

**Charakterisierung der
L-Selektin–Ligand-Interaktion unter Fluss
mittels biochemischer Modifikation
und multivalenter Inhibitoren**

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
Sebastian Riese
aus Berlin

2012

Die praktischen Arbeiten wurden am
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie,
Charité – Universitätsmedizin Berlin
in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Dervedde / Univ.-Prof. Dr. R. Tauber angefertigt.

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Tauber
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
Charité – Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Haag
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin

Disputation am 17.10.2013

Der Verstand unterscheidet zwischen möglich und unmöglich.

Die Vernunft unterscheidet zwischen sinnvoll und sinnlos.

(...) Es ist Zeit, dass die Vernunft auf den Plan tritt,
um das was heute möglich ist, noch rechtzeitig
auf das Sinnvolle zu beschränken.

Max Born (1882–1970)

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Die Bedeutung der Selektin–Ligand-Interaktion	- 1 -
1.1.1	Die Adhäsionskaskade	- 2 -
1.1.2	Die Familie der Selektine	- 5 -
1.1.3	Liganden der Selektine und Inhibitoren der Selektin–Ligand-Bindung	- 8 -
1.1.4	Modulation der Selektin–Ligand-Interaktion	- 11 -
1.2	Zielsetzung	- 13 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 15 -
2.1	Material	- 15 -
2.1.1	Chemikalien und Lösungen	- 15 -
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	- 15 -
2.1.3	DNA-Aptamere	- 15 -
2.1.4	Dendritische Polyglycerolsulfate	- 16 -
2.1.5	Mannosamin-Vorläuferderivate	- 16 -
2.1.6	Zelllinien	- 16 -
2.2	Molekularbiologische Methoden	- 16 -
2.2.1	DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese	- 16 -
2.3	Chemische Methoden	- 17 -
2.3.1	Synthese der peracetylierten Mannosamin-Vorläuferderivate	- 17 -
2.4	Proteinbiochemische Methoden	- 19 -
2.4.1	Immunodetektion	- 19 -
2.4.2	Colorimetrischer Festphasenassay	- 20 -
2.4.3	Bestimmung der Sialinsäuren mittels Resorcinassay	- 21 -
2.5	Zellbiologische Methoden	- 22 -
2.5.1	Zellkultur	- 22 -
2.5.2	Biochemical glycoengineering	- 23 -
2.5.3	Durchflusscytometrische Analysen	- 24 -
2.5.4	Flusskammer-Assay	- 24 -

3	ERGEBNISSE	- 27 -
3.1	Etablierung des Flusskammer-Assays	- 27 -
3.2	Charakterisierung der Selektin–Ligand-Interaktion mittels <i>biochemical glycoengineering</i>	- 31 -
3.2.1	Beschreibung der verwendeten Mannosamin-Vorläuferderivate	- 31 -
3.2.2	Einfluss des <i>biochemical glycoengineering</i> auf PSGL-1 – zelluläre Interaktionsstudien mit P-Selektin	- 32 -
3.2.3	Einfluss des <i>biochemical glycoengineering</i> auf L-Selektin – zelluläre Interaktionsstudien mit PSGL-1	- 37 -
3.3	Charakterisierung der L-Selektin-Bindung von DNA-Aptameren	- 42 -
3.3.1	Beschreibung der verwendeten DNA-Aptamere	- 42 -
3.3.2	Bindung der DNA-Aptamere an L-Selektin	- 43 -
3.3.3	Inhibitionsstudien der L-Selektin–Ligand-Interaktion in Anwesenheit von DNA-Aptameren	- 43 -
3.4	Charakterisierung der L-Selektin–Ligand-Interaktion mittels dendritischer Polyglycerolsulfate	- 46 -
3.4.1	Beschreibung der verwendeten dendritischen Polyglycerolsulfaten	- 46 -
3.4.2	Inhibitionsstudien in Anwesenheit von dendritischen Polyglycerolsulfaten	- 47 -
3.5	Vergleich des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf die L-Selektin–Ligand-Interaktion	- 51 -
4	DISKUSSION	- 53 -
4.1	Modulation der Selektin–Ligand-Interaktion	- 53 -
4.1.1	Modifikation der Glykane von Selektinen und Liganden	- 53 -
4.1.2	Untersuchungen zur Inhibition der Funktion von L-Selektin durch dendritische Polyglycerolsulfate	- 57 -
4.1.3	Inhibition der L-Selektin-Funktion in Anwesenheit durch DNA-Aptamere	- 58 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 61 -
6	ABSTRACT	- 63 -
7	LITERATUR	- 65 -
8	ABKÜRZUNGEN	- 75 -
9	ANHANG	- 77 -

10	CURRICULUM VITAE	- 79 -
11	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	- 81 -
12	DANKSAGUNG	- 85 -

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Selektin–Ligand-Interaktion

Im Rahmen der Entzündungsreaktion (angeborene Immunreaktion), kommt es zum Auswandern (Extravasation) aktivierter Leukozyten aus dem Blutstrom in das entzündete Gewebe. Weiterhin migrieren kontinuierlich nicht-aktivierte Lymphozyten zwischen den verschiedenen sekundären lymphatischen Geweben, Blut und Lymphe. Letzteren Vorgang bezeichnet man als Rezirkulation bzw. als *homing* von Lymphozyten.

Sowohl bei der Entzündungsreaktion als auch beim lymphozytären *homing* ist diese gezielte Auswanderung von Leukozyten ins Gewebe ein gewünschter Prozess. Dagegen kommt es bei akut-entzündlichen Erkrankungen mit einer überschießenden Immunantwort und bei Autoimmunerkrankungen zu einem unkontrollierten Auswandern von Leukozyten in das betroffene Gewebe. Im Falle von Autoimmunerkrankungen (z.B. Morbus Crohn oder rheumatoide Arthritis) werden hierbei körpereigene Strukturen vom Immunsystem als fremd erkannt. Bei akut-entzündlichen oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen mit überschießender Immunantwort liegt die Ursache für das pathologisch gesteigerte Auswandern von Leukozyten bei übersteigenden Pathogenen / Noxen, wie z.B. Bakterien (Pneumonie) und Viren (Myokarditis) oder Toxine (chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, COPD) und entgleiste Enzyme (Pankreatitis). Dies ist darin begründet, dass die Entzündung auslösenden Noxen die Bandbreite der Regulation der Immunantwort überschreitet mit der Folge, dass die übersteigerte Auswanderung der Leukozyten nicht nur der Ausschaltung der Noxen dient, sondern zu einer zusätzlichen Gewebeschädigung führt.

Das Auswandern der Leukozyten aus der Blutbahn in Gewebe ist ein regulierter, stufenweise ablaufender Prozess, der in Form einer **Adhäsionskaskade** abläuft. An diesem Prozess sind zahlreiche Rezeptoren, ihre entsprechenden Liganden und Cytokine beteiligt [1, 2].

1.1.1 Die Adhäsionskaskade

Bei der Adhäsionskaskade der Leukozytenextravasation kommt es zu Wechselwirkungen von Leukozyten mit dem Endothel. Sie ist in sieben Stufen unterteilt: (i) den initialen Kontakt, (ii) das schnelle Rollen, (iii) das langsame Rollen, (iv) die feste Adhäsion, (v) die Verstärkung der Adhäsion und das Abflachen, (vi) das intravaskuläre Gleiten und (vii) die para- oder transzelluläre Migration der Leukozyten (Abb. 1).

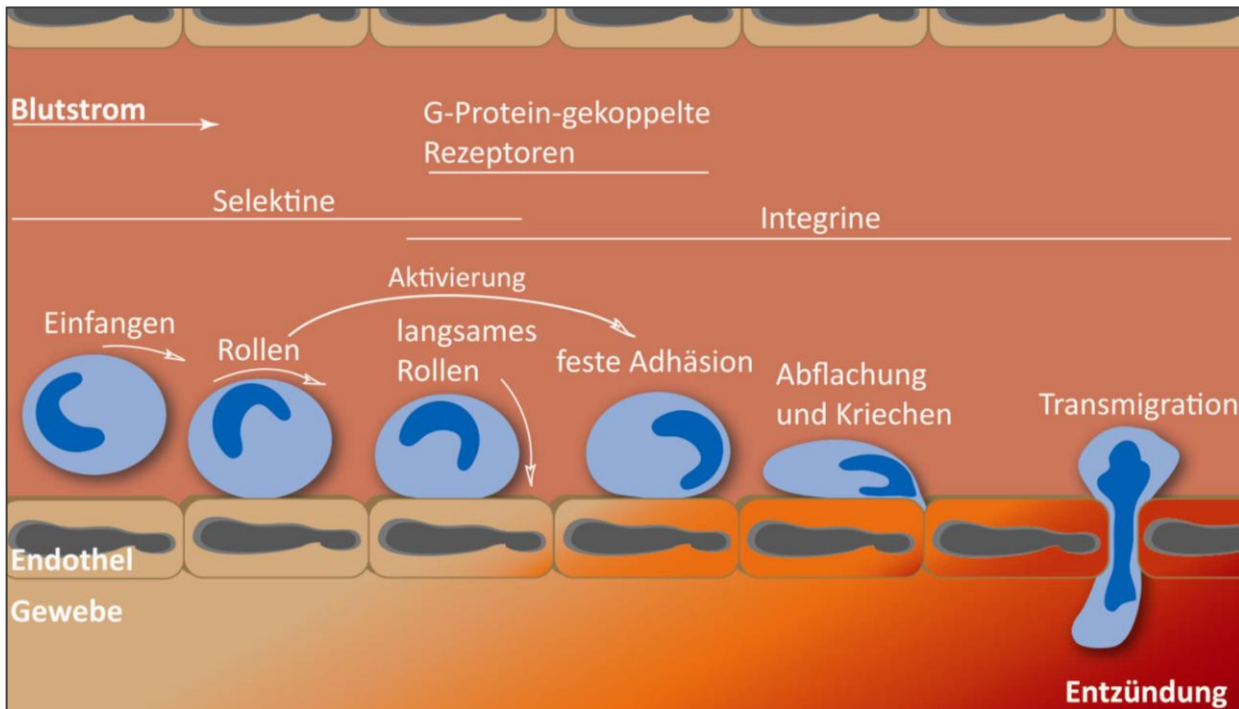


Abb. 1: Leukozytäre Adhäsionskaskade. Bei der Entzündungsreaktion kommt es zur Auswanderung von Leukozyten aus dem Blut in das betroffene Gewebe. Dieser Vorgang erfolgt über mehrere Schritte. Zuerst werden die Leukozyten verlangsamt und sie beginnen auf dem Endothel zu rollen. Nach Aktivierung kommt es zur festen Adhäsion und zur Abflachung der Zellen. Anschließend erfolgt der Durchtritt der Leukozyten durch das Endothel zum Entzündungsherd. Bei diesem Prozess sind u.a. Proteine aus der Familie der Selektine, der Integrine, ihre jeweiligen Liganden sowie G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Chemokine beteiligt [2].

Der initiale Kontakt (Abb. 2), also das Einfangen der Leukozyten aus dem Blutstrom, das schnelle und auch das langsame Rollen auf dem Endothel werden über Mitglieder der **Selektin-Familie** vermittelt. P- und E-Selektin werden von aktiviertem Gefäßendothel exprimiert und interagieren mit den Liganden P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (**PSGL-1**) [3, 4], E-Selektin Ligand-1 (ESL-1) [5], CD44 [6] und anderen Glykoproteinen auf der Oberfläche von Leukozyten (**Selektin-vermitteltes Rollen**). P-Selektin kommt außerdem auf aktivierten Thrombozyten vor. Der dritte Vertreter der Selektinfamilie, das L-Selektin, wird konstitutiv auf Leukozyten exprimiert und interagiert unter anderem mit CD34 [7], GlyCAM-1 [8], Podocalyxin [9] und Endomucin [10] auf

der Endotheloberfläche sowie ebenfalls mit PSGL-1 [11], welches sowohl auf Leukozyten als auch bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen auf Endothelzellen [12] vorkommen kann.

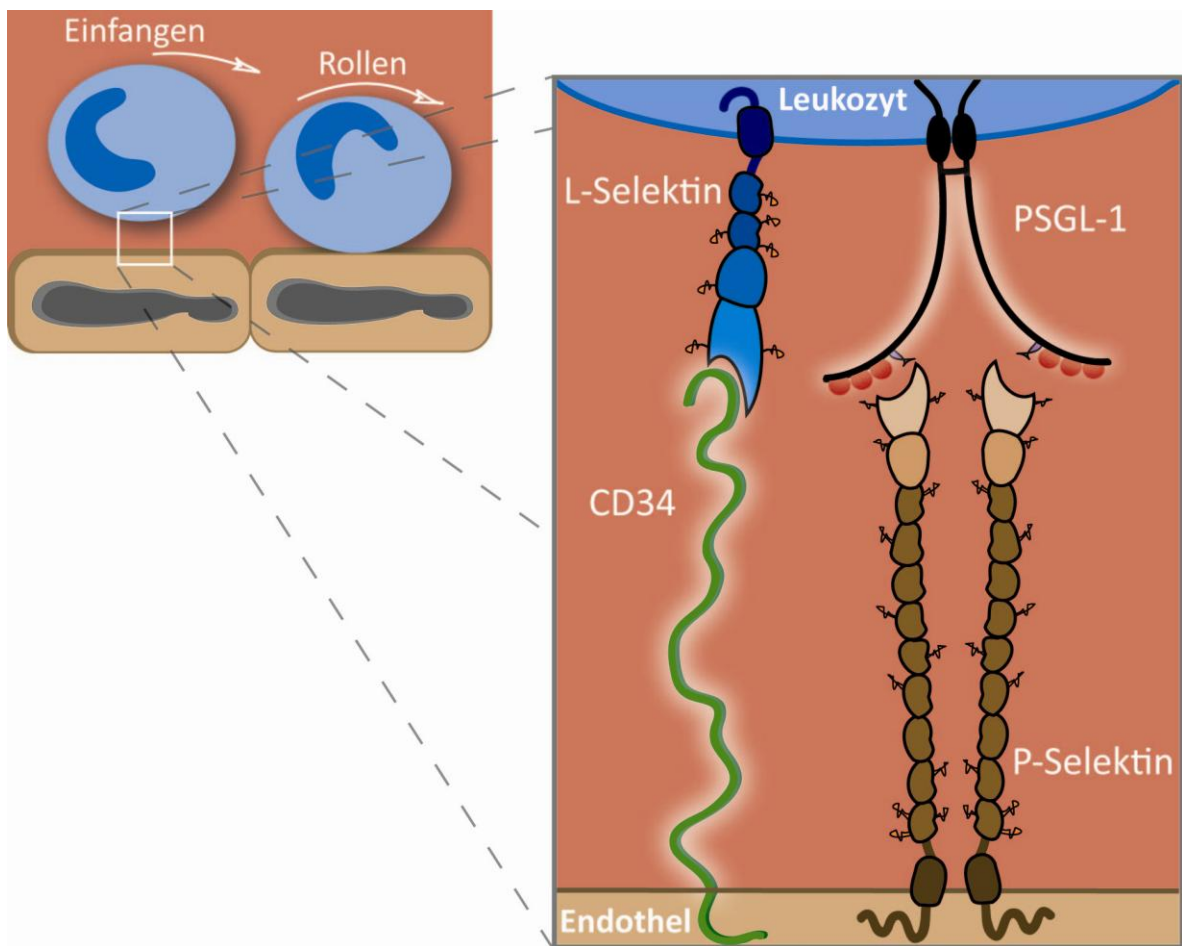


Abb. 2: Der initiale Kontakt. Das Einfangen der Leukozyten aus dem Blutstrom stellt den initialen Schritt der Adhäsionskaskade dar. Dabei binden die Mitglieder der Selektin-Familie an ihre Liganden. Die Selektine werden sowohl auf den Leukozyten (L-Selektin) als auch auf dem entzündeten Endothel (P- und E-Selektin) exprimiert.

