geneticin weiterkultiviert werden. Um Zellklone zu erzeugen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion unter Selektionsdruck in einer Konzentration von 0,5 Zellen pro well in 96-well Zellkulturplatten ausgesät. Die wells wurden regelmäßig kontrolliert, ob sie eine oder mehrere Zellen enthalten. Erkannte Klonkolonien wurden dann einzeln vermehrt und analysiert.

CHO *Iec1* Zellen wurden mithilfe des amaxa Nucleofector (amaxa, Lonza) nach Angaben des Herstellers durch Elektroporation transfiziert. Stabile Zelllinien wurden mit 1 mg/ml G418 selektioniert und zur Stammhaltung mit 0,8 mg/ml G418 (Biochrom AG) kultiviert.

5.4.4 Expression rekombinanter Proteine in HEK293F-Zellen

5.4.4.1 Kultur von HEK293F-Zellen

HEK293F-Zellen sind an serumfreies Medium und Wachstum in Suspension in einer Schüttelkultur adaptierte HEK293 Zellen (human embryonic kidney cells) und Bestandteil des *Freestyle 293 Expression System* von Invitrogen. Die Zellen werden in Freestyle 293 Medium (Invitrogen) in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml ausgesät und zu maximal 40 % des Kulturkolbenvolumens in PP- oder Glas-Erlenmeyerkolben bei 37°C, 8 % CO₂ und 96 rpm geschüttelt kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml wurden die Zellen in frisches Medium umgesetzt. Dafür wurden sie 5 Minuten bei 500 x g sedimentiert und nach Absaugen des Überstandes in neuem Medium durch vortexen für 1 Minute resuspendiert. Die konzentrierte Zellsuspension wurde dann auf die gewünschte Zelldichte verdünnt auf die Kulturkolben aufgeteilt.

Kulturkolben

- PP-Erlenmeyerkolben 150ml, 250 ml (Corning)
- Weithals-Erlenmeyerkolben 1 L (Schott) mit Steristopfen (VWR)

Schüttelinkubatoren

- Horizontaler Kreisschüttler 3005 (GFL), betrieben in CO₂-Brutschrank (Heraeus)
- Brutschrank mit Schütteltableau und CO₂ Begasung: *Multitron* (Infors)

5.4.4.2 **Bestimmung der Zellzahl**

Zellen wurden im 1:1-Verhältnis mit Trypanblau (0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung, Biochrom AG) versetzt in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Zellaggregate wurden als Differenz von Einzelzellen zu Gesamtzellzahl berechnet.

5.4.4.3 **Kryokonservierung von HEK293F-Zellen**

HEK293F-Zellen wurden nach Abzentrifugieren für 5' bei 500 x g in einer Dichte von 5-8 x 10⁶ Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert. In Cryoröhrchen (Nunc) wurden die Zellen in einem Einfriergerät (Nicoool LM10, Air Liquide) 30 Minuten auf Stufe 3 und 10 Minuten auf Stufe 10 abgekühlt und schließlich im Flüssigstickstoff- Tank aufbewahrt.

Einfriermedium

- 90 % Freestyle 293 Expression Medium (Invitrogen)
- 10 % DMSO

5.4.4.4 **Transfektion von HEK293F-Zellen**

Die HEK293F-Zellen wurden mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien transfiziert. Die Zellen wurden zur Transfektion jeweils zu 1 x 10⁶ Zellen/ml in frischem Medium ausgesät. Für die Proteinexpression im großen Maßstab wurden mehrere Erlenmeyerkolben angesetzt; für Testexpressionen im kleineren Maßstab wurden die Zellen in einer 6-well-Schale kultiviert.

Metafectene (Biontex)

Pro 1 x 10⁶ Zellen wurden 1 µg Plasmid eingesetzt. Das Plasmid wurde 1:50 (kleiner Ansatz) - 3:100 (großer Ansatz) in Opti-MEM (Invitrogen) verdünnt. Pro µg Plasmid wurden 1-6 µl Metafectene 1:50 - 3:100 in Opti-MEM verdünnt. Die DNA-Verdünnung wurde zu der Transfektionsreagenz-Verdünnung gegeben und 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionskomplexe zu den Zellen gegeben.

ExGen500 (Fermentas)

Pro 1 x 10⁶ Zellen wurden 1 µg Plasmid eingesetzt. Das Plasmid wurde 1:100 in 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Pro µg Plasmid wurden 2,5 µg, 3 µl oder 3,5 µg *ExGen500* zu der DNA-Verdünnung hinzu gegeben, gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zu den Zellen gegeben.

Calciumphosphat-Transfektion

Pro 1 x 10⁶ Zellen wurden 0,5, 1 und 2 µg Plasmid eingesetzt. Das Plasmid wurde mit 2,5 µl 2,5 M CaCl₂ gemischt und auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden 25 µl 2 x HBS-Lösung langsam unter stetigem Rühren hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Komplexe zu den Zellen gegeben.

2 x HBS

- 280 mM NaCl
- 50 mM HEPES
- 1,5 mM Na₂PO₄
- pH 7,1

293fectin (Invitrogen)

Pro 1×10^6 Zellen wurden $1 \mu\text{g}$ Plasmid eingesetzt. Das Plasmid wurde 1:50 – 3:100 in Opti-MEM (Invitrogen) verdünnt. Pro μg Plasmid wurde 1-3 μl 293fectin 1:50-3:100 in Opti-MEM verdünnt. Die DNA-Verdünnung wurde anschließend langsam unter Mischen zu der 293fectin-Verdünnung hinzu gegeben und 20-30' bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionskomplexe zu den Zellen gegeben.

Polyethylenimin (PEI, Aldrich)

Pro 1×10^6 Zellen wurden $1 \mu\text{g}$ Plasmid eingesetzt. Das Plasmid wurde 1:50 – 1:300 in Opti-MEM (Invitrogen) verdünnt. Pro μg Plasmid wurden 1-4 μg PEI (# 40872-7, Aldrich) eingesetzt. Die PEI-Lösung (0,45 mg/ml in H₂O, pH neutralisiert) wurde ebenfalls 1:50-1:300 in Opti-MEM verdünnt. Die DNA-Lösung wurde zu der PEI-Lösung unter Mischen hinzu gegeben und 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Komplexe zu den Zellen gegeben.

Um die N-Glykosylierung rekombinant exprimierter Proteine zu hemmen, wurde das Medium 24 Stunden nach der Transfektion gegen frisches Medium mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunicamycin (Sigma) ausgetauscht. Nach 3 Tagen Inkubation wurde der Zellkulturüberstand geerntet und die Proteinexpression analysiert.

5.5 Chromatographische Methoden

5.5.1 IMAC (Immobilized metal affinity chromatography)

Die L-Selektin-Konstrukte, die mit einem 6xHis-tag exprimiert wurden, wurden aus dem Kulturüberstand durch Affinität an Ni-NTA-Agarose (Qiagen) aufgereinigt. Wenn die Expression in 293-Freestyle Medium stattfand, musste dem Medium vor der Inkubation mit der Ni-NTA-Säule 1 mM NiSO₄ zugegeben werden, da die Ni-Ionen ansonsten von Inhaltsstoffen des Mediums von der Säule gewaschen wurden. Die Ni-NTA-Matrix hat eine Kapazität von ca. 5 mg/ml. Entsprechend der erwarteten Proteinmenge Menge wurde eine entsprechende Menge Ni-NTA-Agarose in passende Säulchen (*Poly-Prep*, *Econo-Column*, BioRad) gegeben und mit Waschpuffer äquilibriert. Aufzureinigender Kulturüberstände wurde zunächst 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert um die Zellen zu sedimentieren. Der Überstand wurde dann 20 Minuten bei 10000 x g abzentrifugiert und durch 0,2 μm Filter (*Bottle Top Filter*, Corning oder *Rapid Filtermax*, Biochrom AG) filtriert. Anschließend wurde der Kulturüberstand über die Säule gegeben und durch Gravitationskraft durchtropfen gelassen. Nachdem die Säule dann mit 5-10 Bettvolumen Waschpuffer gewaschen wurde, wurde sie

mit 3-5 Bettvolumen Elutionspuffer eluiert. Sollte das Eluat anschließend über eine sulfo-Tyrosin-sLeX oder das L-Selektin Aptamer weiter aufgereinigt werden, wurde dem Elutionspuffer 2 mM CaCl₂ zugefügt. Fraktionen wurden einzeln aufgefangen oder gesammelt und konzentriert.

Waschpuffer	Elutionspuffer
<ul style="list-style-type: none"> ■ 20 mM Tris-HCl pH 8.0 ■ 300 mM NaCl ■ 10 mM Imidazol 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 20 mM Tris-HCl pH 8.0 ■ 300 mM NaCl ■ 250 mM Imidazol

5.5.2 Affinitätschromatographie an Protein A

Diejenigen L-Selektin- Varianten, die mit einem humanen IgG Fc-Teil fusioniert exprimiert wurden, wurden über Protein A Sepharose (GE Healthcare) aufgereinigt. Das Säulenmaterial hat eine Kapazität von ca. 5 mg/ml; eine entsprechende Menge wurde in eine passende Säule gegeben. Durch Zentrifugation und 0,22 µm-Filtration geklärter Zellkulturüberstand wurde über die Säule gegeben und durch Gravitationskraft hindurchtropfen gelassen. Anschließend wurde die Säule mit 5-10 Säulenvolumen mit TBS oder PBS gewaschen. Für die Elution wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße vorbereitet, in die je 60 µl Neutralisierungspuffer vorgelegt wurde. Dabei wurde das erste und letzte Gefäß leer gelassen. Eluiert wurde mit 3-5 Volumen Elutionspuffer, wobei jeweils 1 ml Fraktionen in den vorbereiteten Reaktionsgefäßen gesammelt wurden.

Waschpuffer	Elutionspuffer:	
<ul style="list-style-type: none"> ■ 20 (-50) mM Tris-HCl pH 7 (-8) ■ 150 mM NaCl 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 100 mM Glycin pH 2,5 	
<hr/> <th>Neutralisierungspuffer</th>		Neutralisierungspuffer
<ul style="list-style-type: none"> ■ 1M Tris pH 9.5 		

5.5.3 Ionenaustauschchromatographie

Für die Trennung von Deglykosyliertem LEHis mit PNGaseF wurde eine Ionenaustauschchromatographie über DEAE Sepharose durchgeführt. Dafür wurde die Probe mit Bindepuffer so verdünnt, dass maximal 40 mM NaCl enthalten waren. Die Probe wurde 1-2mal über die Säule tropfen gelassen und anschließend mit mindestens 5 Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1-1,5 M NaCl in Bindepuffer oder mithilfe eines Gradienten.

Bindepuffer	Elutionspuffer:
<ul style="list-style-type: none"> ■ 20-50 mM Tris-HCl pH 7-8 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 1-1,5 M NaCl in Bindepuffer oder Gradient

5.5.4 Affinitätschromatographie an sTyr/sLeX-PAA

Der Selektinligand sialyl Lewis X (sLeX) wurde in Nachbarschaft zu sulfatiertem Tyrosin auf ein Polyacrylamid-Polymer gekoppelt (Lectinity). Dieses so bezeichnete sTyr/sLeX-PAA wurde an CNBr-Sepharose (GE Healthcare) gekoppelt und ergibt so die sTyr/sLeX-Ligandenaffinitätsmatrix. Die Bindung an den Liganden ist Calcium-abhängig. Es ist möglich, L-Selektin direkt aus Kulturüberstand ohne weitere Zugabe von Calcium aufzureinigen, da der Calciumgehalt des Kulturmediums ausreicht. Andere Proben wurden mit 1-2 mM CaCl_2 versetzt. Nach dem Waschen mit 5-10 Säulenvolumen Waschpuffer wurden die gebundenen L-Selektin-Varianten mit 3-5 Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert.

Waschpuffer	Elutionspuffer
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 20 mM Tris-HCl pH 8.0 ▪ 150 mM NaCl ▪ 2 mM CaCl_2 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 20-50 oder 100 mM Tris-HCl pH 8.0 ▪ 150 mM NaCl ▪ 20 mM EDTA

5.5.5 Aptamer-Affinitätschromatographie (AAC)

Das L-Selektin Aptamer 5'-GCG GTA ACC AGT ACA AGG TGC TAA ACG TAA TGG CGC-3' (5.2.11) wurde am 5'-Ende biotinyliert synthetisiert (Metabion) und an Streptavidin-Agarose (Pierce/Invitrogen) gekoppelt. Zum Koppeln wurde Streptavidin-Agarose mit Waschpuffer äquilibriert, und die Aptamer-Lösung in Waschpuffer dazugegeben und 2h bei 4°C auf dem Kopfüber-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kopplungseffizienz durch Messung der A_{260} in der Durchlauffraktion bestimmt. Als Faktor für Einzelstrang-DNA wurde $0,033 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 1$ Absorptionseinheit angenommen. Die Aufreinigung von L-Selektin erfolgte dann in TBSCa-Puffer. Die Elution erfolgte mit 20 mM EDTA in TBS pH 7. Die Bindung ist in Gegenwart von Imidazol möglich und daher können Ni-NTA-Eluat direkt, mit 2 mM CaCl_2 versetzt, über die AAC weiter gereinigt werden. Um die Reinigungsleistung der Säule aufrechtzuerhalten, musste sie zwischen einzelnen Aufreinigungen gründlich gewaschen werden. Das geschah durch Waschen mit 6 M Guanidiniumchlorid, 0,2 % Essigsäure und anschließend mit 70 % Ethanol. Danach wurde die Säule mit H_2O und TBSCa reäquilibriert.

Waschpuffer/Kopplungspuffer für Biotin-Aptamere an Streptavidin	Waschpuffer TBSCa (Chromatographie)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 25 mM NaPO_4 ▪ 500 mM NaCl ▪ pH 7,5 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 20 mM Tris-HCl pH 7.0 ▪ 150 mM NaCl ▪ 2 mM CaCl_2

- Elutionspuffer

- 20 mM Tris- HCl pH 7.0
- 150 mM NaCl
- 20 mM EDTA

5.5.6 Heparin-Affinitätschromatographie

Für die Heparin-Affinitätschromatographie wurde ein 1 ml-*HiTrap-Heparin*-Säulchen (GE Healthcare) verwendet, das an eine *ÄKTA Explorer* Anlage (GE Healthcare) angeschlossen wurde. Da L-Selektin nur bei geringen Salzkonzentrationen an die Säule bindet, musste die Probe vorher entsalzt oder verdünnt werden. L-Selektin wurde in Bindepuffer (A) umgepuffert und an die Säule gebunden. Die Elution erfolgte mit einem dreistufigen NaCl- Gradienten (Elutionspuffer B). In der ersten Stufe des Gradienten wurde die Konzentration des Puffer B von 0 % auf 10 % innerhalb von 5 Säulenvolumen (CV) angehoben. In einer zweiten Stufe wurde die Konzentration des Puffer B von 10-12%B in 6 CV erhöht. Die letzte Stufe des Gradienten wurde von 12-35 % B innerhalb von 10 CV angelegt. Es wurden 1ml-Fraktionen gesammelt.

Bindepuffer (A)	Elutionspuffer (B)
▪ 0,01 M Zitronensäure	▪ 0,01 M Zitronensäure
▪ 0,1 M Tris	▪ 0,1 M Tris
▪ pH 7,4	▪ pH 7,4
▪	▪ 2 M NaCl

5.5.7 Gelfiltration

Es wurden zwei verschiedene Gelfiltrationssäulen an verschiedenen Chromatographieanlagen benutzt. Für den Trennungsversuch der LEHis-wt Glykoformen wurde eine Sephadex 75 (10/30) (Amersham) Säule, angeschlossen an eine *ÄKTA Explorer* Anlage (GE Healthcare), genutzt. Die Probe wurde nach Äquilibration der Säule mit 1,5 Säulenvolumen TBSCa injiziert, bei 0,15 ml/min aufgetrennt und 1,5 ml Fraktionen gesammelt.