Die Selektin-vermittelte Leukozyt-Endothel-Interaktion (Selektin-vermitteltes Rollen) führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, wodurch in Leukozyten Integrine aktiviert werden. Diese Integrinaktivierung wird unter anderem durch Kinasen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie die *spleen tyrosine kinase* (Syk) [13-15] sowie durch einen *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-abhängigen Signalweg [16], vermittelt. Nach Aktivierung der Leukozyten kommt es zu deren Polarisierung. Dabei bildet sich ein "vorderes Ende" (*leading edge*) sowie ein "hinteres Ende" (*rear edge*, Uropod) der Zellen und es kommt zur teilweisen Redistribution (Umverteilung) verschiedener leukozytärer Rezeptoren an den Uropod, darunter von L-Selektin und PSGL-1 [17-19]. Die Interaktion von L-Selektin mit PSGL-1 ist nicht auf das "Einfangen" der Leukozyten durch das Endothel, auf dem PSGL-1 bei bestimmten Erkrankungen

exprimiert wird, beschränkt. Vor allem werden in der Folge der Redistribuktion von L-selektin mittels L-Selektin–PSGL-1-Interaktion weitere Leukozyten durch bereits aktivierte Leukozyten rekrutiert (Abb. 3). Dadurch können zusätzliche Leukozyten aus dem Blutstrom eingefangen werden (*secondary tethering*) und es kommt zu einer verstärkten Akkumulation von Leukozyten am Entzündungsherd [20, 21] und damit zu einer Verstärkung der Immunantwort.

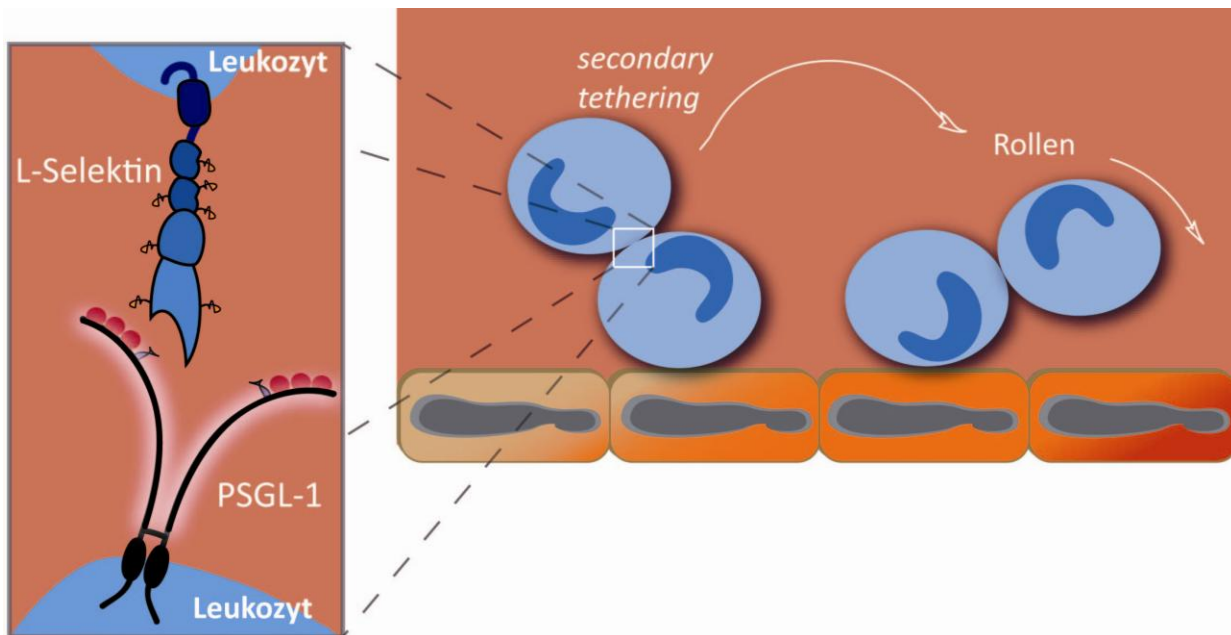


Abb. 3: Secondary tethering. Während der Adhäsionskaskade kommt es durch die Interaktion von L-Selektin mit PSGL-1 zum Einfangen weiterer Leukozyten durch bereits adhätierende Leukozyten. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Akkumulation und zu einem vermehrten Eintritt von Leukozyten in das entzündete Gewebe.

Neben dem Selektin-vermittelten Rollen kommt es nach der Aktivierung von Integrinen zu einem verlangsamten, Integrin-vermittelten Rollen. Hieran sind vor allem die Proteine *very late antigen-4* (VLA-4) [22-25] und *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1) [26, 27] mit ihren Liganden *vascular cell-adhesion molecule 1* (VCAM-1) [28, 29] und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) [30-32] aus der Superfamilie der Immunglobuline beteiligt. Durch Bindung der Integrine kommt es zur festen Adhäsion und zur Abflachung der Leukozyten. Das anschließende Gleiten / Wandern der Zellen auf dem Endothel wird unter anderem durch die Interaktion von *macrophage-1 antigen* (Mac-1) mit ICAM-1 [33-36] vermittelt.

Bei dem abschließendem Durchtritt der Leukozyten durch das Endothel (Diapedese) [37] spielen die Wechselwirkungen der lymphozytären Rezeptoren *platelet/endothelial-cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), LFA-1, VLA-4, Mac-1 und CD99 mit ihren Liganden PECAM-1, *junctional*

adhesion molecule (JAM), ICAM-2, CD99 und *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) eine wichtige Rolle [38-45].

Für den eigentlichen Durchtritt der Zellen durch das Endothel müssen die endothelialen Zell-Zellkontakte gelöst werden. Zum Einen wird das durch die Sekretion leukozytärer Proteasen, wie z.B. MMP-9 [46] und Gelatinase B [47], ermöglicht, auf der anderen Seite, kommt es durch die Aktivierung der ICAMs zu einer Induktion von endothelialen Signalkaskaden. Dies hat zur Folge, dass die Bindungen der an den Zell-Zellkontakten beteiligten Proteine gelöst und diese anschließend internalisiert werden [48-50], wodurch es den Leukozyten ermöglicht wird, durch das Endothel zu transmigrieren.

1.1.2 Die Familie der Selektine

Zur Familie der Selektine gehören drei Vertreter: das **L-Selektin** auf Leukozyten, das **P-Selektin** auf Thrombozyten (**Plättchen**) und dem Endothel sowie das **E-Selektin** auf dem Endothel [51]. Die Präsentation von P- und E-Selektin auf dem Endothel erfolgt erst im Entzündungsfall. P-Selektin wird konstitutiv gebildet, in nicht aktiviertem Endothel jedoch in intrazellulären Vesikeln, den *Weibel-Palade bodies*, gespeichert und nach Zellaktivierung, zum Beispiel durch den *tumor necrosis factor α* (TNF α), aus diesen Vesikel an die Zelloberfläche transportiert. Die Expression des E-Selektins im Entzündungsfall erfolgt zeitlich versetzt, da hierbei die Regulation der Expression auf Ebene der Transkription erfolgt.

Die drei Selektine sind Transmembranproteine vom Typ I und gehören zu den C-Typ Lektinen, die Ca²⁺-abhängig bestimmte Kohlenhydratstrukturen auf Glykoproteinen binden. Das Grundmotiv dieser Kohlenhydratstrukturen ist das sLe^x-Motiv (Abb. 4).

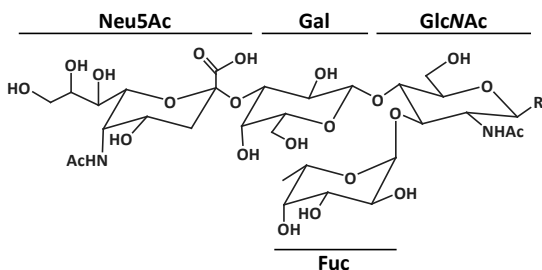


Abb. 4: Struktur des sLe^x-Motivs. Das Bindungsmotiv der drei Selektine besteht aus einer Neuraminsäure (Neu5Ac), einer Galaktose (Gal) und einem *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), an welchem noch eine Fucose (Fuc) verknüpft ist.

Die humanen Selektine weisen alle eine ähnliche Grundstruktur auf (Abb. 5): die extrazelluläre Domäne besteht N-terminal aus einer Lektindomäne, gefolgt von einer *epidermal growth factor* (EGF)-like Domäne und den sogenannten *short consensus repeats* (scr). Die Anzahl der *repeats*

ist auch ein strukturelles Unterscheidungsmerkmal der Selektine: L-Selektin besitzt zwei, E-Selektin sechs und P-Selektin neun *scr*. Daran schließt sich die Transmembrandomäne und ein cytoplasmatischer Abschnitt unterschiedlicher Länge an. Extrazellulär sind alle drei Selektine N-glykosyliert.

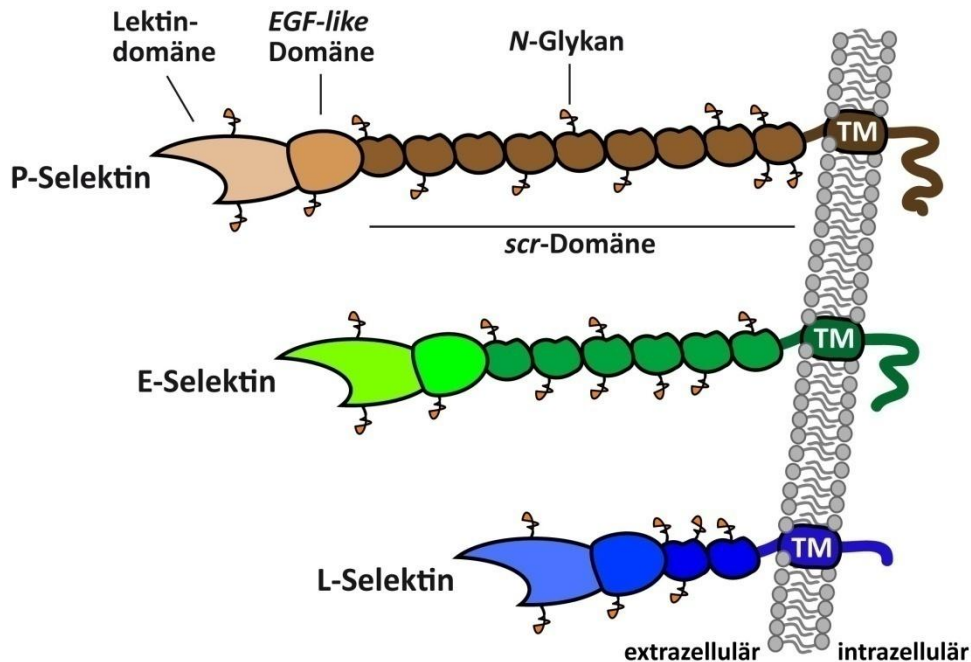


Abb. 5: Struktureller Aufbau humaner Selektine. Die humanen Selektine besitzen einen ähnlichen Aufbau: Sie tragen eine N-terminale Lektinbindungsdomäne, an die sich eine *EGF-like* Domäne anschließt, die von unterschiedlich vielen *scr*-Domänen gefolgt werden. Es folgen die Transmembrandomäne (TM) und der cytoplasmatische Anteil. Alle Selektine sind extrazellulär N-glykosyliert.

Alle Selektine erkennen mittels der Lektindomäne sLe^x als Ligand, wobei für monovalent-präsentiertes sLe^x die Bindungsaffinität jedoch gering ist [52] und einen K_d -Wert von 0.1 mM aufweist [53]. Der K_d -Wert zum natürlichen Liganden PSGL-1 liegt dagegen im niedrigen μ M-Bereich [54]. Eine Di- und Trimerisierung des sLe^x -Motivs zeigte eine moderate Steigerung der Bindungsaffinität um das 3–5fache [55, 56]. Durch eine Multimerisierung von sLe^x kann die Bindungsaffinität im Vergleich zur monovalenten Form weiter in den nanomolaren Bereich verschoben werden [57]. Eine Multimerisierung kann unter anderem durch Kopplung an Trägermoleküle erreicht werden. So wurden für Bindungsstudien sLe^x -Einheiten auf einem Polyacrylamid (PAA)-Trägerpolymer immobilisiert. Zusätzlich wurden in Nachbarschaft sulfatierte Tyrosine (sTyr) auf das Trägerpolymer gekoppelt. Dieses sogenannte sTyr/ sLe^x -PAA zeigt in Untersuchungen erfolgreich eine hohe Bindungsaffinität an Selektine [58]. Dabei konnte in einem kompetitiven Inhibitionsassay gezeigt werden, dass der Einsatz von monomerem sLe^x

zu keiner Inhibition der L-Selektin–Ligand-Interaktion führt, wohingegen durch die Kopplung von sLe^x an PAA (sLe^x-PAA) ein IC₅₀-Wert von 21 µM erreicht wurde. Die Verwendung von sTyr/sLe^x-PAA verbessert den IC₅₀-Wert in den nanomolaren Bereich (IC₅₀-Wert: 320 nM). Die zusätzlich verwendete Sulfatierung des Liganden ist bei der Bindung von L- und P-Selektin von entscheidender Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass aufgrund solcher Sulfatierungen des Liganden es zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität kommt. Im Unterschied dazu ist die E-Selektin–Ligand-Bindung unabhängig von der Sulfatierung des Liganden [54, 59]. Des Weiteren zeigen Gold-Kolloide, die mit Sulfaten funktionalisiert sind, eine gute Bindungsaffinität an L- und P-Selektin und weisen IC₅₀-Werte im picomolaren Bereich auf [60]. Die Steigerung der Bindungsaffinität der Selektine durch multimer-präsentierte Liganden zeigt *in vitro*, dass bei der Selektin–Ligand-Interaktion die **Multivalenz** eine entscheidende Rolle spielt. Dies wird auch *in vivo* beobachtet, wenn die Oberflächen des vaskulären Endothels mit der des Leukozyten wechselwirken. Hier wird die Bindungsstärke der Selektin–Ligand-Interaktion durch eine Clusterung der Bindungspartner auf der Zelloberfläche erhöht.

Die *EGF-like* Domäne und die *scr*-Domäne sind nicht primär an der Ligandenbindung beteiligt, besitzen aber unterstützenden Charakter. So wird die Bindungsaffinität der Selektine durch einen Austausch der *EGF-like* Domäne zwischen den Selektinen zwar nicht beeinflusst [61], eine Deletion dieser Domäne führt aber zu einer wesentlichen Reduktion der Bindungsaffinität [62]. Weiterführende Untersuchungen deuten daraufhin, dass die *EGF-like* Domäne einen Einfluss auf die richtige Konformation der Lektindomäne hat [63, 64]. Die Eliminierung einer Wasserstoffbrückenbindung in der *hinge*-Region zwischen der Lektin- und der *EGF-like* Domäne führt zu einer höheren Flexibilität der Lektindomäne und zu einer verbesserten Bindung von L-Selektin an seine Liganden bei geringeren Scherkräften [65]. Dabei wurde Asn138 in der *EGF-like* Domäne des L-Selektins durch Gly ersetzt, wodurch sich keine Wasserstoffbrückenbindung zum Tyr37 in der Lektindomäne ausbilden kann. Die Bedeutung der *scr* für die Bindung beschränkt sich wahrscheinlich darauf, das entsprechende Selektin auf der Zelle richtig zu präsentieren. Dadurch wird ein bestimmter Abstand der Lektinbindungsdomäne zur Zelloberfläche gewährleistet, um eine korrekte Wechselwirkung mit anderen Zellen zu ermöglichen [66]. Allerdings reicht ein *sc repeat* aus, um eine korrekte Konformation der Lektindomäne zu erhalten [62].

Das Einfangen der Leukozyten aus dem Blut und das anschließende Rollen, ist von der Fließgeschwindigkeit der Leukozyten im Blutstrom und damit vom *shear stress* innerhalb der Blutgefäße abhängig [67]. Untersuchungen unter Flussbedingungen zeigten, dass für das Einfangen, d.h. bei Ausbildung einer Selektin–Ligand-Bindung, ein bestimmter Schwellenwert überschritten werden muss. Wird dieser Schwellenwert unterschritten, lösen sich bereits rollenden Zellen von den Liganden wieder ab [68-70]. Das weist daraufhin, dass Scherkräfte einen starken Einfluss auf die **Selektin–Ligand-Interaktion** ausüben. Untersuchungen zur P-Selektin–PSGL-1-Bindung mittels *atomic force microscopy* zeigten, dass es durch eine kontinuierliche Erhöhung der Fließgeschwindigkeit erst zu einer Verlängerung der Lebenszeit der Bindung kommt und anschließend zu einer Verkürzung der Bindungslebenszeit [71]. Diese Besonderheit der Selektinbindung wird durch die Ausbildung von *catch bonds* (lange Lebenszeit) und *slip bonds* (kurze Lebenszeit) erklärt [72, 73].

Für eine optimale Zell-Zell-Wechselwirkung ist auch die korrekte Positionierung der Selektine auf der Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung. L-Selektin ist ausschließlich auf den Spitzen der Mikrovilli (Membranprotrusionen) von Leukozyten lokalisiert [74]. In Flusskammer-Experimenten, die *in vitro* die Bedingungen des Blutstroms simulieren, wurde mithilfe von chimären Proteinen gezeigt, dass diese Positionierung von L-Selektin auf Leukozyten essentiell für die Bindung an endotheliale Liganden ist [75, 76].

1.1.3 Liganden der Selektine und Inhibitoren der Selektin–Ligand-Bindung

PSGL-1 stellt vermutlich den physiologisch hauptsächlich genutzten Liganden dar und gilt damit als Hauptligand aller drei Selektine. PSGL-1 ist ein homodimeres, transmembranäres Glykoprotein (Abb. 6), wurde zuerst als Ligand von P-Selektin beschrieben [3, 77, 78] und erst später auch als Ligand von L-Selektin [79] und E-Selektin [54, 80] charakterisiert. Das N-terminale Bindungsepitop von PSGL-1 enthält ein sLe^x -Motiv, das von einem O-Glykan präsentiert wird [81] und benachbarte sulfatierte Tyrosinen auf dem Proteinerückgrat [82-84].

Für Untersuchungen der Bindung und für die gezielte Beeinflussung der Interaktion, wurden artifizielle Selektinliganden entwickelt. Sie umfassen Antikörper, **dendritische Polyglycerol-sulfate**, Substanzen aus der Gruppe der *small molecules* und spezifische **DNA-Aptamere**. Diese artifiziellen Liganden können als Kompetitor dazu verwendet werden, die Bindung der Selektine

an ihre natürlichen Liganden zu modulieren oder zu inhibieren und damit die Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe zu verhindern. Dies stellt eine therapeutische Strategie bei verschiedenen Krankheitsmodellen dar (1.1.4).

Zu den L-Selektin-spezifischen Antikörpern zählen DREG55, DREG56 und DREG200. Diese monoklonalen Antikörper, die direkt in die Lektindomäne binden und weitere Interaktionen mit anderen Liganden blockieren, werden deshalb auch als blockierende Antikörper bezeichnet [85].

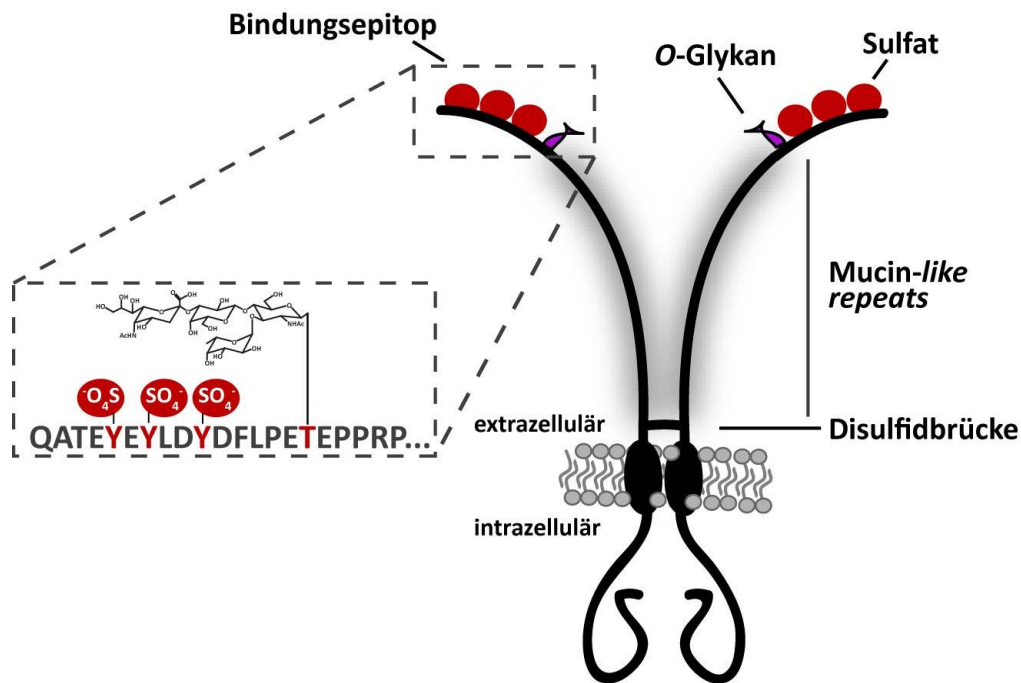


Abb. 6: Aufbau des Selektinliganden PSGL-1. PSGL-1 ist ein Transmembranprotein, welches als Homodimer auftritt. Es enthält mehrere Mucin-ähnliche Domänen, die hoch O-glykosyliert sind. In der N-terminalen Bindungsdomäne befinden sich das sLe^X-Motiv und sulfatierte Tyrosinreste (Kasten).

Zu den bekanntesten Vertretern der *small molecules* gehören Efomycin M und Bimosiamose. Efomycin M [86] ist ein sLe^X-Strukturmimetikum, welches zur Inhibition der Leukozyten-Extravasation eingesetzt wurde. Aufgereinigt wurde die Substanz aus Fermentationsmaterial von *Streptomyces BS1261*. Efomycin M besitzt eine zentrale Ringstruktur mit zwei Seitenketten, die für die Bindung an Selektine wichtig sind. Die für die Bindung an die Selektine relevanten Gruppen weisen dabei eine ähnliche Struktur wie das sLe^X auf. In *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Efomycin M in der Lage ist, das Rollen von Leukozyten zu inhibieren [86, 87]. Bimosiamose, das auch zu der Klasse der sLe^X-Mimetika zählt und somit die Selektin-Ligand-Interaktion inhibiert [88, 89], wird zurzeit in verschiedenen klinischen Untersuchungen [90-92] getestet (1.1.4). GM-1070 ist ein weiterer pan-Selektin-

Antagonist aus der Gruppe der *small molecules*, welcher in *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen die Leukozyten–Endothel-Interaktion erfolgreich inhibiert. Ein zusätzliches Anwendungsgebiet könnte der Einsatz bei der Sichelzellanämie sein [93].

Die dendritischen Polyglycerolsulfate (dPGS) sind hingegen polymere Makromoleküle. Sie leiten sich von den dendritischen Polyglycerolen (dPG) ab [94-96], nach Sulfatierung der Hydroxylgruppen erhält man das dPGS (Abb. 7). Ursprünglich synthetisiert als ein Heparin-Analogen, zeigte dPGS nur eine geringe Wirkung auf die Gerinnung, wurde jedoch als ein potenter Inhibitor des Komplementsystems identifiziert [97].

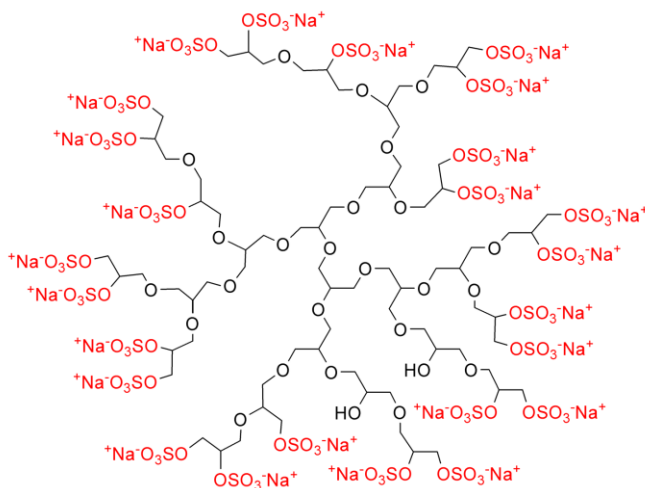


Abb. 7: Schematische Darstellung eines dendritischen Polyglycerolsulfats. In rot ist die hohe Funktionalisierung mit Sulfatgruppen und dem Gegenion Natrium dargestellt und schwarz zeigt das Polyglycerolgerüst (core).

Wie oben beschrieben ist die Bindung von L- und P-Selektin an ihre natürlichen Liganden auch von der Sulfatierung des Liganden abhängig. Diese Abhängigkeit widerspiegelnd erwiesen die Polyglycerolsulfate sich als ein sehr effektiver Inhibitor der Bindung dieser beiden Selektine an den künstlichen Liganden sTyr/sLe^x-PAA [98]. In Inhibitionsstudien zeigten sowohl Polyglycerole, die mit sulfatierten Galaktosen funktionalisiert wurden, als auch zuckerfreie dPGS-Derivate IC₅₀-Werte im nM Bereich. In einem Entzündungsmodell der Maus konnte weiterhin gezeigt werden, dass dPGS die Auswanderung der Leukozyten signifikant reduziert und die Komplementaktivierung deutlich hemmt [99].

Mittels der *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* (SELEX)-Technologie konnte ein Oligonukleotid bestehend aus 40 Basen charakterisiert werden, welches spezifisch an L-Selektin bindet, allerdings nicht an P- oder E-Selektin [100]. Dieses DNA-Aptamer (Abb. 8) zeigt Bindungsaffinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich und bindet L-Selektin sowohl unter

statischen als auch unter Flussbedingungen [101, 102]. Ein P-Selektin bindendes Aptamer wurde beschrieben, welches die Bindung aktivierter Thrombozyten an Neutrophilen blockiert [103].

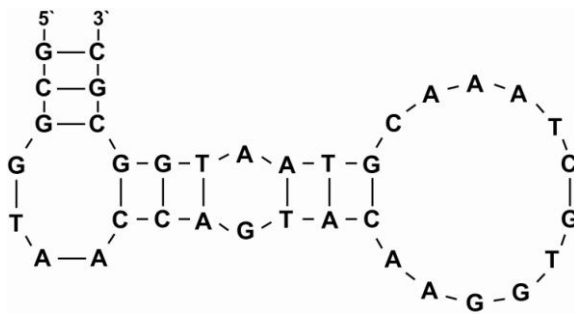


Abb. 8: Hypothetische Struktur des L-Selektin-Aptamers (nach Quickfold, M. Zucker). Die mögliche Struktur des L-Selektin-Aptamers weist drei Regionen ohne Basenpaarung auf, wobei zwei der Regionen über eine Stammregion, in der die dritte Region liegt, miteinander verbunden sind.

1.1.4 Modulation der Selektin–Ligand-Interaktion

Die Modulation der Adhäsionskaskade spielt in der Medizin eine wichtige Rolle. Zwar ist die Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe, wie z.B. bei einer Pneumonie, ein gewünschter Prozess, allerdings kommt es bei chronisch-entzündlichen Krankheiten zu einem unregulierten Austritt von Leukozyten in das entsprechende Gewebe. Dies ist z.B. bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Ischämie-Reperfusionsschäden, Multipler Sklerose, Psoriasis und verschiedenen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis der Fall. Um bei einer Therapie die unkontrollierte Extravasation der Leukozyten zu verhindern, stellen die Selektine einen guten Ansatzpunkt dar, da sie den initialen Schritt der Adhäsionskaskade vermitteln (1.1.1).

So konnte der monoklonale Antikörper PB1.3 als P-Selektin-Inhibitor identifiziert und in präklinischen Studien erfolgversprechend eingesetzt werden [104]. Auch der DREG200 Antikörper, der L-Selektin adressiert, wurde in präklinischen Untersuchungen mit Erfolg als Inhibitor verwendet [105].

Obwohl die Bindungsaffinitäten der *small molecule*-Inhibitoren Efomycin M und Bimosiamose nicht sehr hoch sind, sind diese beiden sLe^x-Mimetika von großem therapeutischen Interesse. Vor allem Bimosiamose erscheint als anti-inflammatorisches Medikament geeignet, da die präklinischen Daten bei seinem Einsatz gegen Asthma, Ischämie-Reperfusionsschäden und Psoriasis sehr erfolgversprechend sind [90]. Derzeit befindet sich Bimosiamose in der klinischen Untersuchung der Phase II mit den Indikationen Asthma und Psoriasis [92]. Laut der Firma Revotar ist die Phase IIa für das Bimosiamose gegenüber Asthma und COPD erfolgreich

abgeschlossen. Gegen *acute lung injury* (ALI) wurde die Phase I-Studie mittlerweile abgeschlossen.

Da die Selektin–Ligand-Interaktion unter anderem durch Kohlenhydratstrukturen (sLe^x) vermittelt wird, ist es möglich diese Interaktion durch Änderungen der Glykane zu modulieren. Das **biochemical glycoengineering** bietet dafür eine gute Möglichkeit. Dabei werden nicht-natürliche Monosaccharidbausteine bei der Zellkultivierung dem Zellkulturmedium zugesetzt (Supplementierung), die internalisiert und über die natürlichen Glykosylierungswege in die Glykanstruktur von Glykokonjugaten (Glykoproteine, -lipide) einbaut werden [106]. Bei den nicht-natürlichen Monosacchariden handelt es sich in der Regel um Derivate des *N*-Acetylmannosamins (ManNAc), der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), des *N*-Acetylglucosamins (GlcNAc), des *N*-Acetylgalaktosamins (GalNAc) und der Fucose (Fuc) [107-109]. Die Änderung der Glykanstruktur von Glykoproteinen hat vielfältige Auswirkungen: So konnte die Proliferation von neuronalen Zellen angeregt werden [110], die Proliferation, die IL-2 Ausschüttung und die Expression des IL-2- und Transferrin-Rezeptors bei T-Lymphozyten angeregt bzw. verstärkt werden [111] und das kontakt-abhängige Zellwachstum von Fibroblasten moduliert werden [112]. Es wurden auch bereits Untersuchungen zur Modulation der Selektin–Ligand-Interaktion mittels modifizierter L-Selektine durchgeführt. Dazu wurde L-Selektin in Gegenwart von Mannosamin-Vorläuferderivaten exprimiert. In Bindungsstudien wurde gezeigt, dass ein durch ManNAc-Supplementierung modifiziertes L-Selektin produziert wird, das schlechter an den künstlichen Minimalliganden sTyr/sLe^x-PAA bindet, als das nicht-modifizierte L-Selektin [113]. Weiterhin zeigte die ManNAc-bzw. ManNProp-Supplementierung von HL-60 Zellen, die endogen PSGL-1 exprimieren, dass diese Behandlung zu einer verbesserten Adhäsion der Zellen an P- und E-Selektin unter statischen Bedingungen führte [114]. Dabei änderte sich die Expression des PSGL-1 gegenüber Kontrollzellen nicht, allerdings beobachtete man eine starke Erhöhung des sLe^x-Motivs auf dem PSGL-1. Dies führte zu der Annahme, dass die Supplementierung zu einer Stimulation der Biosynthese des sLe^x-Motivs führt.