Unmittelbar vor den Kristallisationsansätzen wurden ebenfalls stets Gelfiltrationen durchgeführt. Dazu wurde aufgereinigtes L-Selektin in einer Konzentration von 0,8-1,5 mg/ml in TBSCa-Puffer über eine Gelfiltrationssäule (*Superdex200, High Load 16/60 Prep Grade*, 114 ml Bettvolumen, GE Healthcare), gegeben. Die Säule war an eine Chromatographieanlage (*ÄKTA purifier*, im Institut für Kristallographie, FU Berlin) angeschlossen und wurde nach Äquilibration mit 1,5 Säulenvolumen bei 1 ml/min mit TBSCa Puffer betrieben. Es wurden 2 ml-Fraktionen in Mehrweg-Glasröhrchen aufgefangen.

5.6 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden

5.6.1 Konzentrierung und Umpuffern aufgereinigter Proteine

Aufgereinigtes Protein wurde in Ultrafiltrationseinheiten (*Amicon Ultra-4, /-15*, MWCO 3/10/30/100 kDa, Millipore) durch Zentrifugation konzentriert und umgepuffert. Zur Dialyse wurden *Slide-A-Lyzer* (Pierce) mit passender Porengröße verwendet.

5.6.2 Glykosidase-Verdau

PNGase F (Biolabs) schneidet zwischen dem Asparaginrest und dem ersten GlcNAc-Rest von "High Mannose", "Hybrid" und "komplexen" *N*-Glykanen. Für den Verdau von nativem L-Selektin wurden 1-5 µl PNGase F (500000 U/ml) (Biolabs) für den Verdau von ca. 20 µg Glykoprotein eingesetzt und in TBSCa-Puffer 1 Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. PNGase F bindet nicht an Q- und DEAE-Sepharose und konnte dadurch von der Proteinlösung wieder abgetrennt werden.

Für die Glykananalytik wurden LEHis-Glykosylierungsmutanten und AGP in Gegenwart von 1 % (w/v) SDS und 10 % β-Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Lösung wurde anschließend 1/10 verdünnt, mit 1 % Nonidet P-40 und mit x U PNGase F (EC 3.5.1.52, Roche Applied Science) für 16 Stunden bei 37°C verdaut. Die Detergenzien wurden mithilfe von *Calbiosorb beads* (Calbiochem) aus der Lösung abgetrennt. Die abgespaltenen *N*-Glykane wurden durch Graphitsäulchen (Alltech) isoliert und entsalzt. Um die Struktur der *N*-Glykane zu bestimmen, wurden Exoglykosidase-Verdaus durchgeführt. Dazu wurden die wie oben beschrieben abgetrennten *N*-Glykane in 100 mM Natriumacetat pH 5,0 gelöst und für 18 h bei 37°C mit den folgenden Konzentrationen Glykosidasen inkubiert: 100 mU/ml *Arthobacter ureafaciens* Neuraminidase (EC 3.2.1.18, Roche Applied Science), 1,5 U/ml *bovine testes* β-Galactosidase (GKX-5013, Prozyme), 15 U/ml *Jack bean* β-*N*-Acetylhexosaminidase (GKX-5003, Prozyme), 50 U/ml *Almond meal* α1-3/4-Fucosidase (GKX-5019, Prozyme), 4 U/ml Glyko® β-*N*-Acetylhexosaminidase/HEXasel (rekombinant aus *Streptococcus pneumoniae*, #PZGK80050). Nach Inkubation mit den Exoglykosidasen wurden die Enzyme bei 95°C für 5 Minuten inaktiviert, mithilfe von Toptips (SunChrom) entsalzt und anschließend lyophilisiert.

5.6.3 Bradford-Proteinbestimmung

Die Konzentration aufgereinigter Proteine wurden mittels Bradford-Proteinbestimmung bestimmt (Bradford, 1976). Für jeden Ansatz wurde eine Verdünnungsreihe aus BSA bekannter Konzentration hergestellt (*Albumin-Standard*, Pierce). Proben wurden so verdünnt, dass sie im Bereich der Standardwerte lagen. 5 µl Probe wurde in Mikrotiterplatten mit 250 µl Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Mikroplatten-Photometer wurden die Werte bei 525 nm ausgelesen und von der zugehörigen Software (Spectra MAX) eine

Standardkurve generiert, anhand derer die Konzentration der unbekanntenen Proben berechnet wurden.

5.6.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine gemäß ihrer Größe aufzutrennen wurde diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden je nach gewünschtem Trennbereich Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad gegossen. Die Gele wurden zwischen je zwei vertikale Glasplatten gegossen und bestanden aus Trenngel und Sammelgel. 20 µl Probe wurde mit 6,6 µl reduzierendem oder nicht-reduzierendem 4 x Probenpuffer versetzt und 10 Minuten auf 96-100°C erhitzt. Dadurch denaturieren die Proteine und eventuell vorhandene Disulfidbrücken werden bei Zugabe von Reduktionsmittel reduziert. Die Ladungen der Aminosäureseitenketten werden durch SDS maskiert, so dass das denaturierte Protein nach außen hin negativ geladen ist. Verschiedene Proben wandern so gemäß ihrer Größe im elektrischen Feld im Gel mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Ein Molekulargewichtsstandard, der immer mit auf das Gel aufgetragen wird, dient durch Vergleich zum Ablesen der relativen Molekülmasse der Probe. Wird SDS in Gel und Probenpuffer weggelassen, so bleiben die Proteine nativ und wandern im Gel entsprechend ihrer Nettoladung und Tertiärstruktur. Nachdem die Proben in die vorgesehenen Taschen eingefüllt wurden, wurde das Gel in die Laufkammer gebracht, mit Laufpuffer bedeckt und eine Spannung von 100 V angelegt.

4 x SDS Probenpuffer

- 0,1 M Tris HCl pH 6,8
- 8 % (w/v) SDS
- 40 % (w/v) Glycerin
- 0,04 mg/ml Bromphenolblau
- Ggf. 20 % (w/v) β-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel

Molekulargewichtsstandards

- *Protein Ladder* (Fermentas)
- *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas)

SDS-Laufpuffer

- 125 mM Glycin
- 24,8 mM Tris
- 3,5 mM SDS

Geräte

- *Mini Protean II* Gel System (Bio-Rad)
- *Standard Power Pack P25* (Biometra)

Tabelle 7: Pipettierschema der Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel

2 Trenngele	7,5 %	10 %	13 %
1,5 M Tris HCl pH 8,8	2 ml	2 ml	2 ml
Rotiphorese 30 (Roth)	2 ml	2,68 ml	3,5 ml
ddH ₂ O	4 ml	3,32 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml
10% APS	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED (Merck)	6 µl	6 µl	6 µl

2 Sammelgele	
0,5 M Tris HCl pH 6,8	1 ml
Rotiphorese 30 (Roth)	0,67 ml
ddH ₂ O	2,33 ml
10% SDS	0,04 ml
10% APS	20 µl
TEMED (Merck)	2 µl

5.6.5 Coomassie Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach dem Lauf wurden PAA-Gele nach Bedarf mit Coomassie gefärbt. Dazu wurden die Gele aus den Glasplatten genommen und 10 Minuten mit H₂O inkubiert. Anschließend wurden die Gele für 20 Minuten in die Coomassie- Färbelösung geschwenkt. Die Färbelösung wurde abgegossen und durch Entfärbelösung ersetzt. Diese wurde alle 10-20 Minuten ersetzt, bis die Proteinbanden vom Hintergrund farblich unterscheidbar waren.

Coomassie-Dye I

- 0,2 g Serva blue R250 (Serva)
- 50 ml (50 %) Methanol
- 10 ml Eisessig
- 40 ml H₂O
- Ad 100 ml

Coomassie Entfärber

- 5 % (v/v)Methanol
- 12,5 % (v/v) Eisessig
- Ad 1 L H₂O

5.6.6 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Für die Reinheitskontrolle von Proteinpräparationen ist die Silberfärbung besser geeignet als die Coomassie-Färbung, da die Silberfärbung weitaus sensitiver ist. Das fertig gelaufene PAA- Gel wird aus den Glasplatten genommen und kurz mit H₂O gespült. Anschließend wird das Gel in einer Glasschale mit 50 ml Fixierer I geschwenkt. Nach dieser ersten Fixierung wird das Gel mit 50 ml Fixierer II inkubiert und anschließend 3 mal 10 Minuten mit H₂O gewaschen. Dann wird das Gel in der Färbelösung für 45 Minuten geschwenkt und anschließend 3 Mal kurz mit H₂O gewaschen.

Daraufhin wird das Gel mit Entwickler-Lösung behandelt, wobei die Silberionen reduziert werden und als dunkler gelb-braun bis schwarzer Niederschlag an den Proteinbanden sichtbar werden. Bevor die Hintergrundfärbung zu stark wird, wird die Reaktion mit Stopplösung gestoppt. Anschließend kann das mit H₂O gewaschene Gel analysiert und dokumentiert werden. Zur Konservierung wurden die Gele in Haushalts-Einmachhaut (Zellglas Einmachfix, Folia) eingeschlagen und im Geltrocknungsapparat (Gel dryer model 538, Bio-Rad) getrocknet.

Fixierer I	Fixierer II
<ul style="list-style-type: none"> ■ 50 % Ethanol ■ 10 % Essigsäure 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 30 % Ethanol ■ 0,5 M Natriumacetat ■ 0,2 % Natriumdithiosulfat ■ 0,5 % Glutardialdehyd
Färbelösung	Entwickler
<ul style="list-style-type: none"> ■ 0,1 % Silbernitrat ■ 0,01 % Formaldehyd (35%) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 2,5 % Natriumcarbonat pH 10,9 mit NaHCO₃ eingestellt ■ 0,01 % Formaldehyd (35 %) ■
Stopplösung	
<ul style="list-style-type: none"> ■ 50 mM EDTA 	

5.6.7 Western Blot

Mithilfe eines Western Blot werden zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen, wo sie anschließend zur Immunodetektion verwendet werden können. Es wurden Nitrocellulose-Membranen (*Hybond C extra*, GE Healthcare) oder PVDF-Membranen (*Hybond P*, GE Healthcare) verwendet. PVDF-Membranen müssen vor der Benutzung aktiviert werden, indem die Membranen für 5 Sekunden in 100 % Methanol getaucht werden. Aus den Glasplatten genommene, fertig gelaufene SDS-PAGE-Gele wurden kurz mit H₂O gespült und in Blotpuffer gelegt. Jeweils 6 Lagen *Whatman*- Chromatographiepapier (3MM, Schleicher & Schuell) wurden mit Blotpuffer getränkt. Auf die untere Elektrode eines Semi-Dry-Blotter (*Trans-Blot SD*, Bio-Rad) wurden dann in der Reihenfolge 3 Lagen *Whatman*-Papier, die Membran, das SDS-Gel und weitere 3 Lagen *Whatman*-Papier gelegt. Alle Komponenten waren in Blotpuffer getränkt. Nachdem der Deckel mit der oberen Elektrode geschlossen wurde, wurde für 20 Minuten ein Strom von 200 mA pro 6x9 cm-Gel angelegt. Die Spannung wurde an der Quelle (Consort) auf 25 V begrenzt.

Blotpuffer

- 187 mM Glycin
- 25 mM Tris
- pH 8,5

5.6.8 Immunodetektion

Proteine, die mittels Western Blot oder durch andere Methoden auf eine Membran gebracht wurden, wurden mittels spezifischer und markierter Antikörper detektiert. Dazu wurde die Membran nach dem Blotten mit H₂O gewaschen und zunächst mit Ponceau S-Lösung 1-3 Minuten inkubiert. Der Lösung wurde abgegossen und die Membran wird mit Leitungswasser gewaschen. Dadurch werden die Proteinbanden vorübergehend sichtbar und die Proteinmarkerbanden können markiert werden. Dann wurde die Membran für 30 Minuten (RT oder 4°C über Nacht) in Blocklösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 45 Minuten. Mit 3x 50 ml TBSB wurde die Membran jeweils 10 Minuten gewaschen, bevor die Inkubation für 30-45 Minuten mit dem Sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper erfolgte. Anschließend wurde nochmals 3x10 Minuten mit TBSB gewaschen. Die Membran wurde dann aus der Flüssigkeit genommen, mit einem Papiertuch abgetupft und mit 2 ml Detektionsreagenz bedeckt. Nach 1 Minute Inkubation wurde das Reagenz mit einem Papiertuch abgenommen. Die Membran wurde nun in eine Filmkassette gelegt, zwischen zwei durchsichtige Folien. Darauf wurde in der Dunkelkammer ein Film gelegt und je nach Signalstärke 30 Sekunden bis 30 Minuten exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

Blocklösung	Detektionsreagenz
<ul style="list-style-type: none"> TBSB mit 4 % Magermilchpulver (Sucofin) 	<ul style="list-style-type: none"> Lösung A: 200 ml 0,1M Tris HCl pH 8,6, 50 mg Luminol (Sigma) Lösung B: 11 mg Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
Filme	<ul style="list-style-type: none"> Detektion pro Membran: 2 ml Lösung A mit 200 µl Lösung B und 0,6 µl H₂O₂ (30 %) frisch zusammengeben
<ul style="list-style-type: none"> <i>Amersham Hyperfilm ECL</i> (GE Healthcare) 	oder <i>ECL</i> (GE Healthcare)
Antikörper	
<ul style="list-style-type: none"> Polyklonaler anti-sL-Selektin Antikörper aus Kaninchenserum (anti-„SLP4“) Dreg-55/200 monoklonaler Antikörper aus Maus (E.C. Butcher, Stanford) Penta-His (Qiagen): Monoklonaler Antikörper aus Maus Maus-anti-Kaninchen-PO (Dianova) Ziege-anti-Maus-IgG-PO (Dianova) 	
Entwicklermaschine	
<ul style="list-style-type: none"> <i>Optimax Typ TR</i> (MS Laborgeräte) 	

5.6.9 ELISA

Mithilfe eines spezifischen ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) für lösliches L-Selektin wurde die Konzentration von L-Selektin in gemischten Proben (wie Kulturüberständen) oder

gereinigten Proben bestimmt. 96-well-Platten wurden mit dem monoklonalen Antikörper Dreg-200 beschichtet. Dazu wurden pro well 200 ng Dreg 200 in 100 µl Beschichtungspuffer mindestens 2 Stunden in der 96-well-Platte inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus der Platte über dem Waschbecken herausgeschlagen und auf Papiertüchern ausgeklopft. Dann folgte ein Waschschrift mit 3 x 200 µl/well TBST. Anschließend wurden die zu messenden Proben und eine Standardreihe in passenden Verdünnungen in TBST zu 100 µl/well in die wells pipettiert und eine Stunde auf dem ELISA-Platten-Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte wieder ausgeschlagen und 3 Mal mit je 200 µl TBST gewaschen. Nachdem der an die Plastikoberfläche der Platte gekoppelte Dreg200-Antikörper also nun an das L-Selektin in der Probe gebunden hat, wurde mit einem zweiten, Biotin-markierten L-Selektin-spezifischen Antikörper (Dreg-55-Biotin) 1 Stunde inkubiert. Auf diese Inkubation folgt wieder ein Waschschrift wie oben und darauf die Inkubation für 30 Minuten mit Peroxidase-gekoppeltem Avidin (ExtrAvidin-PO), welches an den Biotin-Anteil des Dreg-55 Antikörpers bindet. Dann erfolgte die Substratreaktion, bei der die Peroxidase TMB zu einem Farbstoff umsetzt, der im Mikroplatten-Photometer ausgelesen werden kann. Dazu wurde die Platte erneut mit 3x 200 µl TBST gewaschen und 100 µl pro well frisch hergestellte Substratlösung in definierten Zeitabständen hinzu gegeben. Die Farbreaktion wird unter Schütteln nach Sicht entwickelt und mit 100 µl/well 4 N H₂SO₄ gestoppt. Die Stopplösung wurde in den gleichen definierten Zeitabständen wie die Substratlösung hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Platte im Mikroplatten-Photometer bei 450-490 nm ausgelesen. Die Software erstellt aus den Werten der Standardreihe eine Standardkurve, anhand derer die unbekanntes Proben bestimmt werden.