1.2 Zielsetzung

Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen kommt es zu einem permanenten Austritt von Leukozyten in das Zielgewebe, wodurch eine pathologische Entzündungsreaktion verstärkt wird. Im Rahmen solcher Erkrankungen ist es therapeutisch sinnvoll, regulierend in diese Leukozytenauswanderung einzugreifen. Einen möglichen Ansatzpunkt stellt der initiale Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel und damit die Interaktion der Selektine mit ihren Liganden dar. Daher war das Ziel dieser Arbeit, Methoden zu entwickeln und zu untersuchen, um die L-Selektin–Ligand-Interaktion zu modulieren.

Dabei sollten zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden. Erstens sollte untersucht werden, die L-Selektin-vermittelte Bindung von L-Selektin-exprimierenden Zellen an den natürlichen Liganden PSGL-1 mittels synthetischer Inhibitoren zu hemmen. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die multimere Präsentation von L-Selektinliganden von entscheidender Bedeutung für die Bindung an L-Selektin ist, sollten Inhibitoren untersucht werden, die das L-Selektin-Bindungs-epitop in unterschiedlicher Valenz tragen:

- ♦ verschiedene dendritische Polyglycerolsulfate, die sich in der Größe des Polyglycerolgerüsts und damit in der Anzahl der für die Bindung wichtigen funktionalisierten Sulfatreste unterscheiden; diese Substanzen stellen alle multivalente Vertreter dar.
- ♦ ein L-Selektin-DNA-Aptamer, das zum einen als Monomer zum anderen als eine dimerer Variante eingesetzt werden sollte; bei der dimeren Form sind die zwei Aptamere über einen einzelsträngigen Linker miteinander verküpft.

Zweitens sollte untersucht werden, ob mittels *biochemical glycoengineering* die Interaktion zwischen L- bzw. P-Selektin und dem natürlichen Liganden PSGL-1 verändert werden kann. Zur Modifikation der Glykanstrukturen sollten die peracetylierten Monosaccharid-Analoga *N*-Acetylmannosamin (peracMNAc), *N*-Propanoylmannosamin (peracMNProp) und *N*-Cyclopropylcarbonylmannosamin (peracMNCycloProp) als Substratanaloga (Abb. 20) eingesetzt werden. Diese drei Derivate unterscheiden sich in der Anzahl der C-Atome in ihrer Seitenkette. Das peracMNAc entspricht dem natürlichen MNAc, mit dem Unterschied der Peracetylierung, peracMNProp und peracMNCycloProp stellen Derivate dar, die drei bzw. vier C-Atome in ihrer Seitenkette tragen. Die Peracetylierung dient einer verbesserten zellulären Aufnahme [115]. Es

sollten zum einen L-Selektin-exprimierende Zellen mit diesen Analoga supplementiert werden, um den Einfluss der L-Selektin-Glykane auf die Interaktion mit PSGL-1 zu untersuchen. Außerdem sollten PSGL-1-exprimierende Zellen mit diesen Analoga supplementiert werden, um zu untersuchen, ob hierdurch das sLe^x-Motiv von PSGL-1 und damit die L-Selektin–PSGL-1-Interaktion verändert werden kann.

Da die Selektin-Ligandbindung unter physiologischen Bedingungen unter Fluss stattfindet, musste für die Bindungsstudien ein Flusskammer (FC)-Assay etabliert werden, der die Leukozyten–Ligand-Interaktion unter definierten Flussbedingungen simuliert. Dabei musste die Spezifität der Bindung zwischen den Zellen und den entsprechenden Liganden und unterschiedliche Ligandendichten beachtet werden.

2 Material und Methoden

Alle Reaktionen erfolgten bei Raumtemperatur. Abweichende Reaktionsbedingungen sind angegeben. Sämtliche in der Arbeit erhobenen Mittelwerte repräsentieren das arithmetische Mittel aller Messwerte.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Sämtliche Chemikalien wurden in *pro analysis*-Qualität von den Firmen Merck Millipore, Sigma-Aldrich bzw. Roth bezogen. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit ELIX-Wasser hergestellt. Dieses Wasser wird in einer ELIX-Wasseraufbereitungsanlage (Merck Millipore) produziert und hat einen Reinheitsgrad von Typ 2 bidestilliertem Wasser. Für die molekularbiologischen Arbeiten wurde zusätzlich MilliQ-Wasser (tridest. Wasser) verwendet. Dies wurde in einer MilliQ *biocell* A-10-Anlage (Merck Millipore) produziert.

Die für die Zellkulturarbeiten verwendeten sterilen Lösungen und Chemikalien wurden von den Firmen PAA Laboratories und Biochrom AG bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sarstedt AG & Co, Eppendorf AG und Becton Dickinson GmbH bezogen.

Sterile Plastikwaren für die Zellkultur wurden ausschließlich von Becton Dickinson und ibidi bezogen.

2.1.3 DNA-Aptamere

Das monomere L-Selektin-spezifische DNA-Aptamer sowie das dimere Aptamer wurden von der Firma Metabion synthetisiert (Konzentration: 0.1 mmol/l in Reinstwasser). Weiterhin wurden Aptamer-Varianten (Monomer und Dimer) verwendeten, welche am 5'-Ende mit Biotin gekoppelt waren (Metabion).

Sequenz des monomeren Aptamers: 5'-GCCAGTACAAGGTGCTAAACGTAATGGC-3'

Sequenz des Dimers: 5'-GCCAGTACAAGGTGCTAAACGTAATGGCAA
AAAAAAGCCAGTACAAGGTGCTAAACGTAAT
GGC-3'

2.1.4 Dendritische Polyglycerolsulfate

Die dendritischen Polyglycerolsulfate wurden von Dr. Marie Weinhart und Dominic Gröger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Haag (Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) synthetisiert und bereitgestellt.

2.1.5 Mannosamin-Vorläuferderivate

Das peracMNAc wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Reutter (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) bereitgestellt. Das peracMNProp und peracMNCycloProp wurden selbst synthetisiert (2.3).

2.1.6 Zelllinien

Die benutzten Zelllinien stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bzw. der *American Type Culture Collection* (ATCC).

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese

5 × TBE-Puffer: 54 g/l Tris, 27.5 g/l Borsäure, 3.7 g/l EDTA-Dinatrium-Dihydrat, pH 8.0

Ethidiumbromidstammlösung: 10 mg/ml in Wasser

6 × DNA-Ladepuffer: 300 ml/l Glycerol, 1 mg/l Xylene cyanol, 1 mg/l Bromphenolblau

Zur Visualisierung der DNA-Aptamere wurden 5 µl einer 1:2 verdünnten Aptamerlösung mit 1 µl 6 × DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 12%iges Polyacrylamidgel (2 ml 30 %iges Polyacrylamid, 1 ml 5 × TBE-Puffer, 1.97 ml H₂O, 35 µl APS, 2 µl TEMED) aufgetragen. Die

Elektrophorese wurde bei 50 V durchgeführt. Das Gel wurde in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV-Licht fotografiert.

Material	Geräte
GeneRuler Ultra Low DNA Ladder; Fermentas	Elektrophoresesystem <i>MGV-202</i> ; CBS
	Netzgerät <i>Power Pack 300</i> ; Bio-Rad
	Gel-Dokumentation <i>digit-store UNO</i> ; IVTAS

2.3 Chemische Methoden

2.3.1 Synthese der peracetylierten Mannosamin-Vorläuferderivate

a) Darstellung und Peracetylierung von *N*-Propanoyl-Mannosamin (MNPProp)

10 g Mannosaminhydrochlorid wurden in 140 ml Methanol bei 0 °C resuspendiert und über einen Tropftrichter 102 ml frisch hergestelltes Natriummethylat (1.26 mg elementares Natrium zu 110 ml Methanol) zugetropft. Anschließend wurden 7.14 ml Propionsäureanhydrid portionsweise bei 0 °C zugegeben und die Lösung für 2 h bei 0 °C unter Rühren inkubiert. In Abb. 9 ist der Reaktionsmechanismus dargestellt.

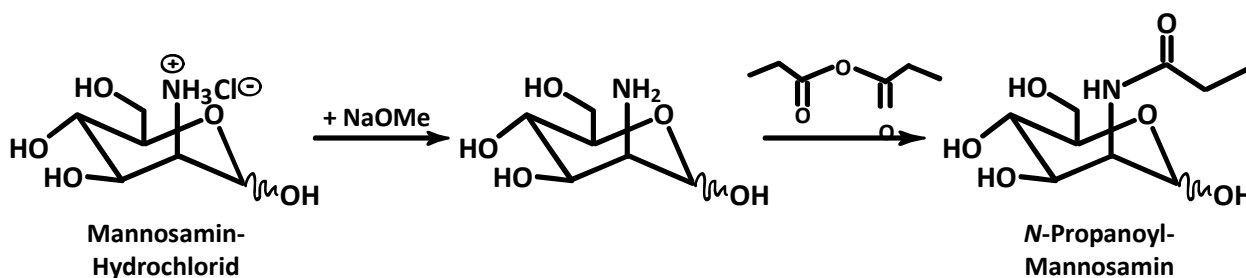


Abb. 9: Reaktionsmechanismus zur Darstellung von *N*-Propanoyl-Mannosamin. Die sehr starke Base Natriummethylat kann durch eine Säure-Base-Reaktion das Amin am Mannosamin-Hydrochlorid freisetzen. Durch eine nucleophile Substitutionsreaktion (S_N) des Amins am Carboxyl-Kohlenstoff des Propionsäureanhydrids wird das *N*-Propanoyl-Mannosamin gebildet.

Als Reaktionskontrolle wurde eine Dünnschichtchromatographie (DC) in Essigsäureethylester / Methanol (Verhältnis 5:2) durchgeführt (als Kontrolle diente das Edukt) und das Reaktionsgemisch anschließend im Rotationsverdampfer eingedunstet. Zur Reinigung wurde das Reaktionsgemisch in wenig Methanol und Wasser gelöst und mittels Säulenchromatographie gereinigt. Als Säulenmaterial wurden 300 g Kieselgel verwendet und als Laufmittel diente Essigsäureethylester / Methanol im Verhältnis 5:2. Es wurden 50 ml-Fractionen aufgefangen

und diese mittels DC auf das Vorhandensein von *N*-Propanoyl-Mannosamin (MNProp) untersucht.

Für die Peracetylierung wurden 5 g ManNProp in 50 ml Pyridin resuspendiert und portionsweise mit 16 ml Essigsäureanhydrid vermischt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Als Laufmittel wurde Hexan / Essigsäureethylester im Verhältnis 1:4 verwendet. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mehrfach mit Toluol im Rotationsverdampfer eingengt, bis das Pyridin möglichst vollständig abgezogen war. Zur weiteren Reinigung erfolgte eine Säulenchromatographie. Als Laufmittel wurde Hexan / Essigsäureethylester im Verhältnis 1:4 verwendet und die einzelnen Fraktionen (50 ml) wurden mittels DC analysiert. In Abb. 10 ist der Reaktionsmechanismus exemplarisch dargestellt.

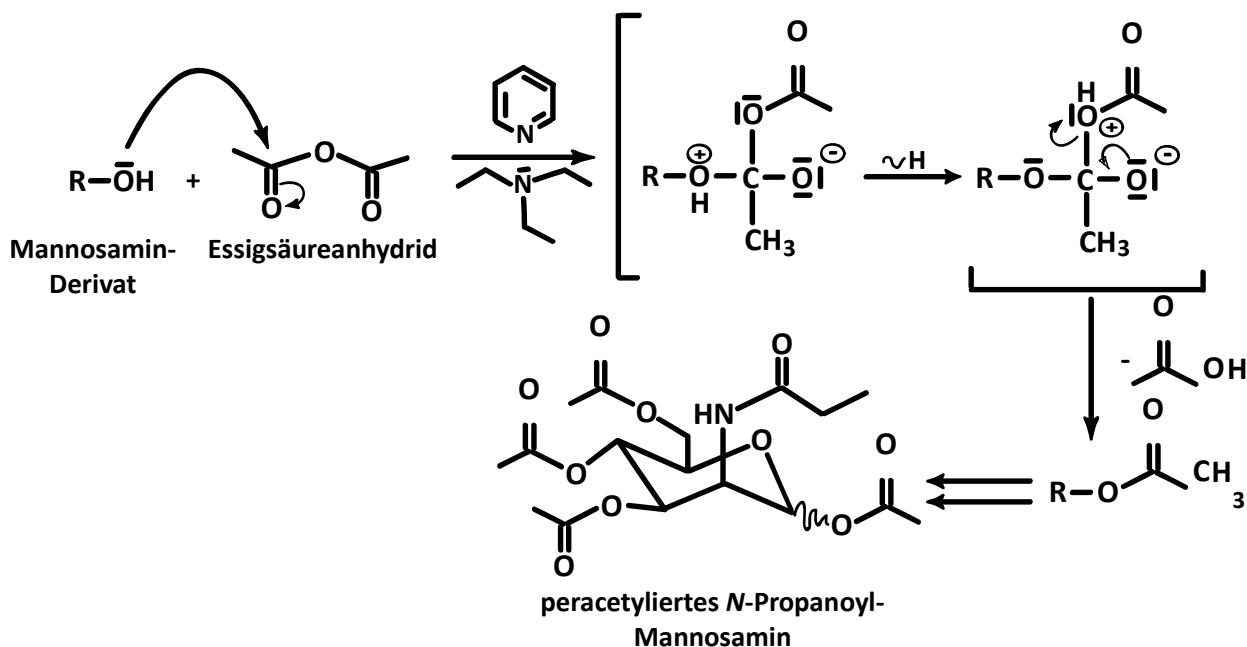


Abb. 10: Reaktionsmechanismus der Peracetylierung von ManNProp (peracMNProp). Die -OH-Gruppen des Mannosamin-Derivats reagieren mit überschüssigem Essigsäureanhydrid, unter Abspaltung von Essigsäure, in einer Acetylierungsreaktion zum peracetyliertem Mannosamin-Derivat.

b) Darstellung und Peracetylierung von *N*-Cyclopropylcarbonyl-Mannosamin (MNCycloProp)

21.5 g Mannosaminhydrochlorid wurden in einem ausgeheizten Kolben nacheinander mit 35 ml Triethanolamin und 11 g Cyclopropancarbonsäurechlorid in 550 ml trockenem Methanol gelöst. Nach erfolgter Reaktion wurden sowohl die flüchtigen Bestandteile als auch das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Dichlormethan / Methanol (Verhältnis

9:1) aufgeschlämmt und filtriert. Das Filtrat wurde eingengt und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Der Reaktionsmechanismus ist in Abb. 11 schematisch dargestellt.