Beschichtungspuffer	Färbelösung
<ul style="list-style-type: none"> ■ 50 mM Carbonatpuffer pH 9,65 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 100 µl TMB-Lösung ■ 3 µl H₂O₂ (30 %) ■ In 10 ml Substratpuffer
Substratpuffer	TMB-Lösung
<ul style="list-style-type: none"> ■ 40 mM Zitronensäure ■ pH 3,95 mit KOH eingestellt 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) ■ 2 % (w/v) in Ethanol/DMSO (1:1)

5.6.10 Oberflächenplasmonresonanz

Die Bindung von L-Selektin Varianten an den synthetischen Bi-Liganden sulfo-Tyrosin sLeX-PAA (Lectinity) wurde an einem BIAcore X Gerät (BIAcore, GE Healthcare) untersucht. Die Konzentration aufgereinigten Proteins wurde mittels sL-Selektin-ELISA bestimmt. Zur Berechnung der molaren Konzentration wurde die aufgrund der Aminosäuresequenz berechnete Molekulare Masse ohne Glykananteil zugrunde gelegt. Auf einen *BIAcore-SA Chip* wurde in der ersten Spur (fc1) biotinyliertes sulfo-Tyrosin-sLeX-PAA (Lectinity) und in der Referenzspur (fc2) biotinyliertes *N*-Acetyllactosamin-PAA (Lectinity) gekoppelt. Als Laufpuffer diente TBS pH 7 mit 1-2 mM CaCl₂. 40-

60 μl L-Selektin in einer Konzentration von 250 nM, 500 nM oder 1 mM wurde bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ in das Gerät eingegeben. Weil das System-Totvolumen 20 μl entspricht, wurden effektiv 20 μl Probe über den Chip geleitet. Nach Ende der Injektionsphase wurden 60 Sekunden Dissoziationszeit gegeben, in der die Chipoberfläche mit Laufpuffer gespült wird. Anschließend wurde der Chip mit 100 μl 4 M MgCl_2 bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ regeneriert. Die Sensorgramme wurden mithilfe der *BIAevaluation* Software (BIAcore, GE Healthcare) zusammengestellt. Die X- und Y-Koordinaten der Kurven wurden als ASCII-Datei exportiert und in Excel 2003 (Microsoft) importiert. Hier wurden von den Y-Werten der Kurven der Wiederholungsmessungen jeweils die Mittelwerte berechnet und für die graphische Darstellung der Mittelwert-Sensorgramme benutzt.

5.7 Glykananalytik

Die Arbeiten zur Glykananalytik wurden in Kooperation mit Dr. rer. nat. Véronique Blanchard und Dr. rer. nat. Matthias Kaup in der AG Glykodesign und Glykoanalytik am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Campus Mitte durchgeführt.

5.7.1 Monosaccharid-Analyse

N-Glykane wurden für die mittels Trifluoressigsäure (TFA) zu Monosacchariden hydrolysiert. Dazu wurden 30 μg Glykoprotein in ein 2 ml Glasgefäß (Wheaton science products) mit einem teflonbeschichteten Deckel überführt. Die Probe wurde anschließend getrocknet, mit 400 μl frisch angesetzter TFA aufgenommen und vier Stunden bei 100°C inkubiert. Nach 15 Minuten Abkühlphase auf Eis wurde das TFA abgedampft, die Probe mit 500 μl Milli-Q- Wasser gewaschen und erneut getrocknet. Für jeden Lauf auf der Chromatographie Anlage (HPAEC-PAD ICS-3000, Dionex) wurden 200 pmol Desoxyribose und 200 pmol Fructose als Standard zur Probe hinzugefügt.

5.7.2 Massenspektrometrische Analyse von N-Glykanen

Aufgereinigte LEHis Glykomutanten 100, 010, 001, 111, sowie α -1-saures Glykoprotein wurden bei 95°C für 5 Minuten in Gegenwart von 1 % SDS und 10 % 2-Mercaptoethanol denaturiert. Anschließend wurden die Proben 10fach verdünnt und mit NP-40 zu einer Endkonzentration von 1 % versetzt. Anschließend wurde PNGase F (2,5 U/mg) hinzugegeben und 18 h bei 27°C inkubiert. Die abgespaltenen N-Glykane wurden durch Festphasenextraktion aufgereinigt. Dazu wurden Reversphasen-C18 und graphitisierte Kohlenstoff-Säulchen benutzt (Alltech, Deerfield, IL). Ein Teil der Proben wurde nach etablierten Standardprotokollen permethyliert (Dell *et al.*, 1993) oder mit verschiedenen Exoglykosidasen verdaut (s. 5.6.2), erneut aufgereinigt und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Die Spektren wurden an einem Ultraflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonics) aufgenommen, der mit einem *Smartbeam* Laser ausgestattet war. Spektren wurden sowohl im Positiv- als auch im Negativ-Ionen-Modus aufgenommen, wobei die Spektren von 1000 Laserschüssen akkumuliert wurden. Im Positiv-Ionen-Modus wurde als Matrix DHB benutzt,

und mithilfe einer Glucoseleiter kalibriert. Im Negativ-Ionen-Modus wurde ATT als Matrix benutzt und mithilfe einer Peptidmischung (Bruker Daltonics) kalibriert.

5.8 Kristallographische Methoden

5.8.1 Kristallisationsscreenings

Die Kristallisationsscreenings mit der L-Selektin- Variante „LE 010“ (5.2.12) wurden im 96-well Format nach der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt. Dabei wird die Proteinlösung auf einen kleinen Absatz gesetzt (sitzender Tropfen, „*sitting drop*“), der sich in der Kammer neben dem Reservoir befindet, und in einem Verhältnis von 1:1 mit Fällungsmittel versetzt. Durch eine Folie werden die Kammern luftdicht versiegelt. Da nun die Konzentration des Fällungsmittels im Reservoir doppelt so hoch ist wie in dem 1:1 gemischten Tropfen, äquilibrieren die beiden Lösungen durch Verdampfen und Diffusion in der Gasphase. Dadurch erhöht sich langsam die Proteinkonzentration im Tropfen und es können Kristallisationskeime und schließlich Kristalle entstehen. Mithilfe eines Pipettier-Roboters in Kooperation mit der Bayer-Schering AG, Berlin, wurden jeweils 150 nl L-Selektin „LE 010“ (10-15 mg/ml in 20 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) und 150 nl Reservoirolösung pipettiert. Das Reservoirovolumen betrug 100 µl. Die Reservoirolösungen waren aus kommerziellen Kristallisationsscreens entnommen worden. Nachfolgende Fein-Screens wurden im 24-well-Format nach der „*hanging drop*“- Dampfdiffusionsmethode durchgeführt. Dabei wurden auf silikonisierte Deckgläschen 1 µl-Tropfen der Proteinlösung gegeben, mit 1 µl Reservoirolösung vermischt und umgekehrt als „Deckel“ auf die wells gesetzt, so dass der Tropfen an dem Deckgläschen über der Reservoirolösung (700 µl) hängt. Die wells wurden durch Bestreichen der Ränder mit *Baysilone* Paste (Bayer) gegen die Deckgläschen abgedichtet. Die Reservoirolösungen wurden bei den *Fine-Screens* per Hand pipettiert, wobei die Zusammensetzung ausgehend von den in den 96-well Screens gefundenen Kristallisationsbedingungen (15 % PEG 4000, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6, 0,2 M Ammoniumsulfat) variiert wurde. Variiert wurde die PEG 4000-Konzentration (8 %, 10 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %), die PEG-Größe (400, 2000, 3350), der Puffer (Bis-Tris pH 7, HEPES pH 8, Natriumcitrat pH 5,6), Art und Konzentration des Fällungsmittels (0,1 M, 0,2 M, 0,4 M Ammoniumsulfat oder Ammoniumacetat), Zugabe von CaCl₂ oder MgSO₄, Zugabe von Alkoholen (4 % 1-Propanol, 1,5-Pentandiol, 1,3-Propandiol, 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD), Isobutanol, Ethanol, 1,4-Butandiol, 1,4-Butandiol) und schließlich die Zugabe von Liganden (sialyl Lewis X (Calbiochem), Aptamer (s. 5.2.11), Bimosiamose (Revotar AG, Berlin)).

Die reduktive Methylierung wurde nach den Angaben von (Rauert *et al.*, 2007) durchgeführt. Außerdem wurde nach der Methode, beschrieben in (Dong *et al.*, 2007); (*online supplementary methods*), eine *in situ* Proteolyse mit α -chymotrypsin (Sigma #C3142) versucht.

Der Additive Screen (Hampton Research) wurde ebenfalls nach der „*hanging drop*“- Dampfdiffusionsmethode durchgeführt. Bei diesem Screen wurden jedoch 2,5 µl Proteinlösung auf dem Deckgläschen mit 0,5 µl Additiv und 2 µl Fällungsmittel versetzt. Die frisch angesetzten Kristallisationsansätze wurden gleich mikroskopisch kontrolliert, danach wurden die

Kristallisationsansätze täglich und später in größeren Abständen kontrolliert. Die Ansätze wurden alle bei 18°C gehalten.

Kristallisations-Screening-Kits

- JBScreen PEG (Jena Bioscience)
- Crystal Screen Lite (Hampton Research)
- Additive Screen HR 2-428 (Hampton Research)
- Natrix Screen (Hampton Research)
- Classic Lite Suite (Qiagen)
- PACT (Qiagen)

5.8.2 Kryoprotektion

Für die Messung der erhaltenen Kristalle im Flüssigstickstoffstrahl wurden folgende Puffer hergestellt, die die Bildung von störenden Eiskristallen verhindern sollen:

- | | | |
|-----------------------|-----------------------|------------------|
| 1) 10 % Glycerin | 4) 15 % Ethylenglykol | 7) 30 % PEG 4000 |
| 2) 15 % Glycerin | 5) 20 % Glucose | 8) 35 % PEG 4000 |
| 3) 10 % Ethylenglykol | 6) 20 % PEG 100 | |

Alle Substanzen 1)-8) waren gelöst in jeweils 15 % PEG 4000, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6, 0,2 M Ammoniumsulfat.

Nach Testung der Cryopuffer stellte sich die 15 %ige Glycerinlösung (2) als geeignet heraus.

5.8.3 Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten

Die erhaltenen Kristalle wurden an der hauseigenen Drehanode (Institut für Kristallographie, FU Berlin) mit Imageplate-Detektor (mar345, MAR research, Norderstedt) und an den FU Strahlrohren BL1 und BL2 am Synchrotron BESSY II in Berlin oder an der *microfocus beamline* ID23-2 des Synchrotrons ESRF in Grenoble gemessen. Die Kristalle wurden zur Verhinderung der Eiskristallbildung in 15 %ige Glycerinlösung (5.8.2) überführt. Anschließend wurden die Kristalle mit Nylon-Schlaufen gefischt und entweder direkt in den 100 K kalten Stickstoffstrom gebracht oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Indizierung der Reflexe wurden die Programme DENZO bzw. HKL2000 (Otwinowski, 1997), MOSFLM (CCP4, 1994) und XDS (Kabsch, 1993) verwendet. Anschließend wurden die Daten mit dem Programm SCALEPACK (Otwinowski, 1997) oder SCALA (CCP4, 1994) aufeinander skaliert und symmetrieäquivalente Reflexe gemittelt. Aus den Intensitäten wurden mit dem Programm TRUNCATE des CCP4-Programmpakets Strukturfaktor-Amplituden und ihre Standardabweichungen berechnet. Molekularer Ersatz wurde mithilfe des Programms PHASER (Storoni *et al.*, 2004) und der Koordinaten des nativen L-Selektins (PDB Code 3CFW) versucht. Mit

dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) wurde eine Verfeinerung der Struktur nach der Methode der maximalen Wahrscheinlichkeit versucht. Die Elektronendichteverteilung wurde mit dem Programm Coot (Emsley and Cowtan, 2004) dargestellt. Diese Messungen und Berechnungen wurden von Dr. rer. nat. Ardeschir Vahedi-Faridi (AG Prof. Saenger, FU Berlin) durchgeführt.

5.8.4 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren von LE 010 wurden an einem JASCO-J600 CD-Spektrometer in einem Wellenlängenbereich von 200-240 nm aufgenommen. Die Probe war in 20 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl und 2 mM CaCl₂ gelöst. Die Schichtdicke der Küvette war 0,1 cm. Der Küvettenhalter war mit einem Thermostaten verbunden. Als Referenz wurde zunächst das Spektrum des Puffers allein aufgenommen. Dieses wurde von allen anderen Messungen subtrahiert. Die erhaltenen Rohdaten wurden bezogen auf die mittlere molare Masse der Aminosäuren von LE 010 und die Schichtdicke der Küvette in MRE (*mean residue ellipticities*) ($[\Theta]_{\lambda}^T$ in deg cm² dmol⁻¹) umgerechnet.

Für die Auswertung der Spektren mithilfe des Programms „K2D2“ (Perez-Iratxeta and Andrade-Navarro, 2008) wurden die MRE über die Beziehung $[\Theta_{MRW}] = 3300\Delta\varepsilon$ in $\Delta\varepsilon$ umgerechnet. $\Delta\varepsilon$ bezeichnet die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten der gemessenen Substanz für linkscircular und rechtscircular polarisiertes Licht.

5.9 Internetanwendungen und Datenbanken

- ExpASy (<http://www.expasy.org>)
- SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen *et al.*, 2004)
- ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)
- Graphic Codon Usage Analyser (<http://www.gcu.schoedl.de>) (Fuhrmann *et al.*, 2004)
- K2D2 (<http://www.ogic.ca/projects/k2d2/>) (Perez-Iratxeta and Andrade-Navarro, 2008)
- GlycoPeakfinder (<http://www.glyco-Peakfinder.org/>)
- Protein Data Bank (RCSB PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>)
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed>)
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997)

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der Immunüberwachung oder bei Entzündungen müssen Leukozyten aus dem Blutstrom in umliegendes Gewebe gelangen, um dort Pathogene aufzuspüren und zu eliminieren. Dazu werden die Leukozyten in einer so genannten *Adhäsionskaskade* aus dem Blutstrom abgefangen und beginnen, auf den Endothelzellen zu rollen, bis sie schließlich nach Aktivierung fest adhären und auswandern. Dabei kann es zu sekundärer Gewebeschädigung kommen, wenn die Infiltration der Leukozyten ungebremst abläuft, wie es bei entzündlichen Krankheiten der Fall ist. Um die Entzündungsreaktion therapeutisch einzudämmen, werden gegenwärtig Medikamente eingesetzt, die häufig starke Nebenwirkungen zeigen. Für eine alternative Therapiestrategie, die gezielt das Auswandern der Leukozyten adressiert, bietet sich der erste Schritt der Adhäsionskaskade als Ansatzpunkt an. Dieser wird von dem leukozytären Adhäsionsrezeptor L-Selektin im Zusammenspiel mit seinen endothelialen Liganden vermittelt.

L-Selektin ist ein Transmembranrezeptor auf der Oberfläche der Leukozyten. Mit seiner C-Typ-Lektindomäne bindet er an muzinähnliche, sulfatierte, sialylierte und fucosylierte Glykane. Die detaillierte Struktur von L-Selektin im Komplex mit seinen Bindungspartnern ist unbekannt und sollte in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden. Die Kenntnis der Kristallstruktur sollte es ermöglichen, in Zukunft modellgestützt Ligandenanaloga und Inhibitoren zu entwickeln, die zur antiinflammatorischen Therapie eingesetzt werden können. L-Selektin ist ein hochglykosyliertes Glykoprotein. In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die Struktur und die Funktion der N-Glykane von L-Selektin untersucht werden.

Um L-Selektin zu kristallisieren, mußte zunächst ein Expressionssystem gefunden werden, mit dem es möglich war, L-Selektin in einer geeigneten, funktionellen Form in ausreichender Menge herzustellen. Dazu wurden verschiedene Formen eines verkürzten L-Selektins (LE) kloniert und in verschiedenen Expressionssystemen exprimiert. LE umfasste dabei die N-terminale C-Typ Lektindomäne und die angrenzende EGF-Domäne, welche zusammen die Ligandbindung vermitteln. LE, das in der Hefe *Pichia pastoris*, in Sf9-Insektenzellen und in CHO-Zellen exprimiert wurde, stellte sich aus verschiedenen Gründen als nicht für die Kristallisation geeignet heraus. Im HEK293*Freestyle*-Expressionssystem konnten schließlich ausreichende Mengen LE hergestellt werden. Da L-Selektin ein Glykoprotein ist, das als heterogene Mischung aus verschiedenen Glykoformen exprimiert wurde, wurden anschließend verschiedene Strategien zur Reduktion der Glykan-Heterogenität untersucht. Nach systematischer Mutagenese wurde eine funktionelle LE-Variante gefunden, die eine weitaus höhere Homogenität als der Wildtyp aufwies. Es konnte ein Protokoll etabliert werden, mit dem dieses Protein mithilfe eines Aptamers hochrein aus dem Kulturüberstand gewonnen werden konnte. Dieses Protein konnte schließlich erfolgreich kristallisiert werden. Die Auflösung des Diffraktionsmusters konnte von anfänglichen ~ 14 Å auf ~ 7 Å verbessert werden, jedoch konnte die Röntgenstruktur bei dieser Auflösung nicht bestimmt werden.

Um die Bindungsaffinität rekombinanten L-Selektins zu erhöhen, wurden neben der monomeren Form auch eine dimerisierte Form, sowie ein Pentamer und ein Decamer konstruiert. Das etablierte HEK293F-Expressionssystem wurde genutzt, um diese Konstrukte rekombinant zu

exprimieren. Die Expression, Aufreinigung und Funktion der L-Selektin-Multimere konnte erfolgreich demonstriert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Ligandbindung durch Multimerisierung überproportional verstärkt wurde.

Zur Untersuchung der *N*-Glykosylierung von rekombinantem L-Selektin wurden Glykosylierungsmutanten konstruiert, in HEK293F-Zellen exprimiert und aufgereinigt. Alle Proteine zeigten Bindungsaktivität, wobei die Stärke der Bindung mit steigender Anzahl von *N*-Glykanen tendenziell geringer wurde. Das nichtglykosylierte LE zeigte dabei die stärkste Bindung. Weiterhin konnte ein positiver Einfluß der Glykane auf die Sekretion der LE-Varianten festgestellt werden.

Drei der Mutanten trugen jeweils nur ein *N*-Glykan an jeweils unterschiedlicher Position. Mit diesen war es möglich, die Struktur der *N*-Glykane von LE aus HEK293F-Zellen an jeder einzelnen Position zu bestimmen. Bei der Glykananalytik wurden unerwartete Glykanstrukturen gefunden, deren Grundstrukturen hauptsächlich biantennär und zumeist stark fucosyliert waren. An den Antennen der *N*-Glykane waren zum Großteil *N*-Acetyl-Galactosamin-Reste statt der üblicheren Galactose-Reste verknüpft. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese *N*-Glykane mit Sulfaten modifiziert waren. Bei einem Kontrollprotein aus demselben Expressionssystem waren vergleichbare Strukturen nicht nachzuweisen. Dies ließ darauf schließen, dass die Aminosäuresequenz von L-Selektin Informationen enthält, welche eine proteinspezifische *N*-Glykosylierung herbeiführen. Die sulfatierten Glykanstrukturen sind in der Literatur nur für einige wenige Proteine beschrieben, darunter als klassisches Beispiel die Glykoprotein hormone. Zusätzlich wurden bei der LE-Mutante, die nur ein *N*-Glykan in der ersten Position enthielt, bislang nicht beschriebene Glykanstrukturen identifiziert. Es handelte sich dabei um biantennäre Glykane, die jeweils an beiden antennären *N*-Acetyl-Glucosaminresten terminal zwei aufeinander folgende *N*-Acetyl-Galactosaminreste besaßen. Diese Strukturen lagen sowohl sulfatiert als auch nicht sulfatiert vor. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, welche Funktion diese ungewöhnlichen Glykane haben und ob das native, lösliche L-Selektin im Blutserum oder auf Leukozyten ebenfalls mit solchen Strukturen ausgestattet ist.

Die Untersuchungen legen die Grundlage für eine Strukturaufklärung der Bindungsdomäne von humanem L-Selektin mittels Kristallisation und Röntgendiffraktion. Sie zeigen weiterhin, daß die Bindungsaffinität von L-Selektin durch Oligomerisierung erhöht wird. Durch Aufklärung der Struktur der *N*-Glykane von rekombinantem L-Selektin konnte eine ungewöhnliche *N*-Glykosylierung von L-Selektin nachgewiesen werden. Die *N*-Glykane haben, wie die Bindungsstudien und die Untersuchungen der Sekretion zeigen, einen Einfluß auf Biosynthese und Funktion von L-Selektin.

7 Summary

Leucocytes have to leave the blood stream and enter surrounding tissues in order to detect and eliminate pathogens during immune surveillance and in inflammation. This process of extravasation is organized in a so-called *adhesion cascade*, where leucocytes are captured from the blood stream and start rolling on endothelial cells. After activation, leucocytes adhere firmly and subsequently migrate out of the blood vessel. In inflammatory diseases this leucocyte infiltration is often not dampened, and severe secondary tissue damage might occur. The currently applied drugs for a general anti-inflammatory therapy often show adverse effects. An alternative therapeutic approach is to specifically address the leucocyte extravasation process by intervening at the initial contact of the leucocytic adhesion receptor L-selectin with its endothelial ligands.

L-selectin is a transmembrane receptor on the surface of leucocytes. It binds to mucin-like sialylated, sulphated and fucosylated glycans via its C-type lectin domain. Since the detailed structure of L-selectin in complex with its binding partners is unknown, it was the aim of this study to solve the crystal structure. Prospectively, on the basis of these data it will be possible to model ligand-analogs and to design synthetic inhibitors as drugs for anti-inflammatory therapy. L-selectin is a highly glycosylated glycoprotein. So the second part of the present study aimed at investigating the structure and function of the *N*-glycans of L-selectin.

In order to crystallize L-selectin, it was at first necessary to establish an expression system to produce L-selectin in a suitable, biologically active form and in sufficient amounts. For this purpose different truncated soluble variants of L-selectin (LE) were cloned and expressed in several expression systems. LE consisted of the N-terminal C-type lectin domain and the adjacent EGF-like domain, which mediate the ligand binding. Recombinant protein expressed in the yeast *Pichia pastoris*, in *Sf9* insect cells and CHO-cells was not suitable for crystallization trials for various reasons. However, expression in the HEK293*Freestyle* expression system was successful. Because L-selectin is a glycoprotein and was expressed as a mixture of glycoforms, various strategies to reduce glycan-based heterogeneity were investigated. After systematic mutagenesis of the glycosylation sites, a variant of LE was identified, which was much more homogeneous than the wildtype protein. A protocol to highly purify this protein from the cell culture supernatant with the aid of an aptamer was established. The LE variant successfully crystallized and we could improve the diffraction resolution from ~ 14 Å to ~ 7 Å. However, with this resolution it was not possible to solve the crystal structure.

To improve the binding affinity of recombinant L-selectin, a dimeric as well as a pentameric and decameric form was constructed in addition to the monomeric form. The established HEK293F expression system was used to produce these recombinant proteins and their successful expression, purification and functionality were demonstrated. It was shown, that the ligand binding affinity of these L-selectin variants was disproportionally increased by multimerization.

To study the *N*-glycosylation of L-selectin, glycosylation-mutants were constructed, expressed in HEK293F cells and purified. All of these mutant proteins showed binding activity, while by trend the affinity was lower by increasing number of *N*-glycans. The nonglycosylated variant of LE

showed the highest binding affinity. In contrast, protein glycosylation had a positive influence on the secretion rate.

Three of the glycosylation mutants had only one *N*-glycan attached to a different position each. With these mutants it was possible to analyze the site specific glycan structures. In the glycan analysis, unexpected structures were identified. It was shown, that the glycans were mostly biantennary and highly fucosylated. A large part of the antennae was modified with *N*-acetyl-galactosamine residues instead of the more common galactose residues. In addition, the *N*-glycans were modified with sulphate-residues. Interestingly, a control protein from the same expression system did not show these modifications. Thus, one can conclude that the amino acid sequence of L-selectin has intrinsic information for this specific glycosylation pattern. The sulphated glycan structures identified are described only for a few proteins in the literature, with the glycoprotein hormones as the classical example. Furthermore, on the LE variant which had only one glycan at the first position, uncommon structures were found, which to our knowledge had not been described previously. These glycans had a biantennary structure and two consecutive *N*-acetyl-galactosamine residues were attached to each antenna. Parts of these structures were further modified with a sulphate residue. Future studies are necessary to elucidate the function of these glycans and to demonstrate if they are also present on L-selectin originated from physiological sources.

The results of the present study provide a basis for the elucidation of the L-selectin structure by crystallization and X-ray diffraction. Furthermore, it was shown that multimerization enhances the binding affinity of L-selectin. In the analysis of the *N*-glycans of recombinant L-selectin, uncommon *N*-glycans were detected. Binding studies and secretion analysis showed, that the *N*-glycans have an influence on the biosynthesis and function of L-selectin.

8 Literatur

- Adair-Kirk, T. L. and R. M. Senior (2008). "Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(6-7): 1101-10.
- Alon, R., R. C. Fuhlbrigge, E. B. Finger and T. A. Springer (1996). "Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow." *J Cell Biol* **135**(3): 849-65.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Anderson, D. C., E. C. Butcher, M. Gallatin, S. Rosen, K. Kishimoto, L. Lasky, M. Miyasaka, R. Scollay, C. W. Smith and D. Haskard (1991). "Peripheral lymph node homing receptor (LECAM-1)." *Immunol Today* **12**(7): 216.
- Arbones, M. L., D. C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynard-Curry, G. Otten, D. J. Capon and T. F. Tedder (1994). "Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice." *Immunity* **1**(4): 247-60.
- Ashwell, G. and J. Harford (1982). "Carbohydrate-specific receptors of the liver." *Annu Rev Biochem* **51**: 531-54.
- Ashwell, G. and A. G. Morell (1974). "The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **41**(0): 99-128.
- Aydt, E. and G. Wolff (2002). "Development of synthetic pan-selectin antagonists: a new treatment strategy for chronic inflammation in asthma." *Pathobiology* **70**(5): 297-301.
- Baenziger, J. U. and E. D. Green (1988). "Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin." *Biochim Biophys Acta* **947**(2): 287-306.
- Bajorath, J. and A. Aruffo (1995). "A template for generation and comparison of three-dimensional selectin models." *Biochem Biophys Res Commun* **216**(3): 1018-23.
- Barreiro, O., M. Yanez-Mo, J. M. Serrador, M. C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, H. Furthmayr and F. Sanchez-Madrid (2002). "Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes." *J Cell Biol* **157**(7): 1233-45.
- Beckmann, R. J., R. J. Schmidt, R. F. Santerre, J. Plutzky, G. R. Crabtree and G. L. Long (1985). "The structure and evolution of a 461 amino acid human protein C precursor and its messenger RNA, based upon the DNA sequence of cloned human liver cDNAs." *Nucleic Acids Res* **13**(14): 5233-47.
- Bedard, K., E. Szabo, M. Michalak and M. Opas (2005). "Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57." *Int Rev Cytol* **245**: 91-121.
- Beeh, K. M., J. Beier, M. Meyer, R. Buhl, R. Zahlten and G. Wolff (2006). "Bimosiamose, an inhaled small-molecule pan-selectin antagonist, attenuates late asthmatic reactions following allergen challenge in mild asthmatics: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical cross-over-trial." *Pulm Pharmacol Ther* **19**(4): 233-41.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne and S. Brunak (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J. Mol. Biol.* **340**: 783-795.
- Berg, E. L., L. A. Goldstein, M. A. Jutila, M. Nakache, L. J. Picker, P. R. Streeter, N. W. Wu, D. Zhou and E. C. Butcher (1989). "Homing receptors and vascular addressins: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic." *Immunol Rev* **108**: 5-18.
- Berg, E. L., L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze and E. C. Butcher (1993). "L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1." *Nature* **366**(6456): 695-8.
- Bergwerff, A. A., J. E. Thomas-Oates, J. van Oostrum, J. P. Kamerling and J. F. Vliegthart (1992). "Human urokinase contains GalNAc beta (1-4)[Fuc alpha (1-3)]GlcNAc beta (1-2) as a novel terminal element in N-linked carbohydrate chains." *FEBS Lett* **314**(3): 389-94.
- Bevilacqua, M. P., S. Stengelin, M. A. Gimbrone, Jr. and B. Seed (1989). "Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins." *Science* **243**(4895): 1160-5.
- Blanchard, V., R. A. Gadkari, G. J. Gerwig, B. R. Leeftang, R. R. Dighe and J. P. Kamerling (2007). "Characterization of the N-linked oligosaccharides from human chorionic gonadotropin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." *Glycoconj J* **24**(1): 33-47.

- Bodian, D. L., E. Y. Jones, K. Harlos, D. I. Stuart and S. J. Davis (1994). "Crystal structure of the extracellular region of the human cell adhesion molecule CD2 at 2,5Å resolution." Structure **15**(2): 755-766.
- Bowen, B. R., C. Fennie and L. A. Lasky (1990). "The Mel 14 antibody binds to the lectin domain of the murine peripheral lymph node homing receptor." J Cell Biol **110**(1): 147-53.
- Bowen, B. R., T. Nguyen and L. A. Lasky (1989). "Characterization of a human homologue of the murine peripheral lymph node homing receptor." J Cell Biol **109**(1): 421-7.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brady, H. R., O. Spertini, W. Jimenez, B. M. Brenner, P. A. Marsden and T. F. Tedder (1992). "Neutrophils, monocytes, and lymphocytes bind to cytokine-activated kidney glomerular endothelial cells through L-selectin (LAM-1) in vitro." J Immunol **149**(7): 2437-44.
- Brenner, B., E. Gulbins, G. L. Busch, U. Koppenhoefer, F. Lang and O. Linderkamp (1997). "L-selectin regulates actin polymerisation via activation of the small G-protein Rac2." Biochem Biophys Res Commun **231**(3): 802-7.
- Brenner, B., E. Gulbins, K. Schlottmann, U. Koppenhoefer, G. L. Busch, B. Walzog, M. Steinhausen, K. M. Coggeshall, O. Linderkamp and F. Lang (1996). "L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15376-81.
- Brenner, B. C., S. Kadel, S. Grigorovich and O. Linderkamp (2002). "Mechanisms of L-selectin-induced activation of the nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)." Biochem Biophys Res Commun **291**(2): 237-44.
- Bruhhl, R. E., T. A. Springer and D. F. Bainton (1996). "Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy." J Histochem Cytochem **44**(8): 835-44.
- Butcher, E. C., R. G. Scollay and I. L. Weissman (1980). "Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules." Eur J Immunol **10**(7): 556-61.
- Campbell, J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson and E. C. Butcher (1998). "Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions." Science **279**(5349): 381-4.
- Caramelo, J. J. and A. J. Parodi (2008). "Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles." J Biol Chem **283**(16): 10221-5.
- Carman, C. V. and T. A. Springer (2004). "A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them." J Cell Biol **167**(2): 377-88.
- Catalina, M. D., M. C. Carroll, H. Arizpe, A. Takashima, P. Estess and M. H. Siegelman (1996). "The route of antigen entry determines the requirement for L-selectin during immune responses." J Exp Med **184**(6): 2341-51.
- CCP4 (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **50**(Pt 5): 760-3.
- Chan, A. L., H. R. Morris, M. Panico, A. T. Etienne, M. E. Rogers, P. Gaffney, L. Creighton-Kempford and A. Dell (1991). "A novel sialylated N-acetylgalactosamine-containing oligosaccharide is the major complex-type structure present in Bowes melanoma tissue plasminogen activator." Glycobiology **1**(2): 173-85.
- Chang, V. T., M. Crispin, A. R. Aricescu, D. J. Harvey, J. E. Nettleship, J. A. Fennelly, C. Yu, K. S. Boles, E. J. Evans, D. I. Stuart, R. A. Dwek, E. Y. Jones, R. J. Owens and S. J. Davis (2007). "Glycoprotein structural genomics: solving the glycosylation problem." Structure **15**(3): 267-73.
- Chen, A., P. Engel and T. F. Tedder (1995). "Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes." J Exp Med **182**(2): 519-30.
- Chiu, M. H., T. Tamura, M. S. Wadhwa and K. G. Rice (1994). "In vivo targeting function of N-linked oligosaccharides with terminating galactose and N-acetylgalactosamine residues." J Biol Chem **269**(23): 16195-202.
- Clark, R. A., R. C. Fuhlbrigge and T. A. Springer (1998). "L-Selectin ligands that are O-glycoprotease resistant and distinct from MECA-79 antigen are sufficient for tethering and rolling of lymphocytes on human high endothelial venules." J Cell Biol **140**(3): 721-31.