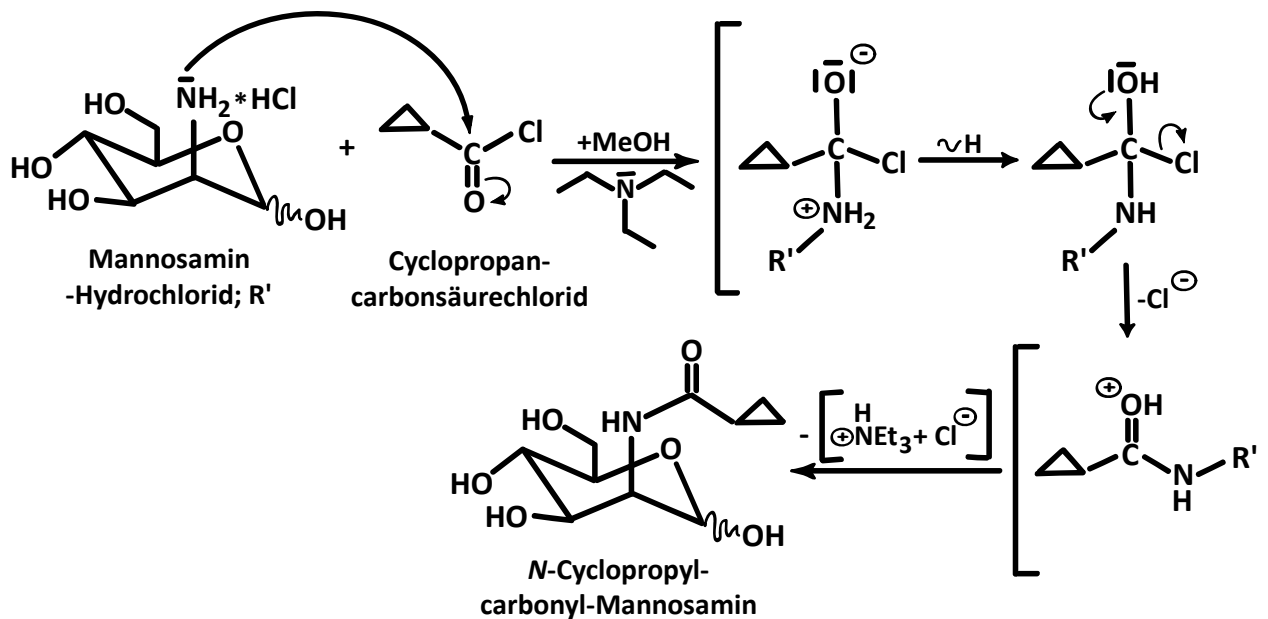


Abb. 11: Reaktionsmechanismus zur Darstellung von MNCycloProp. Hierbei handelt es sich um eine nucleophile Substitutionsreaktion (S_N), bei der der Stickstoff des Mannosamin-Hydrochlorids den Carboxyl-Kohlenstoff des Cyclopropan-carbonsäurechlorids angreift und eine Bindung ausbildet. Gleichzeitig wird das Chlorid entfernt und es entsteht das N-Cyclopropyl-carbonyl-Mannosamin.

Für die Peracetylierung wurden 11.34 g MNCycloProp in einem ausgeheizten Kolben nacheinander bei 0 °C mit 26.2 ml Essigsäureanhydrid und 64 ml Triethylamin in 200 ml trockenem Pyridin gelöst. Das Gemisch wurde über Nacht auf Raumtemperatur gebracht und anschließend auf Eiswasser gegossen und 3 × mit 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen wurden 2 × mit 25 ml einer gesättigten Kupfer(II)sulfatlösung und anschließend mit 25 ml Wasser gewaschen. Das Produkt wurde mit MgSO_4 getrocknet und danach aus Methanol / Diethylether umkristallisiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Immunodetektion

Blocklösung: 2 g/l BSA in $\text{PBS}^{+/+}$

TBST: 20 mM Tris / HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 ml/l Tween 20

Detektionsreagenz: Enhanced chemiluminescence-Westernblot-Detektionsreagenz

Zur Detektion des immobilisierten Liganden PSGL-1 in der Flusskammer (FC) wurde die Kammer für 30 min mit Blocklösung und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper in TBST inkubiert. Dreimaliges kurzes Spülen der Kammer mit TBST entfernte nicht-gebundene Antikörper. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper und erneutes dreimaliges Spülen. Zuletzt wurden 0.1 ml der beiden *Enhanced chemiluminescence*-Reagenzien (ECL) vermischt und 2 min in der Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Kammer im Dunkeln auf einen lichtempfindlichen Film gelegt und der Film abschließend entwickelt. Das Prinzip der Detektion beruht darauf, dass Luminol (im ECL) durch das Enzym *HRP* (am Sekundärantikörper gekoppelt) gespalten wird, wodurch Licht emittiert wird, welches als Schwärzung auf einem Röntgenfilm sichtbar wird. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper. ¹*HRP: horseradish peroxidase*

Antikörper	Klon	Typ	Organismus	Konzentration
anti-PSGL-1	KPL-1	monoklonal	Maus	0.05 mg/ml
anti-Maus-IgG- <i>HRP</i> ¹	-	polyklonal	Ziege	1 mg/ml

Material	Geräte
ECL-Reagenz; GE Healthcare	Entwicklermaschine <i>Optimax Typ TR</i> ; MS Laborgeräte

2.4.2 Colorimetrischer Festphasenassay

Immobilisierungspuffer:	50 mM Natriumcarbonat, pH 9.65
Blockierlösung:	2 g/l BSA in PBS ^{+/+}
Waschpuffer:	0.5 ml/l Tween 20 in HBSS Puffer
Stopplösung:	2 M Schwefelsäure
Färbereagenz:	40 mM Citratsäure-Monohydrat, pH 3.95, 0.02 % (v/v) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 0.01 % (v/v) Wasserstoffperoxid (frisch hergestellt)

Dieser Assay dient zur Bestimmung der Funktionalität der zwei verschiedenen Aptamer-Varianten (Monomer und Dimer).

Der Assay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei jedes *well* mit 100 µl L-Selektin/Fc (10 µg/ml) für 2 h beschichtet wurde. Zur Entfernung ungebundenen Liganden wurde die Platte

3 × mit Waschpuffer gewaschen (200 µl pro *well*) und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min mit Blockierlösung inkubiert (pro *well* 200 µl). Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen (3 ×) und mit den verschiedenen biotinylierten Aptamer-Varianten (1 µM) inkubiert (1 h). Abschließend wurde die Platte erneut gewaschen (3 ×), mit ExtrAvidin-Peroxidase für 30 min inkubiert (15 ng pro *well*), gewaschen (3 ×) und mit dem 100 µl Färbereagenz pro *well* versetzt. Das in dem Färbereagenz enthaltene Tetramethylbenzidin wird durch die Peroxidase gespalten, wodurch es zur Entwicklung eines blauen Farbstoffes kommt. Dabei ist zu beachten, dass die Zugabe der Färbelösung in die einzelnen *wells* in definierten Zeitabständen erfolgte. Die Entwicklung erfolgte nach Sicht und wurde durch Zugabe der Stopplösung beendet. Diese Zugabe erfolgte in den gleichen Zeitabständen. Das Auslesen erfolgte am Mikroplattenphotometer bei 450–490 nm.

Alle Inkubationsschritte wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Als Positivkontrolle diente der DREG55-Biotin Antikörper, welcher spezifisch an L-Selektin bindet, als Leerwert dienten Ansätze, die statt mit dem Aptamer nur mit Waschpuffer inkubiert wurden.

Material	Geräte
hL-Selektin / Fc Chimäre (laborintern)	Mikroplattenschüttler <i>Vibramax 100</i> ; Heidolph
ExtrAvidin-Peroxidase; Sigma	Mikroplatten-Photometer <i>Spectra MAX 340PC</i> ; Molecular Devices
MaxiSorp U16 Module; Thermo Scientific	

2.4.3 Bestimmung der Sialinsäuren mittels Resorcinassay

10 × Resorcinlösung:	60 g/l Resorcin
10 × Kupfersulfatlösung:	2.5 mM Kupfersulfat
Salzsäure:	280 ml/l HCl
PBS^{+/+}:	0.2 g/l Kaliumchlorid, 0.2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 8 g/l Natriumchlorid, 1.15 g/l di-Natriumhydrogenphosphat (wasserfrei), 0.132 g/l Calciumchlorid-Dihydrat, 0.1 g/l Magnesiumchlorid-Dihydrat
Färbereagenz:	100 ml/l 10 × Resorcin, 100 ml/l 10 × Kupfersulfat, 600 ml/l HCl (frisch hergestellt)

Dieser Assay dient der quantitativen Bestimmung von Sialinsäuren. Je nach Reaktionsbedingungen kann zwischen dem zellulären Gesamtgehalt und der im Glykokonjugat gebundenen Sialinsäuren unterschieden werden [116].

Um den Gesamtgehalt an Sialinsäuren von Zellen zu bestimmen, wurden 5×10^6 Zellen zentrifugiert (5 min, $140 \times g$), mit PBS^{+/+} gewaschen, rezentrifugiert und in 60 μ l PBS^{+/+} aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit 15 μ l 6 mM Periodsäure gemischt, für 20 min auf Eis inkubiert, mit 150 μ l des Färbereagens versetzt und für 15 min bei 99 °C inkubiert. Die Suspension wurde auf Eis abgekühlt, mit *tert*-Butanol vermischt und zentrifugiert (5 min, $20\,800 \times g$). Vom Überstand wurden 200 μ l in eine Mikrotiterplatte überführt, bei 620 nm im Mikroplattenphotometer vermessen und die Sialinsäurekonzentration anhand von mitgemessenen Sialinsäurestandards ermittelt. Der Leerwert, der keine Zellen enthielt, wurde als Negativkontrolle von den erhaltenen Werten abgezogen.

Um den Gehalt gebundener Sialinsäure in Glykokonjugaten zu ermitteln, wurde der Inkubationsschritt mit der Periodsäure bei 37 °C für 90 min durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wird das Signal der freien Sialinsäuren unterdrückt (gequencht). Ansonsten erfolgten sämtliche Schritte wie oben beschrieben.

Material

MaxiSorp U16 Module; Thermo Scientific

Geräte

Mikroplatten-Photometer *Spectra MAX 340PC*;
Molecular Devices

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte 3 \times in der Woche.

- ◆ **Jurkat T-Zellen**

Kulturmedium: RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10 ml/l Penicillin / Streptomycin, 100 ml/l *fetal calf serum*

Die Jurkat T-Zellen (*cell type: human T cell leukemia*) wurden zum Passagieren abzentrifugiert (5 min, $140 \times g$) und in frischem Kulturmedium aufgenommen.

Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in einer neuen Zellkulturflasche mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml neu ausgesät.

♦ **K562 LLL-Zellen und Nalm6 LLL-Zellen**

Kulturmedium: RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10 ml/l Penicillin / Streptomycin, 0.5 mg/ml G418, 100 ml/l *fetal calf serum*

Die K562 LLL-Zellen sind K562-Zellen (*cell type: human chronic myeloid leukemia in blast crisis*), die zusätzlich stabil L-Selektin exprimieren. Dies gilt entsprechend für die Nalm6 LLL-Zellen, welche von Nalm6-Zellen (*cell type: human B cell precursor leukemia*) abstammen. Beide transfizierten Zelllinien wurden laborintern generiert; die K562 LLL-Zelllinie stammt von Dr. K. Buscher und die entsprechenden Nalm6-Linie von Dr. C. Fieger. Zur Selektion wurde dem Kulturmedium G418 zugesetzt, um die Expression von L-Selektin aufrechtzuerhalten. Die Kultivierung erfolgte analog zu den Jurkat T-Zellen.

Material	Geräte
RPMI 1640 mit L-Glutamin; PAA <i>Fetal calf serum</i> ; Biochrom Penicillin / Streptomycin; PAA G418; Biochrom	Zentrifuge <i>Megafuge 2.0 R</i> ; Thermo Scientific Mikroskop <i>TELAVAL 31</i> ; Zeiss Brutschrank <i>Innova CO-170</i> ; Eppendorf Werkbank Herasafe HS12; Thermo Scientific

2.5.2 Biochemical glycoengineering

Für das *biochemical glycoengineering* wurden die zu behandelnden Zellen mit 0.5 mM eines Mannosamin-Vorläufers [117] im entsprechenden Zellkulturmedium versetzt und 65–72 h bei 37 °C inkubiert. Höhere Konzentrationen wirken toxisch auf die Zellen und geringere Konzentrationen weisen schlechtere Einbauraten der modifizierten Neuraminsäuren auf. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der peracetylierten Mannosamin-Vorläufer wurden diese zu 100 % in Dimethylsulfoxid gelöst.

Material	Geräte
RPMI 1640 mit L-Glutamin; PAA peracMNAc; peracMNProp; peracMNCycloProp; Dimethylsulfoxid; VWR	Mikroskop <i>TELAVAL 31</i> ; Zeiss Brutschrank <i>Innova CO-170</i> ; Eppendorf

2.5.3 Durchflusscytometrische Analysen

Block- und Waschlösung: 50 ml/l *fetal calf serum* in PBS^{+/+}

Für die Analysen wurden 1×10^6 Zellen abzentrifugiert (5 min, $140 \times g$, 4°C), zweimal mit Blocklösung zur Vermeidung unspezifischer Proteinwechselwirkungen gewaschen und anschließend für 30 min auf Eis mit 200 μl einer entsprechenden Antikörperlösung (Tab. 2) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal gewaschen (zum Entfernen nicht gebundener Antikörper) und zur Messung in 800 μl Blockierlösung aufgenommen. Zur Analyse am Durchflusscytometer wurden immer 10.000 *events* (Ereignisse) bei einer Wellenlänge von 575 nm gezählt. Als Negativkontrolle fungierten Zellen, die mit der entsprechenden Isotypkontrolle angefärbt wurden.

Tab. 2: Zur Durchflusscytometrie verwendete Antikörper. Alle Antikörper sind PE markiert.

Antikörper	Klon	Typ	Organismus	Konzentration	Verdünnung	Fluorophor
anti-CD162	KPL1	monoklonal	Maus	0.5 mg/ml	1:10	PE
anti-CD62L	DREG56	monoklonal	Maus	0.5 mg/ml	1:10	PE
anti-IgG1, kappa	MOPC-21	monoklonal	Maus	0.5 mg/ml	1:10	PE

Material	Geräte
Polystyren Reagenzglas mit Rundboden 12 \times 75 mm; Becton Dickinson	Durchflusscytometer <i>Coulter Epics X</i> ; Beckman Coulter
verwendete Antikörper; Becton Dickinson	Zentrifuge <i>Megafuge 2.0 R</i> ; Thermo Scientific

2.5.4 Flusskammer-Assay

Blocklösung: 2 g/l BSA in PBS^{+/+}

Wasch- und Laufpuffer: HBSS-Puffer

Die Flusskammer (FC; Abb. 12) wurde zur Beschichtung 2 h mit 30 μl Ligandlösung (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PSGL-1/Fc oder 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ P-Selektin/Fc in PBS) inkubiert. Anschließend erfolgte die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen in der Kammer durch die Blocklösung. Dazu wurden die beiden Reservoirs mit 60 μl der Blocklösung befüllt und anschließend die FC bei paralleler Zugabe und Entnahme mit 200 μl der Blocklösung gespült. Dieser Vorgang wurde wiederholt und die FC danach für 30 min inkubiert. Abschließend musste ein Trockenlaufen der FC sowie Luftblasen in der FC unbedingt vermieden werden.

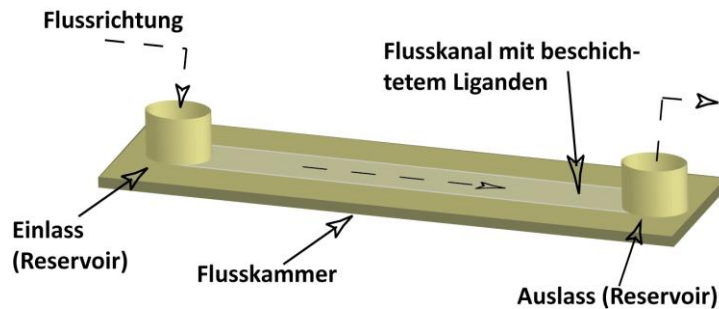


Abb. 12: Schematischer Aufbau der verwendeten Flusskammer (FC). Das Befüllen des Kanals erfolgt über die Reservoirs der FC. Zuerst wurde die Kammer mit $30\ \mu\text{l}$ gereinigtem Liganden beschichtet, anschließend erfolgt die Blockierung mit BSA bei gleichzeitiger Zugabe und Entnahme der Flüssigkeit.

Die FC wurde im Lichtkanal eines inversen Mikroskopes platziert, mit $\text{PBS}^{+/+}$ gespülten Schläuchen an eine Pumpe angeschlossen (Abb. 13) und anschließend das gesamte System zur Äquilibration mit $\text{PBS}^{+/+}$ gespült.

Für die FC-Experimente wurden 3×10^6 Zellen zentrifugiert (5 min, $140 \times g$), in 3 ml vorgewärmtem HBSS Puffer (1×10^6 Zellen/ml) resuspendiert, in eine Spritze überführt, diese an die Pumpe angeschlossen und die Zellen bei einer definierten Flussrate (proportional zum *shear stress*) 2 min zur Systemäquilibration durch die FC gespült. Anschließend erfolgten Aufnahmen der rollenden Zellen für 1 min bei 10facher Vergrößerung mittels einer Digitalkamera. Die Dimensionen des Bildausschnitts betragen $800 \times 600\ \mu\text{m}$. Mit Hilfe des Programms MatLab konnten die aufgenommenen Zellen hinsichtlich Durchflussdichte (Flux) und Geschwindigkeit (*velocity*) untersucht werden. Der Flux steht für die Anzahl der rollenden Zellen, die innerhalb eines bestimmten Zeitraums über eine willkürlich gesetzte Linie orthogonal zur Flussrichtung laufen, wobei man von "Rollen" erst spricht, wenn die Zelle ein gleichmäßiges Rollen über mindestens 1 s aufweist. Die *velocity* steht für die Durchschnittsgeschwindigkeit einer gleichmäßig rollenden Zelle.

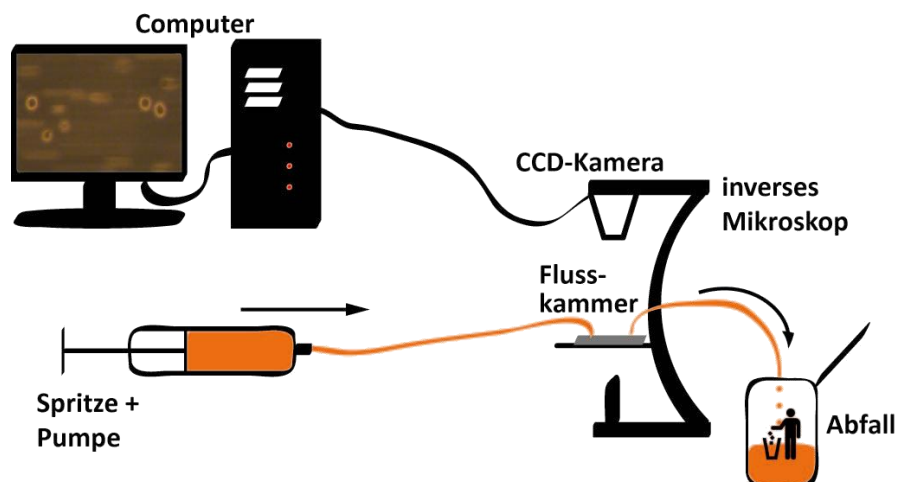


Abb. 13: Apparativer Aufbau der FC-Experimente. Die Zellen werden mit einer Pumpe durch die FC gespült. Mittels CCD-Kamera und Computer können dann von den rollenden Zellen Videoaufnahmen gemacht werden.

Als Negativkontrolle dienten Ansätze, bei denen die Zellen mit blockierendem Antikörper (Tab. 3) versetzt wurden. Dazu wurden Zellen in 300 µl HBSS Puffer aufgenommen, mit 10 µg/ml Antikörper inkubiert (10 min, 37 °C, 5 % CO₂) und für die FC-Experimente in 3 ml HBSS Puffer resuspendiert.

Die Inkubationen mit den dentritischen Polyglycerolsulfaten und den Aptameren erfolgten analog zu den Antikörperinkubationen.

Tab. 3: In der FC verwendete blockierende Antikörper

Antikörper	Klon	Typ	Organismus	Konzentration	Verdünnung
anti-CD162	KPL1	monoklonal	Maus	0.5 mg/ml	1:50
anti-CD62L	DREG55	monoklonal	Maus	1 mg/ml	1:100

Material

Flusskammer µ-Slide VI unbeschichtet; ibidi
 Einmalspritze (steril) 5 ml; Becton Dickinson
 hPSGL-1 / Fc Chimäre; R&D Systems
 hP-Selektin / Fc Chimäre; R&D Systems
 HBSS Puffer; PAA
 MATLAB *snake model tracking algorithm*

Geräte

Inverses Mikroskop *IM*; Zeiss
 Spritzenpumpe *KDS 101*; KD Scientific
 Digitalkamera *AxioCam MRc*; Zeiss
 Brutschrank *Innova CO-170*; Eppendorf
 Zentrifuge *Megafuge 2.0 R*; Thermo Scientific

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des Flusskammer-Assays

Die Flusskammer (FC) stellt eine gute Möglichkeit dar, das Rollen von leukozytären Zellen über aktivierten Endothelzellen oder gereinigten Liganden zu untersuchen. Im Rahmen der Etablierung der FC-Experimente wurde zum einen die Spezifität der Interaktion von L-Selektin-exprimierenden Zellen (K562 LLL) mit dem natürlichen Liganden PSGL-1 [118] untersucht und zum anderen der Einfluss der Dichte des verwendeten Liganden auf der Oberfläche der FC auf das Rollen der Zellen bestimmt.

Mittels Immunodetektion (2.4.1) wurde des immobilisierte Ligand PSGL-1 als auch seine Verteilung in Abhängigkeit der Konzentration innerhalb der FC analysiert (Abb. 14).

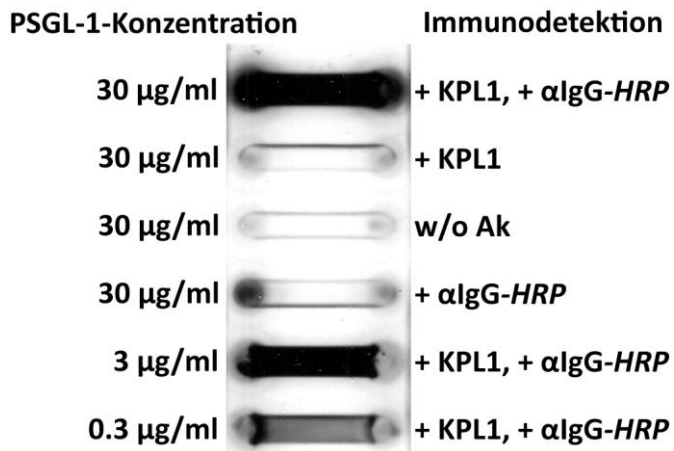


Abb. 14: Immunodetektion von PSGL-1 in der FC. Dargestellt sind sechs Kammern mit der jeweiligen verwendeten PSGL-1-Konzentration (*links*) und den Detektionsantikörpern (*rechts*, Primärantikörper KPL1 gegen PSGL-1 und Sekundärantikörper αIgG-HRP).

Der immobilisierte Ligand PSGL-1 konnte erfolgreich konzentrationsabhängig in der FC nachgewiesen werden. Die Spezifität des Nachweises von PSGL-1 ist durch die Kontrollen nur 1. Antikörper (+ KPL1), nur 2. Antikörper (+ αIgG-HRP) und kein Antikörper (w/o Ak) gezeigt. Von besonderem Interesse ist der Nachweis der regelmäßigen Verteilung von PSGL-1 innerhalb der FC auch bei geringeren PSGL-1 Konzentrationen.

Die Interaktion von L-Selektin mit PSGL-1 wurde in einem *shear stress* Bereich zwischen 0.6 dynes/cm² und 2.3 dynes/cm² beschrieben [119]. Daher wurden sämtliche FC-Experimente bei einer konstanten Flussrate von 0.57 ml/min durchgeführt, was 1 dynes/cm² in der

verwendeten FC entspricht. Der *shear stress* ist eine Funktion aus Flussrate und Kammerbreite und bleibt daher in diesem Fall konstant (näheres siehe Anhang).

Um den Einfluss der Ligandendichte auf das Rollverhalten zu untersuchen, wurden FCs mit unterschiedlichen Konzentrationen an PSGL-1 beschichtet, K562 LLL-Zellen durch die FC gepumpt und anschließend der Flux (Abb. 15) und die Geschwindigkeit der Zellen (Abb. 16) bestimmt.

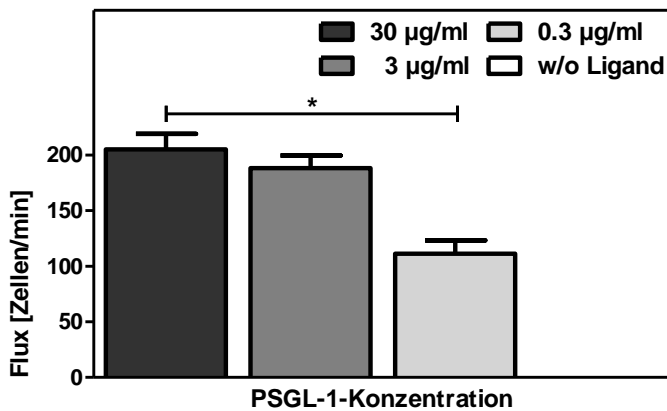


Abb. 15: Flux der K562 LLL-Zellen in Abhängigkeit von der Ligandendichte. Vergleich des Flux der rollenden Zellen über unterschiedliche Konzentrationen des beschichteten Liganden PSGL-1. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (arithmetisches Mittel aller Messwerte, 2.5.4) aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. *, $p = 0.0284$ (paired t test).

Das Rollen der Zellen ist auf eine Interaktion zwischen dem zellulär exprimierten L-Selektin und dem Liganden PSGL-1 auf der Oberfläche der FC zurückzuführen, da der Flux konzentrationsabhängig ist. Bei Verwendung einer Ligandenkonzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ erkennt man eine geringfügige Abnahme des Flux gegenüber einer Ligandenkonzentration von $30 \mu\text{g/ml}$. Diese Abnahme wird deutlicher, je weiter man die für die Immobilisierung eingesetzte Ligandenkonzentration verringert. Lässt man die Zellen über $0.3 \mu\text{g/ml}$ PSGL-1 rollen, kommt es zu einer signifikanten Änderung im Flux gegenüber $30 \mu\text{g/ml}$ (p -Wert = 0.0284). Der Assay zeigt weiterhin, dass bei allen drei Konzentrationen stabile Messwerte generiert werden können und somit eine niedrigere Konzentration an Ligand ausreichend zur Durchführung wäre.

Die Durchschnittsgeschwindigkeit der rollenden Zellen in Abhängigkeit von der Ligandendichte (Abb. 16A) zeigt, dass es zwischen $30 \mu\text{g/ml}$ und $3 \mu\text{g/ml}$ PSGL-1 zu einer signifikanten Erhöhung der Rollgeschwindigkeit kommt (p -Wert < 0.0001), was den Erwartungen entspricht. Eine weitere Erniedrigung der PSGL-1-Konzentration auf $0.3 \mu\text{g/ml}$ führt zu einer noch deutlicheren Geschwindigkeitserhöhung. Die Darstellung des kumulativen Rollverhaltens (Abb. 16B) verdeutlicht, dass die Erniedrigung der PSGL-1-Konzentration zwar zu einer Geschwindigkeitserhöhung führt (Rechtsverschiebung der Kurven), aber die Verteilung zwischen langsameren

und schnelleren K562 LLL-Zellen nahezu unverändert bleibt (Steigung der Kurven). Die kumulative Darstellung ermöglicht weiterhin eine statistische Auswertung nach *mean*, *median* sowie maximaler und minimaler Geschwindigkeit.

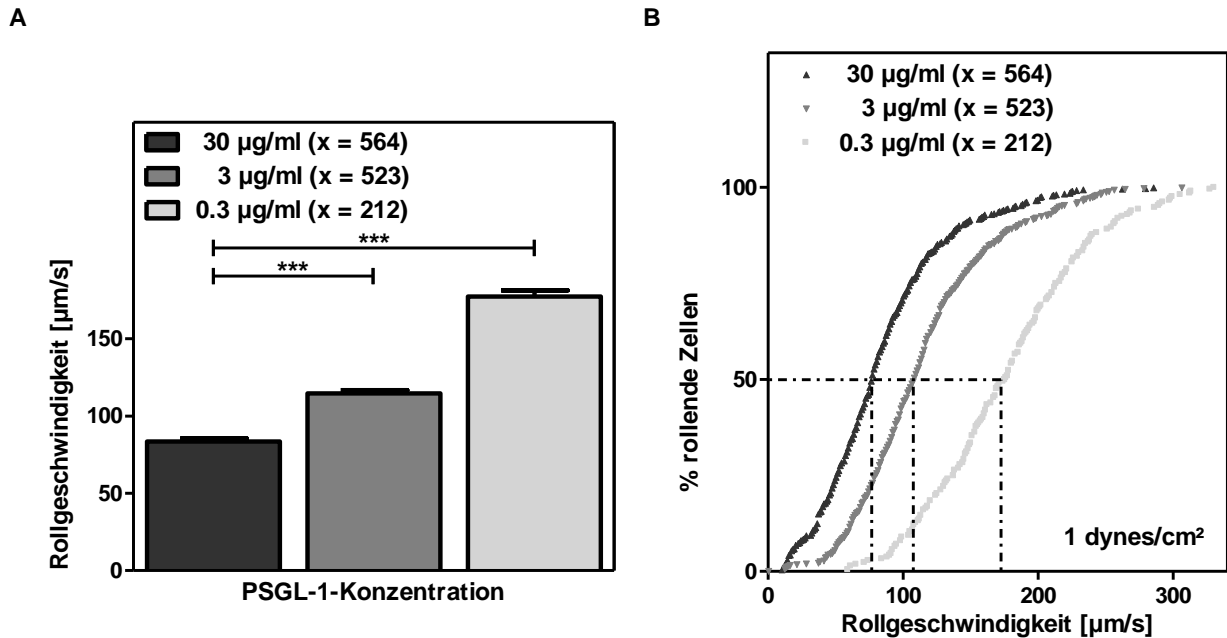


Abb. 16: Bestimmung der Rollgeschwindigkeit der K562 LLL-Zellen in Abhängigkeit von der Ligandendichte. A, Vergleich der Durchschnittsgeschwindigkeit der rollenden Zellen bei Verwendung verschiedener Konzentrationen an beschichtetem PSGL-1. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. *******, $p < 0.0001$ (paired *t* test), *x* steht für die Anzahl der analysierten Zellen. **B,** Kumulatives Histogramm der Rollgeschwindigkeit bei 1 dynes/cm^2 in Abhängigkeit von der Ligandendichte.