- Cockett, M. I., C. R. Bebbington and G. T. Yarranton (1990). "High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification." *Biotechnology (N Y)* **8**(7): 662-7.
- Coddeville, B., G. Strecker, J. M. Wieruszkeski, J. F. Vliegenthart, H. van Halbeek, J. Peter-Katalinic, H. Egge and G. Spik (1992). "Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of alpha-D-Galp-(1-->3)-beta-D-Gal- and alpha-NeuAc-(2-->6)-beta-D-GalpNAc-(1-->4)- beta-D-GlcNAc-substituted N-linked glycans." *Carbohydr Res* **236**: 145-64.
- Coligan, J. E., B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher and P. T. Wingfield, Eds. (1995). *Current Protocols in Protein Science. Proteins - Laboratory Manuals*, Wiley.
- Conradt, H. S., M. Gawlitzek, E. Grabenhorst, A. Hoffmann, M. Nimtz, F. Oltmanns-Bleck and S. Pohl (1995). *Modulation of the carbohydrate structures of recombinant human glycoprotein therapeutics*. Medicinal Chemistry: Today and Tomorrow, Tokyo, Blackwell science.
- Crockett-Torabi, E., B. Sulenbarger, C. W. Smith and J. C. Fantone (1995). "Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules." *J Immunol* **154**(5): 2291-302.
- Cumming, D. A. (1991). "Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications." *Glycobiology* **1**(2): 115-30.
- Cummings, R. D. (1999). "Structure and function of the selectin ligand PSGL-1." *Braz J Med Biol Res* **32**(5): 519-28.
- Davis, S. J., M. J. Puklavec, D. A. Ashford, K. Harlos, E. Y. Jones, D. I. Stuart and A. F. Williams (1993). "Expression of soluble recombinant glycoproteins with predefined glycosylation: application to the crystallization of the T-cell glycoprotein CD2." *Protein Eng* **6**(2): 229-32.
- Dell, A., K. H. Khoo, M. Panico, McDowell, R.A., A. T. Etienne, A. J. Reaso, H. R. Morris and Eds. (1993). *Glycobiology: a practical approach*. Oxford, Oxford University Press.
- Diaz-Rodriguez, E., A. Esparis-Ogando, J. C. Montero, L. Yuste and A. Pandiella (2000). "Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors." *Biochem J* **346 Pt 2**: 359-67.
- Dong, A., X. Xu, A. M. Edwards, C. Chang, M. Chruszcz, M. Cuff, M. Cymborowski, R. Di Leo, O. Egorova, E. Evdokimova, E. Philippova, J. Gu, J. Guthrie, A. Ignatchenko, A. Joachimiak, N. Klostermann, Y. Kim, Y. Korniyenko, W. Minor, Q. Que, A. Savchenko, T. Skarina, K. Tan, A. Yakunin, A. Yee, V. Yim, R. Zhang, H. Zheng, M. Akutsu, C. Arrowsmith, G. V. Avvakumov, A. Bochkarev, L. G. Dahlgren, S. Dhe-Paganon, S. Dimov, L. Dombrovski, P. Finerty, Jr., S. Flodin, A. Flores, S. Graslund, M. Hammerstrom, M. D. Herman, B. S. Hong, R. Hui, I. Johansson, Y. Liu, M. Nilsson, L. Nedyalkova, P. Nordlund, T. Nyman, J. Min, H. Ouyang, H. W. Park, C. Qi, W. Rabeh, L. Shen, Y. Shen, D. Sukumard, W. Tempel, Y. Tong, L. Tresagues, M. Vedadi, J. R. Walker, J. Weigelt, M. Welin, H. Wu, T. Xiao, H. Zeng and H. Zhu (2007). "In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination." *Nat Methods* **4**(12): 1019-21.
- Donnelly, S. C., C. Haslett, I. Dransfield, C. E. Robertson, D. C. Carter, J. A. Ross, I. S. Grant and T. F. Tedder (1994). "Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome." *Lancet* **344**(8917): 215-9.
- Dorner, A. J., D. G. Bole and R. J. Kaufman (1987). "The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins." *J Cell Biol* **105**(6 Pt 1): 2665-74.
- Doyle, N. A., S. D. Bhagwan, B. B. Meek, G. J. Kutkoski, D. A. Steeber, T. F. Tedder and C. M. Doerschuk (1997). "Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice." *J Clin Invest* **99**(3): 526-33.
- Duijvestijn, A. M., E. Horst, S. T. Pals, B. N. Rouse, A. C. Steere, L. J. Picker, C. J. Meijer and E. C. Butcher (1988). "High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452." *Am J Pathol* **130**(1): 147-55.
- Dunne, J. L., C. M. Ballantyne, A. L. Beaudet and K. Ley (2002). "Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1." *Blood* **99**(1): 336-41.
- Durocher, Y., S. Perret and A. Kamen (2002). "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells." *Nucleic Acids Res* **30**(2).
- Dwir, O., A. Solomon, S. Mangan, G. S. Kansas, U. S. Schwarz and R. Alon (2003). "Avidity enhancement of L-selectin bonds by flow: shear-promoted rotation of leukocytes turn labile bonds into functional tethers." *J Cell Biol* **163**(3): 649-59.
- Ehrhardt, C., C. Kneuer and U. Bakowsky (2004). "Selectins - an emerging target for drug delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**: 527 - 549.

- Ehrhardt, C., M. Schmolke, A. Matzke, A. W. Knoblauch, C., V. Wixler and S. Ludwig (2006). "Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent." *Signal Transduction* **6**: 179-184.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
- Enders, S., G. Bernhard, A. Zakrzewicz and R. Tauber (2007). "Inhibition of L-selectin binding by polyacrylamide-based conjugates under defined flow conditions." *Biochim Biophys Acta* **1770**(10): 1441-9.
- Erlandsen, S. L., S. R. Hasslen and R. D. Nelson (1993). "Detection and spatial distribution of the beta 2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM." *J Histochem Cytochem* **41**(3): 327-33.
- Feng, D., J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak and A. M. Dvorak (1998). "Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP." *J Exp Med* **187**(6): 903-15.
- Fieger, C. B. 1997 "Klonierung und Expression von humanem L-Selektin - Charakterisierung der rekombinanten Proteinformen" Fachbereich Chemie Freie Universität Berlin
- Fieger, C. B., S. Emig-Vollmer, T. Petri, M. Grafe, M. Gohlke, N. Debus, W. Semmler, R. Tauber and B. Volz (2001). "The adhesive properties of recombinant soluble L-selectin are modulated by its glycosylation." *Biochim Biophys Acta* **1524**(1): 75-85.
- Fiete, D. and J. U. Baenziger (1997). "Isolation of the SO4-4-GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha-specific receptor from rat liver." *J Biol Chem* **272**(23): 14629-37.
- Fiete, D., M. C. Beranek and J. U. Baenziger (1997). "The macrophage/endothelial cell mannose receptor cDNA encodes a protein that binds oligosaccharides terminating with SO4-4-GalNAc beta 1,4GlcNAc beta or Man at independent sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11256-61.
- Fiete, D., V. Srivastava, O. Hindsgaul and J. U. Baenziger (1991). "A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO4-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin." *Cell* **67**(6): 1103-10.
- Fiete, D. J., M. C. Beranek and J. U. Baenziger (1998). "A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO4 binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2089-93.
- Finger, E. B., K. D. Puri, R. Alon, M. B. Lawrence, U. H. von Andrian and T. A. Springer (1996). "Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear." *Nature* **379**(6562): 266-9.
- Foxall, C., S. R. Watson, D. Dowbenko, C. Fennie, L. A. Lasky, M. Kiso, A. Hasegawa, D. Asa and B. K. Brandley (1992). "The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide." *J Cell Biol* **117**(4): 895-902.
- Frenette, P. S. and D. D. Wagner (1997). "Insights into selectin function from knockout mice." *Thromb Haemost* **78**(1): 60-4.
- Friedrich, M., D. Bock, S. Philipp, N. Ludwig, R. Sabat, K. Wolk, S. Schroeter-Maas, E. Aydt, S. Kang, T. N. Dam, R. Zahlten, W. Sterry and G. Wolff (2006). "Pan-selectin antagonism improves psoriasis manifestation in mice and man." *Arch Dermatol Res* **297**(8): 345-51.
- Fuhrmann, M., A. Hausherr, L. Ferbitz, T. Schodl, M. Heitzer and P. Hegemann (2004). "Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene." *Plant Mol Biol* **55**(6): 869-81.
- Gallatin, W. M., I. L. Weissman and E. C. Butcher (1983). "A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes." *Nature* **304**(5921): 30-4.
- Geoffroy, J. S. and S. D. Rosen (1989). "Demonstration that a lectin-like receptor (gp90MEL) directly mediates adhesion of lymphocytes to high endothelial venules of lymph nodes." *J Cell Biol* **109**(5): 2463-9.
- Giagulli, C., L. Ottoboni, E. Cavegion, B. Rossi, C. Lowell, G. Constantin, C. Laudanna and G. Berton (2006). "The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating beta 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for beta 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion." *J Immunol* **177**(1): 604-11.
- Girard, J. P. and T. A. Springer (1995). "High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration." *Immunol Today* **16**(9): 449-57.
- Gohlke, M., U. Mach, R. Nuck, B. Volz, C. Fieger, R. Tauber and W. Reutter (1999). "H (0) blood group determinant is present on soluble human L-selectin expressed in BHK-cells." *FEBS Lett* **450**(1-2): 111-6.

- Gohlke, M., U. Mach, R. Nuck, M. Zimmermann-Kordmann, D. Grunow, C. Fieger, B. Volz, R. Tauber, T. Petri, N. Debus and W. Reutter (2000). "Carbohydrate structures of soluble human L-selectin recombinantly expressed in baby-hamster kidney cells." Biotechnol Appl Biochem **32**(Pt 1): 41-51.
- Gowans, J. L. (1959). "The life-history of lymphocytes." Br Med Bull **15**(1): 50-3.
- Gowans, J. L. (1959). "The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat." J Physiol **146**(1): 54-69.
- Gowans, J. L. and E. J. Knight (1964). "The Route Of Re-Circulation Of Lymphocytes In The Rat." Proc R Soc Lond B Biol Sci **159**: 257-82.
- Graves, B. J., R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K. S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky and D. K. Burns (1994). "Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains." Nature **367**(6463): 532-8.
- Greenberg, A. W., D. K. Brunk and D. A. Hammer (2000). "Cell-free rolling mediated by L-selectin and sialyl Lewis(x) reveals the shear threshold effect." Biophys J **79**(5): 2391-402.
- Griffin, J. D., O. Spertini, T. J. Ernst, M. P. Belvin, H. B. Levine, Y. Kanakura and T. F. Tedder (1990). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors." J Immunol **145**(2): 576-84.
- Grinnell, B. W., R. B. Hermann and S. B. Yan (1994). "Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide." Glycobiology **4**(2): 221-5.
- Grinnell, B. W., J. D. Walls and B. Gerlitz (1991). "Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin." J Biol Chem **266**(15): 9778-85.
- Grossmann, M., M. W. Szkudlinski, J. E. Tropea, L. A. Bishop, N. R. Thotakura, P. R. Schofield and B. D. Weintraub (1995). "Expression of human thyrotropin in cell lines with different glycosylation patterns combined with mutagenesis of specific glycosylation sites. Characterization of a novel role for the oligosaccharides in the in vitro and in vivo bioactivity." J Biol Chem **270**(49): 29378-85.
- Hallmann, R., M. A. Jutila, C. W. Smith, D. C. Anderson, T. K. Kishimoto and E. C. Butcher (1991). "The peripheral lymph node homing receptor, LECAM-1, is involved in CD18-independent adhesion of human neutrophils to endothelium." Biochem Biophys Res Commun **174**(1): 236-43.
- Hanson, S. R., E. K. Culyba, T. L. Hsu, C. H. Wong, J. W. Kelly and E. T. Powers (2009). "The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3131-6.
- Hard, K., G. Van Zadelhoff, P. Moonen, J. P. Kamerling and F. G. Vliegenthart (1992). "The Asn-linked carbohydrate chains of human Tamm-Horsfall glycoprotein of one male. Novel sulfated and novel N-acetylgalactosamine-containing N-linked carbohydrate chains." Eur J Biochem **209**(3): 895-915.
- Harms, G. 2002 "Identifizierung neuartiger Liganden des Adhäsionsrezeptors L-Selektin" Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie. Freie Universität Berlin
- Harms, G., R. Kraft, G. Grelle, B. Volz, J. Dornedde and R. Tauber (2001). "Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand." Biochem J **360**(Pt 3): 531-8.
- Hasslen, S. R., U. H. von Andrian, E. C. Butcher, R. D. Nelson and S. L. Erlandsen (1995). "Spatial distribution of L-selectin (CD62L) on human lymphocytes and transfected murine L1-2 cells." Histochem J **27**(7): 547-54.
- Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." Science **291**(5512): 2364-9.
- Hemmerich, S., E. C. Butcher and S. D. Rosen (1994). "Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody." J Exp Med **180**(6): 2219-26.
- Hemmerich, S., H. Leffler and S. D. Rosen (1995). "Structure of the O-glycans in GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin." J Biol Chem **270**(20): 12035-47.
- Hicke, B. J., S. R. Watson, A. Koenig, C. K. Lynott, R. F. Bargatze, Y. F. Chang, S. Ringquist, L. Moon-McDermott, S. Jennings, T. Fitzwater, H. L. Han, N. Varki, I. Albinana, M. C. Willis, A. Varki and D. Parma (1996). "DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice." J Clin Invest **98**(12): 2688-92.