Weiterhin wurde untersucht, ob das Rollen der Zellen auf die spezifische Interaktion von L-Selektin mit dem Liganden PSGL-1 zurückzuführen ist. Dazu wurden die K562 LLL-Zellen mit dem blockierenden Antikörper DREG55 [85] inkubiert, der in der Bindungsdomäne von L-Selektin bindet, diese blockiert und somit eine Bindung von L-Selektin an einen entsprechenden Liganden verhindert (Abb. 17).

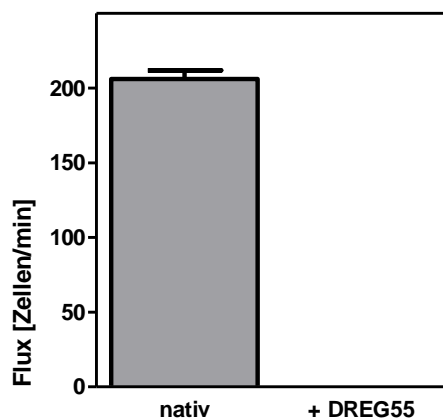


Abb. 17: Blockierung der Interaktion zwischen L-Selektin-exprimierenden Zellen und PSGL-1 mittels DREG55. Flux von unbehandelt K562 LLL-Zellen und von K562 LLL-Zellen, die für 10 min mit $10 \mu\text{g/ml}$ DREG55 vorinkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 5$ unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

Das Rollen der Zellen über den Liganden PSGL-1 zeigt sich eindeutig L-Selektin-abhängig, da nach der Vorbehandlung mit DREG55 keine rollenden Zellen detektiert wurden. Die Bestimmung des Flux der unbehandelten Zellen ergab einen Mittelwert von 206 rollenden Zellen pro min.

Abb. 18 zeigt eine überlagerte Aufnahme zum Zeitpunkt t und $t + 1$ s der Zellen innerhalb der FC. Während nicht-interagierende, also fließende Zellen nur als Streifen zu sehen sind, sind die rollenden Zellen aufgrund ihrer langsameren Geschwindigkeit klar zu erkennen. Dieselbe Zelle zum Zeitpunkt t bzw. $t + 1$ s ist durch einen schwarzen Kasten gekennzeichnet.

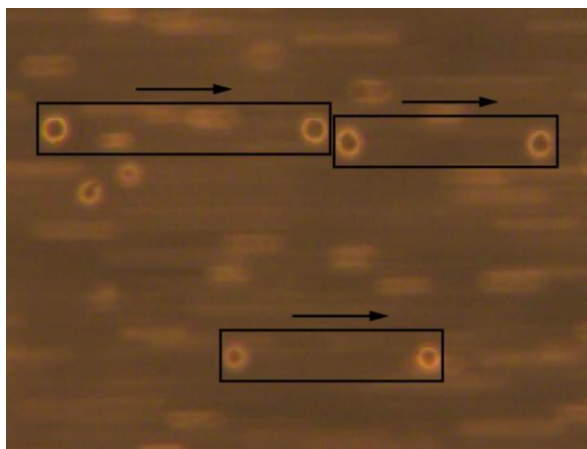


Abb. 18: Ausschnitt einer FC-Aufnahme. Zu sehen ist eine überlagerte Aufnahme von Zellen in der FC zum Zeitpunkt t und $t + 1$ s. Der Pfeil zeigt die Flussrichtung an. Der Kasten zeigt dieselbe Zelle zu den zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Nicht-interagierende Zellen sind als Streifen zu erkennen.

Während die ermittelte Durchschnittsgeschwindigkeit einer Zellpopulation eine sehr einheitliche Geschwindigkeit aufweist (Abb. 16A), zeigt das Geschwindigkeitsprofil einzelner Zellen innerhalb einer Population, dass sich die Geschwindigkeiten sehr stark voneinander unterscheiden. Abb. 19 zeigt ein entsprechendes hochauflösendes Geschwindigkeitsprofil in einem definierten Zeitraum von 5 s.

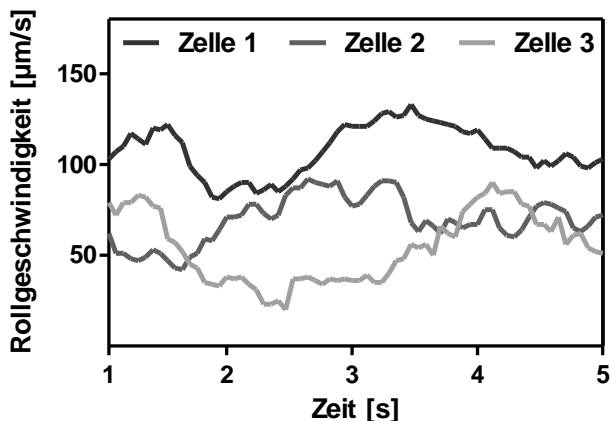


Abb. 19: Hochauflösendes Geschwindigkeitsprofil rollender K562 LLL-Zellen aus einer Zellpopulation. Vergleich der Geschwindigkeit von drei rollenden K562 LLL-Zellen innerhalb einer Population für 5 s. Die Zellen weisen zum einen eine unterschiedliche Durchschnittsgeschwindigkeit zueinander auf, zum anderen zeigen alle Zellen ein alternierendes Geschwindigkeitsprofil. Zu sehen ist die Analyse von insgesamt 68 Datenpunkten pro Zelle.

Obwohl sie aus einer Zellpopulation stammen, ist gut zu erkennen, dass alle drei rollenden K562 LLL-Zellen verschiedene Durchschnittsgeschwindigkeiten aufweisen. Dies begründet sich vermutlich damit, dass die Oberflächenexpression von L-Selektin auf verschiedenen Zellen unterschiedlich ist. Weiterhin ist zu sehen, dass die einzelnen Zellen ein alternierendes Geschwindigkeitsprofil aufweisen. Dies zeigt, dass während des Rollvorgangs kontinuierlich Bindungen vom L-Selektin zum Liganden PSGL-1 gebildet und schnell wieder gelöst werden. Tab. 4 zeigt die statistische Auswertung der drei K562 LLL-Zellen bzgl. Durchschnittsgeschwindigkeit (*mean*), mittlerer Geschwindigkeit (*median*) und nach der höchsten (max.) bzw. geringsten (min.) Geschwindigkeit.

Tab. 4: Statistische Auswertung des hochauflösenden Geschwindigkeitsprofils von drei rollenden K562 LLL-Zellen.

	Rollgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]			
	<i>mean</i>	<i>min.</i>	<i>median</i>	<i>max.</i>
Zelle 1	107.7	81.0	108.0	133.0
Zelle 2	69.7	42.0	70.5	92.0
Zelle 3	54.2	20.0	53.0	90.0

Aufgrund der Daten zur konzentrationsabhängigen Rollgeschwindigkeit und Verteilung des Liganden, wurde die PSGL-1-Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ für die FC-Experimente ausgewählt. Diese Konzentration entspricht auch der vom Hersteller empfohlenen maximal einzusetzenden Menge. Allerdings wurde diese unter statischen Bedingungen ermittelt.

3.2 Charakterisierung der Selektin–Ligand-Interaktion mittels *biochemical glycoengineering*

3.2.1 Beschreibung der verwendeten Mannosamin-Vorläuferderivate

Von den drei verwendeten Mannosamin-Vorläuferderivaten (Abb. 20) wurde das peracMNAc kommerziell bezogen. Das peracMNPprop und das peracMNCycloProp wurden dagegen in Zusammenarbeit mit Dr. Marie Weinhart aus der Arbeitsgruppe von Prof. Haag (Institut für Chemie und Biochemie, FU–Berlin) selbsthergestellt. Als Reaktionskontrolle dienten dabei Dünnschichtchromatogramme, das Produkt wurde mittels Massenspektrometrie verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Alle drei Varianten liegen in der peracetylierten Form vor, da, wie eingangserwähnt (1.2), die Acetylierung in einer verbesserten Aufnahme durch die Zellen resultiert. Das peracMNAc wird im Weiteren auch als natürlicher Vorläufer bezeichnet, da aus diesem durch den zellulären Sialinsäure-Syntheseweg die natürliche Neuraminsäure (*N*-Acetylneuraminsäure, Neu5Ac), auch als Sialinsäure bezeichnet, synthetisiert wird. Diese trägt in der Position C5 einen *N*-Acetylrest als Seitenkette. Die Derivate peracMNPProp und peracMNCycloProp werden dahingegen als artifizielle Vorläufer bezeichnet, da aus ihnen im zellulären Stoffwechsel die sogenannte *N*-Propanoylneuraminsäure (Neu5Prop) bzw. *N*-Cyclopropylcarbonylneuraminsäure (Neu5CycloProp) synthetisiert werden. Bei diesen Verbindungen liegt ein *N*-Propanoylrest bzw. ein *N*-Cyclopropylcarbonylrest an Position C5 vor.

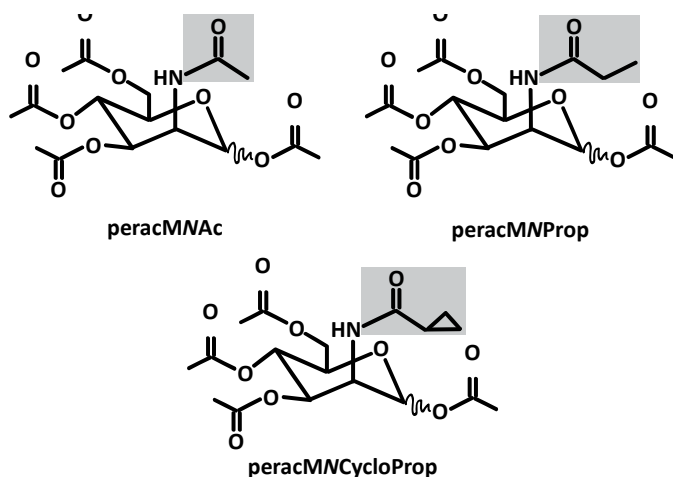


Abb. 20: Strukturen der drei verwendeten peracetylierten Mannosamin-Vorläuferderivate peracMNAc, peracMNPProp und peracMNCycloProp. Die Vorläufer werden unterteilt in den natürlichen Vorläufer peracMNAc und die beiden artifiziellen Vorläufer peracMNPProp und peracMNCycloProp. Alle drei Derivate unterscheiden sich in der Länge und Struktur ihrer Seitenkette (**grauer Kasten**).

3.2.2 Einfluss des *biochemical glycoengineering* auf PSGL-1 – zelluläre Interaktionsstudien mit P-Selektin

Da das sLe^x-Motiv in der Bindungsdomäne von PSGL-1 unter anderem aus einem Sialinsäurebaustein besteht, sollte untersucht werden, ob die Modifikation des sLe^x-Motivs durch die Supplementierung mit den zuvor beschriebenen Mannosamin-Vorläuferderivaten (peracMNAc, peracMNPProp und peracMNCycloProp) mittels *biochemical glycoengineering* einen Einfluss auf die Bindung von PSGL-1 an P-Selektin hat.

Dazu wurden Jurkat T-Zellen, die endogen PSGL-1 exprimieren, mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten in der Zellkultur behandelt (2.5.2), die Menge an Sialinsäure bestimmt (2.4.2), die Expressionstärke von PSGL-1 bestimmt (2.5.3) und FC-Experimente (2.5.4)

durchgeführt. Bei den FC-Experimenten wurde als Ligand 20 µg/ml P-Selektin in der FC immobilisiert [15] und ein *shear stress* von 0.5 dynes/cm² verwendet. Der in der Literatur beschriebene *shear stress* Bereich liegt zwischen 0.5 dynes/cm² und 1 dynes/cm² [120]. Als Kontrollansatz wurden Zellen mit DMSO behandelt (DMSO-Kontrolle), um einen Einfluss durch das Lösungsmittel auszuschließen. In Abb. 21 ist das Ergebnis der Bestimmung des Sialinsäuregehalts dargestellt.

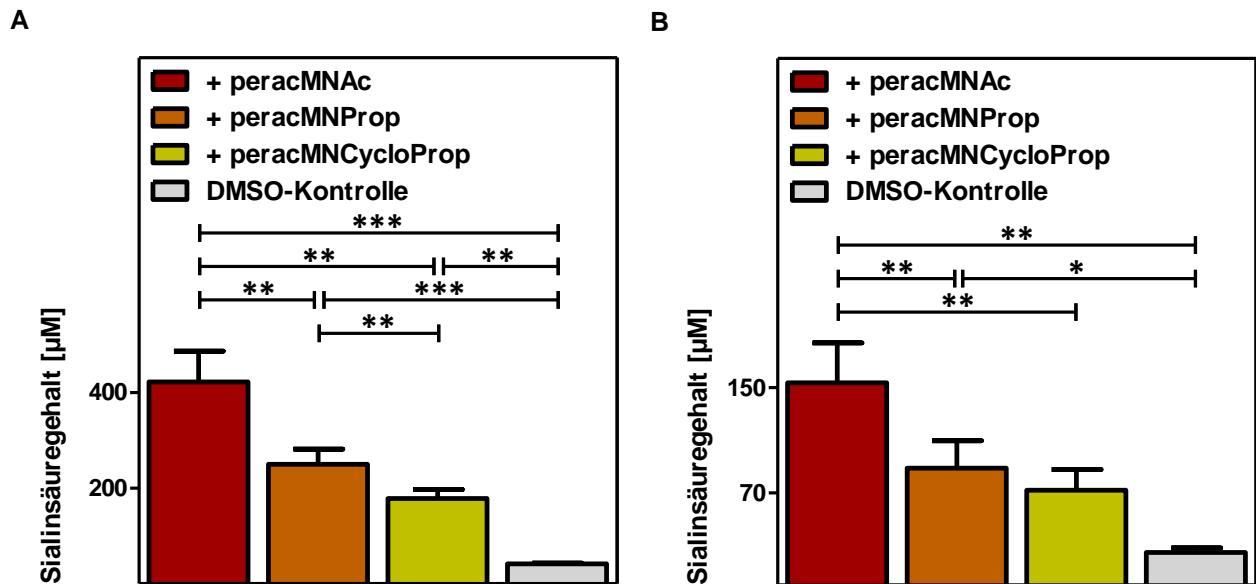


Abb. 21: Bestimmung des Sialinsäuregehalts der Jurkat T-Zellen nach *biochemical glycoengineering* mittels Resorcinassay. Bestimmung des zellulären Gesamtgehalts an Sialinsäure (**A**) und der in Glykokonjugaten gebundenen Sialinsäure (**B**). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten in Duplikaten. *, $p = 0.0191$; **, $p \leq 0.0090$; ***, $p \leq 0.0004$ (paired t test).

Alle drei verwendeten Mannosamin-Vorläuferderivate wurden erfolgreich in die Jurkat-Zellen aufgekommen und dort auch in Glykokonjugaten eingebaut (Abb. 21A und Abb. 21B). Als Kontrolle wurden nicht-supplementierte Zellen analysiert (DMSO-Kontrolle), für die nur ein geringer Gehalt an Sialinsäure detektiert werden konnte, was zeigt, dass es in allen supplementierten Ansätzen zu einer Hypersialylierung gekommen ist. Vergleicht man den Gesamtsialinsäure der Jurkat T-Zellen nach Supplementierung mit den unterschiedlichen Mannosamin-Vorläuferderivaten untereinander (Abb. 21A), so ist der Einbau des peracMNAc in Glykokonjugate signifikant höher als bei den beiden artifiziellen Derivaten (p -Wert ≤ 0.0046). Betrachtet man den Sialinsäuregehalt von peracMNProp und peracMNCycloProp, ist festzustellen, dass es bei Verwendung von peracMNProp wiederum zu einem signifikant höheren Einbau (p -Wert = 0.0084) gekommen ist. Die gleichen Unterschiede können auch für den Sialinsäuregehalt festgestellt werden, der als Glykokonjugat gebunden vorliegt (Abb. 21B).