- Hjelmstrom, P. (2001). "Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines." *J Leukoc Biol* **69**(3): 331-9.
- Hooper, L. V., M. C. Beranek, S. M. Manzella and J. U. Baenziger (1995). "Differential expression of GalNAc-4-sulfotransferase and GalNAc-transferase results in distinct glycoforms of carbonic anhydrase VI in parotid and submaxillary glands." *J Biol Chem* **270**(11): 5985-93.
- Huang, M. C., O. Zollner, T. Moll, P. Maly, A. D. Thall, J. B. Lowe and D. Vestweber (2000). "P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1 are differentially modified by fucosyltransferases Fuc-TIV and Fuc-TVII in mouse neutrophils." *J Biol Chem* **275**(40): 31353-60.
- Imai, Y., M. S. Singer, C. Fennie, L. A. Lasky and S. D. Rosen (1991). "Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor." *J Cell Biol* **113**(5): 1213-21.
- Imai, Y., D. D. True, M. S. Singer and S. D. Rosen (1990). "Direct demonstration of the lectin activity of gp90MEL, a lymphocyte homing receptor." *J Cell Biol* **111**(3): 1225-32.
- Imperiali, B. and S. E. O'Connor (1999). "Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure." *Curr Opin Chem Biol* **3**(6): 643-9.
- Irjala, H., E. L. Johansson, R. Grenman, K. Alanen, M. Salmi and S. Jalkanen (2001). "Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium." *J Exp Med* **194**(8): 1033-42.
- Jalkanen, S., R. F. Bargatze, J. de los Toyos and E. C. Butcher (1987). "Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95-kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells." *J Cell Biol* **105**(2): 983-90.
- Jenison, R. D., S. D. Jennings, D. W. Walker, R. F. Bargatze and D. Parma (1998). "Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **8**(4): 265-79.
- Johnston, G. I., R. G. Cook and R. P. McEver (1989). "Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation." *Cell* **56**(6): 1033-44.
- Jung, T. M. and M. O. Dailey (1990). "Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface." *J Immunol* **144**(8): 3130-6.
- Jung, U. and K. Ley (1999). "Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin." *J Immunol* **162**(11): 6755-62.
- Jutila, M. A., L. Rott, E. L. Berg and E. C. Butcher (1989). "Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1." *J Immunol* **143**(10): 3318-24.
- Kabsch, W. (1993). "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants." *J Appl Cryst* **26**: 795-800.
- Kahn, J., B. Walcheck, G. I. Migaki, M. A. Jutila and T. K. Kishimoto (1998). "Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism." *Cell* **92**(6): 809-18.
- Kansas, G. S., K. B. Saunders, K. Ley, A. Zakrzewicz, R. M. Gibson, B. C. Furie, B. Furie and T. F. Tedder (1994). "A role for the epidermal growth factor-like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion." *J Cell Biol* **124**(4): 609-18.
- Kansas, G. S., O. Spertini, L. M. Stoolman and T. F. Tedder (1991). "Molecular mapping of functional domains of the leukocyte receptor for endothelium, LAM-1." *J Cell Biol* **114**(2): 351-8.
- Kansas, G. S., G. S. Wood and E. G. Engleman (1985). "Maturational and functional diversity of human B lymphocytes delineated with anti-Leu-8." *J Immunol* **134**(5): 3003-6.
- Kashima, T., A. Hasegawa, H. Iwata and T. Inoue (1999). "Expression of Recombinant bovine L-selectin in Escherichia coli and insect cells." *J Vet Med Sci* **61**(3): 251-4.
- Kawar, Z. S., S. M. Haslam, H. R. Morris, A. Dell and R. D. Cummings (2005). "Novel poly-GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc) and fucosylated poly-LacdiNAc N-glycans from mammalian cells expressing β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase and α 1,3-fucosyltransferase." *J Biol Chem* **280**(13): 12810-9.
- Kawashima, H., N. Watanabe, M. Hirose, Y. F. Li, J. Hirose and M. Miyasaka (1998). "Vascular and non-vascular ligands for L-selectin." *Cell Adhes Commun* **6**(2-3): 135-9.

- Kilian, K., J. Dervede, E. C. Mueller, I. Bahr and R. Tauber (2004). "The interaction of protein kinase C isozymes alpha, iota, and theta with the cytoplasmic domain of L-selectin is modulated by phosphorylation of the receptor." *J Biol Chem* **279**(33): 34472-80.
- Kishimoto, T. K., M. A. Jutila, E. L. Berg and E. C. Butcher (1989). "Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors." *Science* **245**(4923): 1238-41.
- Kishimoto, T. K., M. A. Jutila and E. C. Butcher (1990). "Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2244-8.
- Kishimoto, T. K., R. A. Warnock, M. A. Jutila, E. C. Butcher, C. Lane, D. C. Anderson and C. W. Smith (1991). "Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro." *Blood* **78**(3): 805-11.
- Klopocki, A. G., T. Yago, P. Mehta, J. Yang, T. Wu, A. Leppanen, N. V. Bovin, R. D. Cummings, C. Zhu and R. P. McEver (2008). "Replacing a lectin domain residue in L-selectin enhances binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 but not to 6-sulfo-sialyl Lewis x." *J Biol Chem* **283**(17): 11493-500.
- Kobata, A. and T. Endo (1992). "Immobilized lectin columns: useful tools for the fractionation and structural analysis of oligosaccharides." *J Chromatogr* **597**(1-2): 111-22.
- Koenig, A., R. Jain, R. Vig, K. E. Norgard-Sumnicht, K. L. Matta and A. Varki (1997). "Selectin inhibition: synthesis and evaluation of novel sialylated, sulfated and fucosylated oligosaccharides, including the major capping group of GlyCAM-1." *Glycobiology* **7**(1): 79-93.
- Kubelka, V., F. Altmann, E. Staudacher, V. Tretter, L. Marz, K. Hard, J. P. Kamerling and J. F. Vliegenthart (1993). "Primary structures of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A2." *Eur J Biochem* **213**(3): 1193-204.
- Kunkel, E. J. and K. Ley (1996). "Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo." *Circ Res* **79**(6): 1196-204.
- Lasky, L. A. (1995). "Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response." *Annu Rev Biochem* **64**: 113-39.
- Lasky, L. A., M. S. Singer, T. A. Yednock, D. Dowbenko, C. Fennie, H. Rodriguez, T. Nguyen, S. Stachel and S. D. Rosen (1989). "Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain." *Cell* **56**(6): 1045-55.
- Laudanna, C., G. Constantin, P. Baron, E. Scarpini, G. Scarlato, G. Cabrini, C. Dehecchi, F. Rossi, M. A. Cassatella and G. Berton (1994). "Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule." *J Biol Chem* **269**(6): 4021-6.
- Lee, D., J. B. Schultz, P. A. Knauf and M. R. King (2007). "Mechanical shedding of L-selectin from the neutrophil surface during rolling on sialyl Lewis x under flow." *J Biol Chem* **282**(7): 4812-20.
- Leppanen, A., T. Yago, V. I. Otto, R. P. McEver and R. D. Cummings (2003). "Model glycosulfopeptides from P-selectin glycoprotein ligand-1 require tyrosine sulfation and a core 2-branched O-glycan to bind to L-selectin." *J Biol Chem* **278**(29): 26391-400.
- Lewinsohn, D. M., R. F. Bargatze and E. C. Butcher (1987). "Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes." *J Immunol* **138**(12): 4313-21.
- Ley, K., P. Gaetgens, C. Fennie, M. S. Singer, L. A. Lasky and S. D. Rosen (1991). "Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo." *Blood* **77**(12): 2553-5.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." *Nat Rev Immunol* **7**(9): 678-89.
- Li, X., D. A. Steeber, M. L. Tang, M. A. Farrar, R. M. Perlmutter and T. F. Tedder (1998). "Regulation of L-selectin-mediated rolling through receptor dimerization." *J Exp Med* **188**(7): 1385-90.
- Lou, J., T. Yago, A. G. Klopocki, P. Mehta, W. Chen, V. I. Zarnitsyna, N. V. Bovin, C. Zhu and R. P. McEver (2006). "Flow-enhanced adhesion regulated by a selectin interdomain hinge." *J Cell Biol* **174**(7): 1107-17.
- Lowe, J. B. (2002). "Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function." *Immunol Rev* **186**: 19-36.

- Maaheimo, H., R. Renkonen, J. P. Turunen, L. Penttila and O. Renkonen (1995). "Synthesis of a divalent sialyl Lewis x O-glycan, a potent inhibitor of lymphocyte-endothelium adhesion. Evidence that multivalency enhances the saccharide binding to L-selectin." *Eur J Biochem* **234**(2): 616-25.
- Marshall, B. T., M. Long, J. W. Piper, T. Yago, R. P. McEver and C. Zhu (2003). "Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules." *Nature* **423**(6936): 190-3.
- Marttila-Ichihara, F., R. Turja, M. Miiluniemi, M. Karikoski, M. Maksimow, J. Niemela, L. Martinez-Pomares, M. Salmi and S. Jalkanen (2008). "Macrophage mannose receptor on lymphatics controls cell trafficking." *Blood* **112**(1): 64-72.
- Matala, E., S. R. Alexander, T. K. Kishimoto and B. Walcheck (2001). "The cytoplasmic domain of L-selectin participates in regulating L-selectin endoproteolysis." *J Immunol* **167**(3): 1617-23.
- McEver, R. P. (2005). "A sulfated address for lymphocyte homing." *Nat Immunol* **6**(11): 1067-9.
- Mehta, P. and R. P. McEver (2008). Structure of lectin and EGF domains of L-selectin.
- Mengeling, B. J., S. M. Manzella and J. U. Baenziger (1995). "A cluster of basic amino acids within an alpha-helix is essential for alpha-subunit recognition by the glycoprotein hormone N-acetylgalactosaminyltransferase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(2): 502-6.
- Mitoma, J., X. Bao, B. Petryanik, P. Schaerli, J. M. Gauguet, S. Y. Yu, H. Kawashima, H. Saito, K. Ohtsubo, J. D. Marth, K. H. Khoo, U. H. von Andrian, J. B. Lowe and M. Fukuda (2007). "Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment." *Nat Immunol* **8**(4): 409-18.
- Moyle, W. R., O. P. Bahl and L. Marz (1975). "Role of carbohydrate of human chorionic gonadotropin in the mechanism of hormone action." *J Biol Chem* **250**(23): 9163-9.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin and E. J. Dodson (1997). "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**(Pt 3): 240-55.
- Nakata, N., K. Furukawa, D. E. Greenwalt, T. Sato and A. Kobata (1993). "Structural study of the sugar chains of CD36 purified from bovine mammary epithelial cells: occurrence of novel hybrid-type sugar chains containing the Neu5Ac alpha 2-->6GalNAc beta 1-->4GlcNAc and the Man alpha 1-->2Man alpha 1-->3Man alpha 1-->6Man groups." *Biochemistry* **32**(16): 4369-83.
- Nelson, R. M., O. Cecconi, W. G. Roberts, A. Aruffo, R. J. Linhardt and M. P. Bevilacqua (1993). "Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation." *Blood* **82**(11): 3253-8.
- Otwinowski, Z. a. M., W. (1997). "Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode." *Methods in Enzymology* **276**: 307-326.
- Panayi, G. S. and V. M. Corrigall (2006). "BiP regulates autoimmune inflammation and tissue damage." *Autoimmun Rev* **5**(2): 140-2.
- Pavalko, F. M., D. M. Walker, L. Graham, M. Goheen, C. M. Doerschuk and G. S. Kansas (1995). "The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin." *J Cell Biol* **129**(4): 1155-64.
- Pennica, D., W. E. Holmes, W. J. Kohr, R. N. Harkins, G. A. Vehar, C. A. Ward, W. F. Bennett, E. Yelverton, P. H. Seeburg, H. L. Heyneker, D. V. Goeddel and D. Collen (1983). "Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli." *Nature* **301**(5897): 214-21.
- Perez-Iratxeta, C. and M. A. Andrade-Navarro (2008). "K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra." *BMC Struct Biol* **8**(25): 25.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March and R. A. Black (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." *Science* **282**(5392): 1281-4.
- Phan, U. T., T. T. Waldron and T. A. Springer (2006). "Remodeling of the lectin-EGF-like domain interface in P- and L-selectin increases adhesiveness and shear resistance under hydrodynamic force." *Nat Immunol* **7**(8): 883-9.
- Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C. M. Ballantyne and P. Kubes (2006). "Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade." *J Exp Med* **203**(12): 2569-75.

- Picker, L. J., R. J. Martin, A. Trumble, L. S. Newman, P. A. Collins, P. R. Bergstresser and D. Y. Leung (1994). "Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites." Eur J Immunol **24**(6): 1269-77.
- Picker, L. J., R. A. Warnock, A. R. Burns, C. M. Doerschuk, E. L. Berg and E. C. Butcher (1991). "The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140." Cell **66**(5): 921-33.
- Pochechueva, T. V., N. A. Ushakova, M. E. Preobrazhenskaya, N. E. Nifantiev, Y. E. Tsvetkov, M. A. Sablina, A. B. Tuzikov, M. I. Bird, R. Rieben and N. V. Bovin (2003). "P-selectin blocking potency of multimeric tyrosine sulfates in vitro and in vivo." Bioorg Med Chem Lett **13**(10): 1709-12.
- Pouyani, T. and B. Seed (1995). "PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus." Cell **83**(2): 333-43.
- Prystas, E. M., C. J. Parker, M. H. Holguin and J. F. Bohnsack (1993). "Aberrant glycosylation of L-selectin on the lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **7**(9): 1355-62.
- Puri, K. D., E. B. Finger, G. Gaudernack and T. A. Springer (1995). "Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules." J Cell Biol **131**(1): 261-70.
- Puri, K. D., E. B. Finger and T. A. Springer (1997). "The faster kinetics of L-selectin than of E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength." J Immunol **158**(1): 405-13.
- Rauert, W., A. N. Eddine, S. H. Kaufmann, M. S. Weiss and R. Janowski (2007). "Reductive methylation to improve crystallization of the putative oxidoreductase Rv0765c from *Mycobacterium tuberculosis*. ." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **Jun 1**(63 (Pt 6)): 507-11.
- Renkonen, O., S. Toppila, L. Penttila, H. Salminen, J. Helin, H. Maaheimo, C. E. Costello, J. P. Turunen and R. Renkonen (1997). "Synthesis of a new nanomolar saccharide inhibitor of lymphocyte adhesion: different poly-lactosamine backbones present multiple sialyl Lewis x determinants to L-selectin in high-affinity mode." Glycobiology **7**(4): 453-61.
- Robinson, S. D., P. S. Frenette, H. Rayburn, M. Cumiskey, M. Ullman-Cullere, D. D. Wagner and R. O. Hynes (1999). "Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11452-7.
- Rodgers, S. D., R. T. Camphausen and D. A. Hammer (2001). "Tyrosine sulfation enhances but is not required for PSGL-1 rolling adhesion on P-selectin." Biophys J **81**(4): 2001-9.
- Romig, T. S., C. Bell and D. W. Drolet (1999). "Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **731**(2): 275-84.
- Rosen, S. D. (2004). "Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond." Annu Rev Immunol **22**: 129-56.
- Rosen, S. D., M. S. Singer, T. A. Yednock and L. M. Stoolman (1985). "Involvement of sialic acid on endothelial cells in organ-specific lymphocyte recirculation." Science **228**(4702): 1005-7.
- Rossi, B. and G. Constantin (2008). "Anti-selectin therapy for the treatment of inflammatory diseases." Inflamm Allergy Drug Targets **7**(2): 85-93.
- Sako, D., K. M. Comess, K. M. Barone, R. T. Camphausen, D. A. Cumming and G. D. Shaw (1995). "A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding." Cell **83**(2): 323-31.
- Samulowitz, U., A. Kuhn, G. Brachtendorf, R. Nawroth, A. Braun, A. Bankfalvi, W. Bocker and D. Vestweber (2002). "Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope." Am J Pathol **160**(5): 1669-81.
- Sarangapani, K. K., T. Yago, A. G. Klopocki, M. B. Lawrence, C. B. Fieger, S. D. Rosen, R. P. McEver and C. Zhu (2004). "Low force decelerates L-selectin dissociation from P-selectin glycoprotein ligand-1 and endoglycan." J Biol Chem **279**(3): 2291-8.
- Sassetti, C., K. Tangemann, M. S. Singer, D. B. Kershaw and S. D. Rosen (1998). "Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34." J Exp Med **187**(12): 1965-75.
- Schenkel, A. R., Z. Mamdouh and W. A. Muller (2004). "Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation." Nat Immunol **5**(4): 393-400.
- Schleiffenbaum, B., O. Spertini and T. F. Tedder (1992). "Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity." J Cell Biol **119**(1): 229-38.
- Schwartz, A. L. (1991). "Trafficking of asialoglycoproteins and the asialoglycoprotein receptor." Targeted Diagn Ther **4**: 3-39.

- Shattil, S. J. (2005). "Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling." *Trends Cell Biol* **15**(8): 399-403.
- Siciliano, R. A., H. R. Morris, R. A. McDowell, P. Azadi, M. E. Rogers, H. P. Bennett and A. Dell (1993). "The Lewis x epitope is a major non-reducing structure in the sulphated N-glycans attached to Asn-65 of bovine pro-opiomelanocortin." *Glycobiology* **3**(3): 225-39.
- Siddiqui, B. and S. Hakomori (1971). "A revised structure for the Forssman glycolipid hapten." *J Biol Chem* **246**(18): 5766-9.
- Siegelman, M. H., M. van de Rijn and I. L. Weissman (1989). "Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains." *Science* **243**(4895): 1165-72.
- Siegelman, M. H. and I. L. Weissman (1989). "Human homologue of mouse lymph node homing receptor: evolutionary conservation at tandem cell interaction domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5562-6.
- Simon, S. I., V. Cherapanov, I. Nadra, T. K. Waddell, S. M. Seo, Q. Wang, C. M. Doerschuk and G. P. Downey (1999). "Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18." *J Immunol* **163**(5): 2891-901.
- Skelton, T. P., S. Kumar, P. L. Smith, M. C. Beranek and J. U. Baenziger (1992). "Pro-opiomelanocortin synthesized by corticotrophs bears asparagine-linked oligosaccharides terminating with SO₄-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha." *J Biol Chem* **267**(18): 12998-3006.
- Skinner, M. P., D. J. Fournier, R. K. Andrews, J. J. Gorman, C. N. Chesterman and M. C. Berndt (1989). "Characterization of human platelet GMP-140 as a heparin-binding protein." *Biochem Biophys Res Commun* **164**(3): 1373-9.
- Smith, C. W., T. K. Kishimoto, O. Abbassi, B. Hughes, R. Rothlein, L. V. McIntire, E. Butcher and D. C. Anderson (1991). "Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro." *J Clin Invest* **87**(2): 609-18.
- Smith, P. L. and J. U. Baenziger (1988). "A pituitary N-acetylgalactosamine transferase that specifically recognizes glycoprotein hormones." *Science* **242**(4880): 930-3.
- Smith, P. L. and J. U. Baenziger (1992). "Molecular basis of recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosamine-transferase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(1): 329-33.
- Smith, P. L., T. P. Skelton, D. Fiete, S. M. Dharmesh, M. C. Beranek, L. MacPhail, G. J. Broze, Jr. and J. U. Baenziger (1992). "The asparagine-linked oligosaccharides on tissue factor pathway inhibitor terminate with SO₄-4GalNAc beta 1, 4GlcNAc beta 1,2 Mana alpha." *J Biol Chem* **267**(27): 19140-6.
- Somers, W. S., J. Tang, G. D. Shaw and R. T. Camphausen (2000). "Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1." *Cell* **103**(3): 467-79.
- Spertini, O., P. Callegari, A. S. Cordey, J. Hauert, J. Joggi, V. von Fliedner and M. Schapira (1994). "High levels of the shed form of L-selectin are present in patients with acute leukemia and inhibit blast cell adhesion to activated endothelium." *Blood* **84**(4): 1249-56.
- Spertini, O., A. S. Freedman, M. P. Belvin, A. C. Penta, J. D. Griffin and T. F. Tedder (1991). "Regulation of leukocyte adhesion molecule-1 (TQ1, Leu-8) expression and shedding by normal and malignant cells." *Leukemia* **5**(4): 300-8.
- Spertini, O., G. S. Kansas, K. A. Reimann, C. R. Mackay and T. F. Tedder (1991). "Function and evolutionary conservation of distinct epitopes on the leukocyte adhesion molecule-1 (TQ-1, Leu-8) that regulate leukocyte migration." *J Immunol* **147**(3): 942-9.
- Spertini, O., F. W. Luscinskas, M. A. Gimbrone, Jr. and T. F. Tedder (1992). "Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions." *J Exp Med* **175**(6): 1789-92.
- Spertini, O., F. W. Luscinskas, G. S. Kansas, J. M. Munro, J. D. Griffin, M. A. Gimbrone, Jr. and T. F. Tedder (1991). "Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion." *J Immunol* **147**(8): 2565-73.
- Spertini, O., B. Schleiffenbaum, C. White-Owen, P. Ruiz, Jr. and T. F. Tedder (1992). "ELISA for quantitation of L-selectin shed from leukocytes in vivo." *J Immunol Methods* **156**(1): 115-23.
- Stamper, H. B., Jr. and J. J. Woodruff (1976). "Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules." *J Exp Med* **144**(3): 828-33.

- Stanley, P., V. Caillibot and L. Siminovitch (1975). "Selection and characterization of eight phenotypically distinct lines of lectin-resistant Chinese hamster ovary cell." *Cell* **6**(2): 121-8.
- Stanley, P., S. Narasimhan, L. Siminovitch and H. Schachter (1975). "Chinese hamster ovary cells selected for resistance to the cytotoxicity of phytohemagglutinin are deficient in a UDP-N-acetylglucosamine--glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9): 3323-7.
- Stevens, S. K., I. L. Weissman and E. C. Butcher (1982). "Differences in the migration of B and T lymphocytes: organ-selective localization in vivo and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition." *J Immunol* **128**(2): 844-51.
- Stoolman, L. M. and S. D. Rosen (1983). "Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation." *J Cell Biol* **96**(3): 722-9.
- Stoolman, L. M., T. S. Tenforde and S. D. Rosen (1984). "Phosphomannosyl receptors may participate in the adhesive interaction between lymphocytes and high endothelial venules." *J Cell Biol* **99**(4 Pt 1): 1535-40.
- Storoni, L. C., A. J. McCoy and R. J. Read (2004). "Likelihood-enhanced fast rotation functions." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 3): 432-8.
- Suzuki, Y., Y. Toda, T. Tamatani, T. Watanabe, T. Suzuki, T. Nakao, K. Murase, M. Kiso, A. Hasegawa, K. Tadano-Aritomi and et al. (1993). "Sulfated glycolipids are ligands for a lymphocyte homing receptor, L-selectin (LECAM-1), Binding epitope in sulfated sugar chain." *Biochem Biophys Res Commun* **190**(2): 426-34.
- Tedder, T. F., C. M. Isaacs, T. J. Ernst, G. D. Demetri, D. A. Adler and C. M. Disteché (1989). "Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins." *J Exp Med* **170**(1): 123-33.
- Tedder, T. F., T. Matsuyama, D. Rothstein, S. F. Schlossman and C. Morimoto (1990). "Human antigen-specific memory T cells express the homing receptor (LAM-1) necessary for lymphocyte recirculation." *Eur J Immunol* **20**(6): 1351-5.
- Tedder, T. F., A. C. Penta, H. B. Levine and A. S. Freedman (1990). "Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens." *J Immunol* **144**(2): 532-40.
- Tedder, T. F., D. A. Steeber, A. Chen and P. Engel (1995). "The selectins: vascular adhesion molecules." *Faseb J* **9**(10): 866-73.
- Thurin, M. and T. Kieber-Emmons (2002). "SA-Lea and tumor metastasis: the old prediction and recent findings." *Hybrid Hybridomics* **21**(2): 111-6.
- Tomiya, N., J. Awaya, M. Kurono, H. Hanzawa, I. Shimada, Y. Arata, T. Yoshida and N. Takahashi (1993). "Structural elucidation of a variety of GalNAc-containing N-linked oligosaccharides from human urinary kallidinogenase." *J Biol Chem* **268**(1): 113-26.
- Tomiya, N., S. Narang, Y. C. Lee and M. J. Betenbaugh (2004). "Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines." *Glycoconj J* **21**(6): 343-60.
- Toppila, S., J. Lauronen, P. Mattila, J. P. Turunen, L. Penttila, T. Paavonen, O. Renkonen and R. Renkonen (1997). "L-selectin ligands in rat high endothelium: multivalent sialyl Lewis x glycans are high-affinity inhibitors of lymphocyte adhesion." *Eur J Immunol* **27**(6): 1360-5.
- Turutin, D. V., E. A. Kubareva, M. A. Pushkareva, V. Ullrich and G. F. Sud'ina (2003). "Activation of NF-kappa B transcription factor in human neutrophils by sulphatides and L-selectin cross-linking." *FEBS Lett* **536**(1-3): 241-5.
- Van den Nieuwenhof, I. M., H. Koistinen, R. L. Easton, R. Koistinen, M. Kamarainen, H. R. Morris, I. Van Die, M. Seppala, A. Dell and D. H. Van den Eijnden (2000). "Recombinant glycodelin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodelin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in chinese hamster ovary cells." *Eur J Biochem* **267**(15): 4753-62.
- Varki, A. (1994). "Selectin ligands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7390-7.
- Varki, A. (1997). "Selectin ligands: will the real ones please stand up?" *J Clin Invest* **100**(11 Suppl): S31-5.
- Waddell, T. K., L. Fialkow, C. K. Chan, T. K. Kishimoto and G. P. Downey (1994). "Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin." *J Biol Chem* **269**(28): 18485-91.

- Waddell, T. K., L. Fialkow, C. K. Chan, T. K. Kishimoto and G. P. Downey (1995). "Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase." *J Biol Chem* **270**(25): 15403-11.
- Walcheck, B., K. L. Moore, R. P. McEver and T. K. Kishimoto (1996). "Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro." *J Clin Invest* **98**(5): 1081-7.
- Watanabe, N., H. Kawashima, Y. F. Li and M. Miyasaka (1999). "Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. III. Characterization of L-selectin reactive heparan sulfate proteoglycans." *J Biochem (Tokyo)* **125**(4): 826-31.
- Watanabe, T., Y. Song, Y. Hirayama, T. Tamatani, K. Kuida and M. Miyasaka (1992). "Sequence and expression of a rat cDNA for LECAM-1." *Biochim Biophys Acta* **1131**(3): 321-4.
- Watson, S. R., C. Fennie and L. A. Lasky (1991). "Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera." *Nature* **349**(6305): 164-7.
- Watson, S. R., Y. Imai, C. Fennie, J. Geoffrey, M. Singer, S. D. Rosen and L. A. Lasky (1991). "The complement binding-like domains of the murine homing receptor facilitate lectin activity." *J Cell Biol* **115**(1): 235-43.
- Watson, S. R., Y. Imai, C. Fennie, J. S. Geoffroy, S. D. Rosen and L. A. Lasky (1990). "A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules." *J Cell Biol* **110**(6): 2221-9.
- Weis, W. I. (1994). "Lectins on a roll: the structure of E-selectin." *Structure* **2**(3): 147-50.
- Xu, T., L. Chen, X. Shang, L. Cui, J. Luo, C. Chen, X. Ba and X. Zeng (2008). "Critical role of Lck in L-selectin signaling induced by sulfatides engagement." *J Leukoc Biol*.
- Yago, T., J. Wu, C. D. Wey, A. G. Klopocki, C. Zhu and R. P. McEver (2004). "Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear." *J Cell Biol* **166**(6): 913-23.
- Yan, S. B., Y. B. Chao and H. van Halbeek (1993). "Novel Asn-linked oligosaccharides terminating in GalNAc beta (1-->4)[Fuc alpha (1-->3)]GlcNAc beta (1-->.) are present in recombinant human protein C expressed in human kidney 293 cells." *Glycobiology* **3**(6): 597-608.
- Yang, J., T. Hirata, K. Croce, G. Merrill-Skoloff, B. Tchernychev, E. Williams, R. Flaumenhaft, B. C. Furie and B. Furie (1999). "Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration." *J Exp Med* **190**(12): 1769-82.
- Yang, Y., V. H. Thomas, S. Man and K. G. Rice (2000). "Tissue targeting of multivalent GalNAc Le(x) terminated N-glycans in mice." *Glycobiology* **10**(12): 1341-5.
- Yuen, C. T., K. Bezouska, J. O'Brien, M. Stoll, R. Lemoine, A. Lubineau, M. Kiso, A. Hasegawa, N. J. Bockovich, K. C. Nicolaou and et al. (1994). "Sulfated blood group Lewis(a). A superior oligosaccharide ligand for human E-selectin." *J Biol Chem* **269**(3): 1595-8.
- Zhu, C., J. Lou and R. P. McEver (2005). "Catch bonds: physical models, structural bases, biological function and rheological relevance." *Biorheology* **42**(6): 443-62.
- Zhu, C. and R. P. McEver (2005). "Catch bonds: physical models and biological functions." *Mol Cell Biomech* **2**(3): 91-104.
- Zollner, O., M. C. Lenter, J. E. Blanks, E. Borges, M. Steegmaier, H. G. Zerwes and D. Vestweber (1997). "L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin." *J Cell Biol* **136**(3): 707-16.

9 Anhang

MALDI-TOF-MS Daten

Für die Monosaccharidbausteine in den Glykankompositionen, die zu den massenspektrometrisch gemessenen Masse/Ladungsverhältnissen (m/z) zugeordnet wurden, wurden folgende Abkürzungen verwendet:

- Hex: Hexose
- dHex: Deoxyhexose
- HexNAc: N-Acetyl-Hexosamin
- SA: Sialinsäure

Die Ziffern bezeichnen die Anzahl der jeweils vorgenannten Monosaccharideinheiten in der Komposition. In den folgenden Tabellen ist in den Spalten rechts neben der Komposition mit einem X angegeben, bei welcher LEHis-Glykosylierungsmutante (Drei-Ziffern-Code s. **Abb. 30**) die entsprechende m/z gemessen wurde.

Tabelle 8: Daten der massenspektrometrischen Untersuchung der N-Glykane der LEHis Glykosylierungsmutanten 100, 010, 001, 111 und AGP. Die Proben wurden nach Permethylierung im Positiv-Ionen-Modus gemessen. Zu den gemessenen m/z wurden entsprechende N-Glykankompositionen zugeordnet.

m/z	Komposition	LEHis Mutanten				AGP
		100	010	001	111	
1416,7	Hex3HexNAc3					X
1579,8	Hex5HexNAc2					X
1590,8	dHex1Hex3HexNAc3					X
1794,9	dHex1Hex4HexNAc3					X
1835,9	dHex1Hex3HexNAc4				X	X
1865,9	Hex4HexNAc4					X
2010,0	dHex2Hex3HexNAc4	X	X	X	X	
2040,0	dHex1Hex4HexNAc4			X	X	X
2070,0	Hex5HexNAc4					X
2081,0	dHex1Hex3HexNAc5				X	X
2214,1	dHex2Hex4HexNAc4	X	X	X	X	
2244,1	dHex1Hex5HexNAc4			X	X	X
2255,1	dHex2Hex3HexNAc5				X	
2285,1	dHex1Hex4HexNAc5		X	X	X	X
2326,2	dHex1Hex3HexNAc6	X	X	X	X	X
2401,2	dHex1Hex4HexNAc4SA1					X
2418,2	dHex2Hex5HexNAc4		X	X	X	X
2431,2	Hex5HexNAc4SA1					X
2459,2	dHex2Hex4HexNAc5	X	X	X	X	
2489,2	dHex1Hex5HexNAc5				X	X
2500,3	dHex2Hex3HexNAc6	X	X	X	X	
2519,3	Hex6HexNAc5					X
2530,3	dHex1Hex4HexNAc6				X	X
2592	dHex3Hex5HexNAc4			X	X	
2605,3	dHex1Hex5HexNAc4SA1		X		X	X
2633,3	dHex3Hex4HexNAc5		X	X	X	
2646,3	dHex1Hex4HexNAc5SA1		X		X	X
2663,3	dHex2Hex5HexNAc5				X	
2674,3	dHex3Hex3HexNAc6	X	X	X	X	

<i>m/z</i>	Komposition	LEHis Mutanten				AGP
		100	010	001	111	
2693,3	dHex1Hex6HexNAc5					X
2734,3	dHex1Hex5HexNAc6				X	X
2779,4	dHex2Hex5HexNAc4SA1				X	
2807	dHex4Hex4HexNAc5			X	X	
2820,4	dHex2Hex4HexNAc5SA1		X	X	X	
2850,4	dHex1Hex5HexNAc5SA1				X	X
2861,4	dHex2Hex3HexNAc6SA1	X			X	
2867,4	dHex2Hex6HexNAc5					X
2880,4	Hex6HexNAc5SA1					X
2908,4	dHex2Hex5HexNAc6				X	
2938,4	dHex1Hex6HexNAc6					X
2949,4	dHex2Hex4HexNAc7				X	
2966,5	dHex1Hex5HexNAc4SA2					X
2990,5	dHex2Hex3HexNAc8	X				
2994,5	dHex3Hex4HexNAc5SA1			X		
3054,5	dHex1Hex6HexNAc5SA1				X	X
3082,5	dHex3Hex5HexNAc6				X	
3095,5	dHex1Hex5HexNAc6SA1				X	X
3123,5	dHex3Hex4HexNAc7	X		X	X	
3142,5	dHex1Hex7HexNAc6				X	X
3164,6	dHex3Hex3HexNAc8	X				
3183,6	dHex1Hex6HexNAc7				X	X
3228,6	dHex2Hex6HexNAc5SA1				X	X
3256,6	dHex4Hex5HexNAc6			X		
3269,6	dHex2Hex5HexNAc6SA1			X	X	
3299,7	dHex1Hex6HexNAc6SA1					X
3316,7	dHex2Hex7HexNAc6					X
3387,8	dHex1Hex7HexNAc7					X
3415,8	dHex1Hex6HexNAc5SA2					X
3503,8	dHex1Hex7HexNAc6SA1					X
3660,9	dHex1Hex6HexNAc6SA2					X
3678,0	dHex2Hex7HexNAc6SA1					X
3749,0	dHex1Hex7HexNAc7SA1					X
3777,0	dHex1Hex6HexNAc5SA3					X
3865,1	dHex1Hex7HexNAc6SA2					X
3923,1	dHex2Hex7HexNAc7SA1					X
4039,2	dHex2Hex7HexNAc6SA2					X
4226,4	dHex1Hex7HexNAc6SA3					X
4587,7	dHex1Hex7HexNAc4SA4					X

Tabelle 9. Daten der massenspektroskopischen Untersuchungen der N-Glykane von den LEHis Glykosylierungsmutanten 100, 010, 001, sowie 111 und AGP. Die Messungen wurden nach Permethylierung im Negativ-Ionen-Modus durchgeführt.

<i>m/z</i>	Komposition	LEHis Mutanten				AGP
		100	010	001	111	
2082,0	S1dHex1Hex4HexNAc4				X	
2327,2	S1dHex1Hex4HexNAc5		X	X	X	
2368,3	S1dHex1Hex3HexNAc6	X	X	X	X	
2501,3	S1dHex2Hex4HexNAc5	X	X	X	X	
2542,4	S1dHex2Hex3HexNAc6	X	X	X	X	
2688,3	S1dHex1Hex4HexNAc5SA1				X	
3032,7	S1dHex2Hex3HexNAc8	X			X	
3206,8	S1dHex3Hex3HexNAc8	X			X	

Tabelle 10: Daten der massenspektrometrischen Messungen der N-Glykane der LEHis Glykosylierungsmutanten 100 (1), 010 (2), 001 (3), sowie 111 (4) und AGP. Die Messungen wurden nach Sialidase-Verdau im Positiv-Ionen-Modus durchgeführt. Weiterhin sind die Daten der Exoglykosidase-Verdaus angegeben. Die Nummern bezeichnen die Anzahl der entsprechenden Monosaccharideinheiten, die durch die Exoglykosidase abgespalten wurden. G: β -Galactosaminidase; F: α 1-3/4 Fucosidase; H¹: Hexosaminidase, spezifisch für GlcNAc; H: Hexosaminidase, spezifisch für GalNAc und GlcNAc. n: Wert konnte nicht bestimmt werden.

m/z	Komposition	LEHis Mutante				Exoglykosidase-Verdau				AGP	Exoglykosidase-Verdau			
		1	2	3	4	G	F	H ¹	H		G	F	H ¹	H
1136,4	Hex3HexNAc3									X	0	0	n	
1257,4	Hex5HexNAc2									X	0	0	0	0
1282,4	dHex1Hex3HexNAc3									X	0	0	1	0
1485,5	dHex1Hex3HexNAc4				X	0	0	2	0	X	0	0	2	0
1631,6	dHex2Hex3HexNAc4		X	X		0	1	2	0					
1647,5	dHex1Hex4HexNAc4		X	X		n				X	1	0	2	0
1663,6	Hex5HexNAc4									X	2	0	2	0
1688,6	dHex1Hex3HexNAc5				X	0	0	1	2	X	0	0	3	0
1793,6	dHex2Hex4HexNAc4	X	X	X	X	0	1	0	1					
1809,6	dHex1Hex5HexNAc4	X	X	X		2	0	2	0	X	2	0	2	0
1834,6	dHex2Hex3HexNAc5				X	0	1	1	2					
1850,6	dHex1Hex4HexNAc5	X	X	X		1	0	1	2	X	1	0	3	0
1891,6	dHex1Hex3HexNAc6	X	X	X	X	0	0	0	4	X	0	0	4	0
1955,6	dHex2Hex5HexNAc4	X	X	X		1	1	1	0	X	n			
1996,7	dHex2Hex4HexNAc5	X	X	X	X	1	1	1	2					
		X		X	X	0	1	0	2					
2012,7	dHex1Hex5HexNAc5									X	2	0	3	0
2028,6	Hex6HexNAc5									X	3	0	3	0
2037,7	dHex2Hex3HexNAc6	X	X	X	X	0	1	0	4					
2053,7	dHex1Hex4HexNAc6				X	0	0	n						
2142,7	dHex3Hex4HexNAc5	X	X	X		0	2	0	2					
2158,7	dHex2Hex5HexNAc5				X	2	1	3	0					
2174,7	dHex1Hex6HexNAc5				X	3	0	3	0	X	3	0	3	0
2183,8	dHex3Hex3HexNAc6	X	X	X	X	0	2	0	4					
2215,7	dHex1Hex5HexNAc6									X	2	0	4	0
2288,8	dHex4Hex4HexNAc5		X	X		0	3	0	2					
2377,8	dHex1Hex6HexNAc6									X	3	0	4	0
2443,9	dHex2Hex3HexNAc8	X				0	1	0	6					
2539,9	dHex1Hex7HexNAc6				X	n				X	4	0	4	0
2548,9	dHex3Hex4HexNAc7	X		X		0	2	0	4					
		X				1	2	1	4					
2589,9	dHex3Hex3HexNAc8	X				0	2	0	6					

Tabelle 11: Daten der massenspektrometrischen Messungen der N-Glykane der LEHis Glykosylierungsmutanten 100, 010, 001 und 111. Die Messungen wurden nach Sialidase-Verdau im Negativ-Ionen-Modus durchgeführt. Symbole wie in **Tabelle 10**.

m/z	Komposition	LEHis Mutanten				Exoglykosidase-Verdau			
		100	010	001	111	G	F	H ¹	H
1541,4	S1dHex1Hex3HexNAc4		X		X	n			
1703,4	S1dHex1Hex4HexNAc4		X		X	n			
1906,5	S1dHex1Hex4HexNAc5		X	X	X	1	0	1	0
1947,6	S1dHex1Hex3HexNAc6	X	X	X	X	0	0	0	2
2052,6	S1dHex2Hex4HexNAc5	X	X	X	X	1	1	1	0
2093,7	S1dHex2Hex3HexNAc6	X	X	X	X	0	1	0	2
2499,9	S1dHex2Hex3HexNAc8	X				0	1	0	n
2645,9	S1dHex3Hex3HexNAc8	X				0	2	0	n

Abkürzungen

α -MEM	<i>Minimal essential medium, eagle, alpha modification</i>
(v/v)	Volumen /Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen
°C	Grad Celsius
AAC	Aptamer- Affinitätschromatographie
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
ADAM17	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
AGP	α -1-saures Glykoprotein
AOX1	<i>Alcoholoxygenase 1</i>
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
ATT	<i>6-aza2-thiothymine</i>
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
BMG/BMM	<i>Buffered Minimal Glycerol/Buffered Minimal Methanol Medium</i>
BMGY/BMMY	<i>Buffered Glycerol/Methanol Complex Medium</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
c-Abl	<i>Cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
CD	<i>Circulardichroismus</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
CNX/CRT	<i>Calnexin/Calreticulin Chaperone</i>
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
ConA	<i>Concanavalin A</i>
core-2 GlcNAc-TI	<i>Core-2 GlcNAc Transferase I</i>
CV	<i>Column volume</i>
DEAE	Diethylaminoethyl Cellulose
DHB	<i>2,5-dihydroxy benzoic acid</i>
dHex	<i>Deoxyhexose</i>
DM	<i>n-Octyl-β-D-Maltosid</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin Proteine
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
EtBr	Ethidiumbromid
fc	<i>flow cell</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fuc	<i>Fucose</i>
Fuc-T-VII	<i>Fucosyltransferase VII</i>
g	Gramm
G418	<i>Geneticin, G418</i>
GAG	Glykosaminoglykane
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N-Acetyl-Glucosamin</i>
GlyCAM-1	<i>Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
h	Stunde
HEK293F	<i>Human embryonic kidney 293 Freestyle</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HEV	Hochendotheliale Venulen
Hex	<i>Hexose</i>
HexNAc	<i>N-Acetyl-Hexosamin</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
-HRP	<i>Horseradish peroxidase konjugiert</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
LacdiNAc	<i>N,N'-diacetyllactosediamine</i>
LAD	Leukozytenadhäsionsdefizienz
LB	<i>Liquid broth /Luria Bertani Medium</i>
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LE	Lektin- EGF
LECAM-1	<i>Leucocyte-endothelial cell adhesion molecule-1</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function associated antigen-1</i>
LNHR	<i>Lymph node homing receptor</i>

M	Mol pro Liter
MAC-1	<i>Macrophage antigen-1</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
Man	Mannose
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MBP	Mannose-Bindeprotein
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MD	<i>Molecular dynamics</i>
mg	Milligramm
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MPD	2-methyl-2,4-pentandiol
M _r	relatives Molekülgewicht
MSX	Methionin-Sulfoximin
mut	Mutiert
n. red.	nicht reduzierend
Sia	Sialinsäure
NF-κB	<i>Nuclear factor "kappa light chain enhancer" of activated B-cells</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
o. Abb.	ohne Abbildung
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
p.A.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PAS	Protein A Sepharose
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Base</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PKC	Proteinkinase C
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMN	Polymorphnukleäre Leukozyten
PNA _d	<i>Peripheral node addressin</i>
PNGase F	<i>Peptid: N-Glykosidase F</i>
-PO	Peroxidase-konjugiert
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
RCSB	<i>Research Collaboratory for structural bioinformatics</i>
red.	reduzierend

RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RU	<i>Resonance Units</i>
SCR	<i>Short consensus repeats</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SF9	<i>Spodoptera frugiperda 9</i>
sLea	<i>Sialyl Lewis a</i>
sLeX	<i>Sialyl Lewis X</i>
sL-Selectin	<i>soluble L-Selectin-lösliches L-Selektin</i>
sTyr/sLeX-PAA	<i>Tyrosinsulfat /sialyl Lewis X-Polyacrylamid</i>
T	Thrombin
TACE	<i>Tumor necrosis factor alpha converting enzyme</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA- Puffer</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBSCa	TBS- Puffer mit Calcium
TBST	TBS-Puffer mit <i>Tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TM	Tunicamycin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF	<i>Time-of-flight</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>Transformation and storage solution</i>
U	<i>Units</i>
Ü	Überstand
untransf.	untransfiziert
UV	Ultraviolett
VCAM-1	<i>Vascular adhesion molecule 1</i>
vgl.	Vergleiche
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i>
wt	wildtypisch
X-Gal	<i>5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid</i>
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast peptone dextrose medium</i>
z.B.	Zum Beispiel
Z/ml	Zellen pro Milliliter
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein 70 kDa</i>

Abstracts/Posterbeiträge

- 12/2003 International Symposium: Understanding Structure-Function Relationships in Membrane Integral Receptors
- 04/2004 Cellular Interactions in the immune system, Genf
S. Wedepohl, J. Dornedde and R. Tauber
"Expression and purification of L-selectin variants for structural analyses"
- 12/2004 Innovationsforum: Glykane-neuartige Basisstrukturen in Therapie und Diagnose
S. Wedepohl, J. Dornedde, M. Zimmermann-Kordmann and R. Tauber
"Entwicklung und Expression polyvalenter und glykanmodifizierter Selektin-Varianten"
- 03/2005 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Heidelberg
S. Wedepohl, J. Dornedde and R. Tauber
"The influence of N-glycans on L-selectin structure and function"
- 09/2005 Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Berlin
S. Wedepohl, J. Dornedde and R. Tauber
"Analysis of the N-glycosylation of L-selectin"
- 11/2005 The 2nd Glycan Forum Berlin
S. Wedepohl, J. Dornedde and R. Tauber
"Influence of N-glycans on L-selectin structure and function"
- 09/2006 SFB 449 Symposium, Berlin
J. Dornedde, S. Wedepohl, K. Kilian, W. Saenger, R. Tauber
"TP B9-Structural Aspects of L-selectin Function"
- 05/2007 The 3rd Glycan Forum Berlin
S. Wedepohl, J. Dornedde and R. Tauber
"Analysis of the influence of N-glycans on L-selectin function"
- 05/2008 The 4th Glycan Forum Berlin
S. Wedepohl, M. Kaup, V. Blanchard, J. Dornedde and R. Tauber:
"Analysis of the influence of N-glycans on L-selectin"
- 07/2009 15th European Carbohydrate Symposium, Wien
V. Blanchard, M. Kaup, S. Wedepohl, J. Dornedde, M. Berger and R. Tauber:
"Site-specific N-glycosylation of biologically active L-selectin"

Wedepohl, S.; Dornedde, J. and Tauber, R.

„The influence of N-glycans on L-selectin structure and function“
European Journal of Cell Biology, **84 Suppl. 55** (2005), 127

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all jenen Menschen bedanken, die mich dabei unterstützt haben, die vorliegende Dissertation zu erstellen und die beschriebenen Arbeiten durchzuführen.

Prof. Dr. Rudolf Tauber danke ich für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Erstgutachtens, seinen Einsatz für die Fortführung der Drittmittelprojekte, der Hilfe und Vorschläge für meine Dissertation und sein unerschütterliches Interesse an Allem, was L-Selektin und Glykane betrifft. Prof. Dr. Wolfram Saenger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, seinem Interesse an dem Thema und für die schnellen Lösungsvorschläge und Hilfen, wenn es mal nicht weiterging. Dr. rer. nat. Jens Dervedde danke ich für die Betreuung und Hilfe in unserem Labor und außerhalb, für das Lesen und Korrigieren jeglicher Texte und für den erfolgreichen Einsatz beim Schreiben von Drittmittelanträgen. Dr. rer. nat. Ardeschir Vahedi-Faridi danke ich für die Betreuung meiner Arbeiten in der Kristallographie, dafür, daß ich mit zum BESSY fahren durfte und für immer neue Vorschläge, Ideen und Hilfen. Weiterhin danke ich Claudia Alings für die Hilfe bei den Kristallisationsscreens. Traudy Wandersleben danke ich für die Hilfe bei der CD-Spektroskopie und den Methylierungsversuchen. Mein Dank geht auch an die anderen Arbeitsgruppenmitglieder in der Kristallographie für die Gastfreundschaft und die Hilfe bei der Bedienung der Geräte. Dr. rer. nat. Eckhard Nordhoff danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse des Proteinanteils von L-Selektin. Dr. rer. nat. Matthias Kaup danke ich für das Interesse an den Glykanen von L-Selektin und seinen Einsatz dafür, daß diese erfolgreich analysiert werden konnten, für die Durchführung einiger Glykananalysen und Diskussion der Ergebnisse. Dr. rer. nat. Véronique Blanchard danke ich für die große Hilfe bei der Aufnahme der Massenspektren und Exoglykosidase-Verdaus, sowie bei der Interpretation der Daten um die detaillierte Glykanstruktur von L-Selektin zu entschlüsseln. Weiterhin danke ich Dr. rer. nat. Markus Berger und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Glykoanalytik und Glykodesign für die Gastfreundschaft und die gute Atmosphäre im Labor und für das Interesse an den Ergebnissen und deren Diskussion. Nicht zuletzt sei meinen direkten Laborkollegen der AG Dervedde, Figen Beceren-Braun, Dr. rer. nat. Sven Enders und Sebastian Riese, sowie allen anderen Mitgliedern, ehemaligen Mitgliedern und Gästen der Arbeitsgruppen des ZLP am CBF gedankt, die mir stets Hilfe und Auskunft über ihr jeweiliges Spezialgebiet geboten haben, und die außerdem in Seminaren die Ergebnisse diskutierten und für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.