Allerdings ist die Sialinsäurekonzentration bei peracMNAc gegenüber den beiden artifiziellen Mannosaminderivaten zwar signifikant höher (p -Wert ≤ 0.0084), bei den beiden artifiziellen Derivaten untereinander kann man aber keinen signifikanten Unterschied feststellen.

Für die vergleichenden Analysen in der FC muss die zelluläre Expressionsrate des modifizierten PSGL-1 gleich sein, um quantitative Aussagen zum Einfluss der Modifikation von PSGL-1 auf die P-Selektin-Bindung machen zu können. Die zelluläre Oberflächenexpression von PSGL-1 wurde deshalb mittels Durchflusszytometrie (2.5.3) auf den Jurkat T-Zellen bestimmt (Abb. 22).

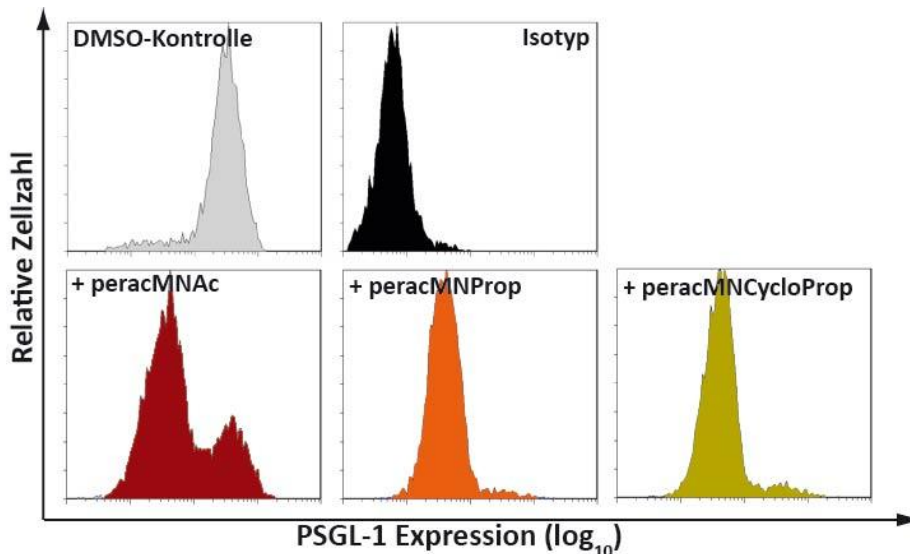


Abb. 22: Bestimmung der PSGL-1 Expressionsstärke mittels Durchflusszytometrie. Vergleich der PSGL-1 Expression auf der Oberfläche von Jurkat T-Zellen in Abhängigkeit des supplementierten Mannosamin-Vorläuferderivates mit anti-CD162-PE gekoppelten Antikörpern bzw. Isotyp IgG1-PE.

Gegenüber der Isotyp-Kontrolle ist in allen Ansätzen PSGL-1 auf der Zelloberfläche nachweisbar. Im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle fällt bei allen supplementierten Zellen ein negativer Einfluss der Mannosamin-Vorläufer auf die Expression oder Oberflächenexposition von PSGL-1 auf. In diesen Ansätzen ist die auf der Zelloberfläche detektierte PSGL-1 Menge geringer als bei der DMSO-Kontrolle.

Um die Funktionalität von PSGL-1 in den behandelten Zellen zu untersuchen, wurden die Jurkat T-Zellen hinsichtlich ihrer Adhäsion an P-Selektin in der FC getestet (Abb. 23).

Durch die Behandlung der Jurkat T-Zellen mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten kam es zu einer Reduktion der Adhäsion der Zellen an das P-Selektin in der FC. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle entspricht dies bei peracMNAc einer Reduktion von 33 % (p -Wert = 0.0062), bei peracMNProp von 47 % (p -Wert = 0.0062) und bei peracMNCycloProp einer Reduktion von 46 % (p -Wert = 0.01).

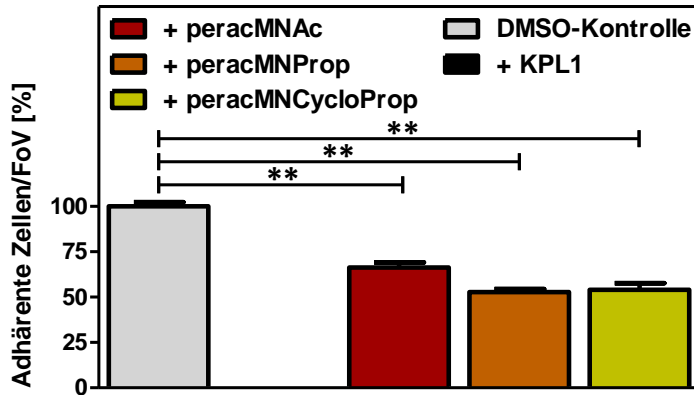
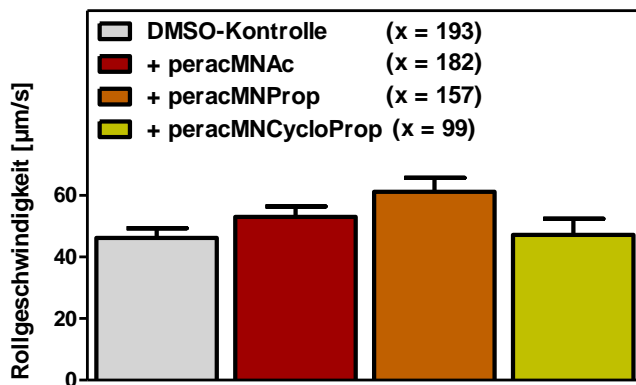


Abb. 23: Adhäsion von Jurkat T-Zellen mit und ohne Mannosamin-Vorläufern. Vergleich der Adhäsion der Jurkat T-Zellen (DMSO-Kontrolle) mit der Adhäsion von supplementierten Zellen an P-Selektin. Nicht-supplementierte Zellen wurden mit dem α PSGL-1-Antikörper KPL1 vorinkubiert, um die Spezifität der Interaktion für PSGL-1 zu zeigen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. **, $p \leq 0.01$ (paired t test). FoV steht für *field of view* ($800 \times 600 \mu\text{m}$).

Die Spezifität der Adhäsion von zellulärem PSGL-1 an den Liganden P-Selektin konnte durch eine Vorinkubation der Zellen mit dem Antikörper KPL1 sichergestellt werden, der die Bindungsdomäne von PSGL-1 blockiert und damit eine weitere Ligandenbindung verhindert [121]. Bei diesem Ansatz konnten keine adhärenen Zellen detektiert werden.

Neben der Analyse der Zahl der adhärenen Zellen war die Analyse der Rollgeschwindigkeit der Zellen von großem Interesse (Abb. 24A, B), die wie zuvor beschrieben durchgeführt wurde.

A



B

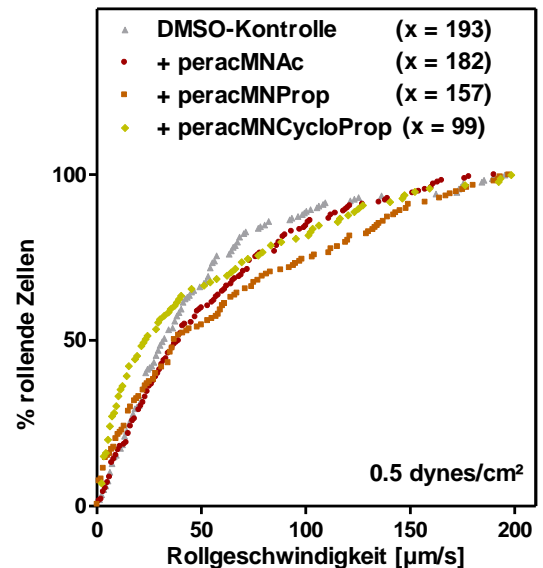


Abb. 24: Bestimmung der durchschnittlichen Rollgeschwindigkeit der mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten supplementierten Jurkat T-Zellen. **A**, Vergleich der Durchschnittsrollgeschwindigkeit der Jurkat-Zellen nach erfolgter Supplementierung mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten in der mit P-Selektin beschichteten FC. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten, x steht für die Anzahl der analysierten Zellen. **B**, Kumulatives Histogramm der Rollgeschwindigkeit bei 0.5 dynes/cm^2 in Abhängigkeit der Mannosamin-Supplementierung.

Der Einbau der Mannosamin-Vorläuferderivate hat keinen signifikanten Einfluss auf die Rollgeschwindigkeit der Jurkat T-Zellen (Abb. 24A). Das Rollverhalten wird nur leicht beeinflusst (Abb. 24B).

Fasst man die Ergebnisse der Untersuchung zur Sialylierung (Abb. 21B) und zur Adhäsion (Abb. 23) zusammen, so scheint es, dass eine Erhöhung des Sialylierungsgrades von PSGL-1 eine Verschlechterung der Adhäsionsfähigkeit an P-Selektin nach sich zieht. Dies könnte sich mit dem vermehrten Einbau negativer Ladungen durch die erhöhte Zahl von Sialinsäuren erklären. Allerdings scheint dies nicht der alleinige Grund für die Verminderung der Adhäsion zu sein, die Struktur der Sialinsäuren, und damit die veränderte Seitenkette der Sialinsäure, scheint ebenso einen entscheidenden Einfluss zu haben. In den Ansätzen peracMNProp und peracMNCycloProp ist die Sialinsäurekonzentration geringer als beim peracMNAc, allerdings adhären im Vergleich dazu weniger Zellen. Durch die veränderte Seitenkette der Sialinsäure innerhalb des Le^x-Motivs, kann anscheinend der Ligand P-Selektin nicht mehr so gut gebunden werden, was zu einer weiteren Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der Zellen führt. In Tab. 5 ist der Einfluss der Mannosamin-Vorläuferderivate gegenüber dem nativen PSGL-1 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 5: Einfluss der Supplementierung von Jurkat T-Zellen mit Mannosamin-Vorläuferderivate auf Sialylierung, Adhäsion und Rollgeschwindigkeit. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der Daten aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Mannosamin-Vorläufer	Oberflächenexposition	Sialylierung <i>mean</i> \pm SEM	Adhäsion <i>mean</i> \pm SEM	Rollgeschwindigkeit		
				<i>mean</i> \pm SEM ^a	median	x ^b
	<i>MFI</i> ^c	μ M	Zellen/FoV ^d	μ m/s	μ m/s	
DMSO-Kontrolle	33.7	–	54 \pm 1	46.2 \pm 3.2	32.0	193
+ peracMNAc	17.3	154 \pm 30.2	36 \pm 2 ^e	53.0 \pm 3.4	39.5	182
+ peracMNProp	6.3	89 \pm 20.9	29 \pm 1 ^f	61.2 \pm 4.5	37.0	157
+ peracMNCycloProp	8.0	72 \pm 15.9	29 \pm 2 ^g	47.2 \pm 5.3	23.0	99

^aDie Geschwindigkeit der rollenden Zellen wurde mittels *MATLAB snake model tracking algorithm* analysiert.

^bx steht für die Anzahl der analysierten Zellen.

^c*MFI* = mean fluorescence intensity

^d*FoV* = Field of view (800 \times 600 μ m)

^ep = 0.0062 gegenüber der DMSO-Kontrolle (paired t test); n = 3

^fp = 0.0062 gegenüber der DMSO-Kontrolle (paired t test); n = 3

^gp = 0.01 gegenüber der DMSO-Kontrolle (paired t test); n = 3

Berücksichtigt man aber die Ergebnisse aus der Durchflusscytometrie (Abb. 22), stellt man fest, dass es durch die Supplementierung zu einem drastischen Rückgang der Expression bzw. der

Oberflächenexposition von PSGL-1 gekommen ist (*MFI*). Dies zeigt, dass die Jurkat T-Zellen zwar deutlich höher sialylierte Strukturen aufweisen (Abb. 21), aber weniger PSGL-1 tragen als die nicht-supplementierten Zellen. Die beobachteten Veränderungen in der Adhäsion der Jurkat T-Zellen könnte möglicherweise daher auch auf die Verminderung der Anzahl der PSGL-1-Moleküle auf der Zelloberfläche nach der Behandlung mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten zurückzuführen sein. Eine fundierte Analyse setzt aber voraus, wie oben bereits festgestellt, dass die Zellen eine identische Oberflächenexposition von PSGL-1 aufweisen.

Da dies experimentell nicht erreicht werden konnte, lässt sich dies, unter Vorbehalt, aber mathematisch erreichen. Wird die Anzahl der adhärierenden Zellen auf die Oberflächenexposition normiert, wobei der Quotient aus dem entsprechenden Mittelwert der adhärierenden Zellen (Dividend) und der jeweiligen *MFI* (Divisor) gebildet wird, wird deutlich, dass es durch die Supplementierung mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten zu einer erhöhten Adhäsion der Jurkat T-Zellen an P-Selektin gekommen ist. Dieser Effekt ist bei der Verwendung des peracMNProp am deutlichsten (Tab. 6). Dies gilt aber nur unter Vorbehalt, da nicht bekannt ist, welcher genaue mathematische Zusammenhang zwischen der Adhäsion der Zellen und der PSGL-1-Expression besteht.

Tab. 6: Einfluss der Supplementierung durch Mannosamin-Vorläuferderivate auf die Adhäsion von Jurkat T-Zellen an P-Selektin normiert auf die Oberflächenexposition von PSGL-1.

Mannosamin-Vorläufer	Adhäsion : Oberflächenexposition
DMSO-Kontrolle	1.6
+ peracMNAc	2.1
+ peracMNProp	4.6
+ peracMNCycloProp	3.6

3.2.3 Einfluss des *biochemical glycoengineering* auf L-Selektin – zelluläre Interaktionsstudien mit PSGL-1

Da L-Selektin in den extrazellulären Domänen sieben Glykosylierungsstellen besitzt und zwei davon in der Bindungsdomäne (Lektindomäne) lokalisiert sind [122, 123], sollte untersucht werden, ob der Einbau der Mannosamin-Vorläuferderivate in L-Selektin mittels *biochemical glycoengineering* einen Einfluss auf seine Bindung an den natürlichen Liganden PSGL-1 hat.

Dazu wurden die K562 LLL-Zellen, wie unter 2.5.2 beschrieben, mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten behandelt, anschließend die Menge der eingebauten Sialinsäure mit Hilfe des Resorcinassays (2.4.2) analysiert, die Expressionsstärke des zellulären L-Selektins mittels Durchflusszytometrie (2.5.3) bestimmt und FC-Experimente (2.5.4) durchgeführt. Wie unter 3.1 aufgeführt, wurde in der FC als Ligand 30 $\mu\text{g/ml}$ PSGL-1 und ein *shear stress* von 1 dynes/cm^2 verwendet.

Die Analyse der nach *biochemical glycoengineering* eingebauten Sialinsäuren ergab deutliche Unterschiede für die verschiedenen Mannosamin-Vorläuferderivate (Abb. 25).

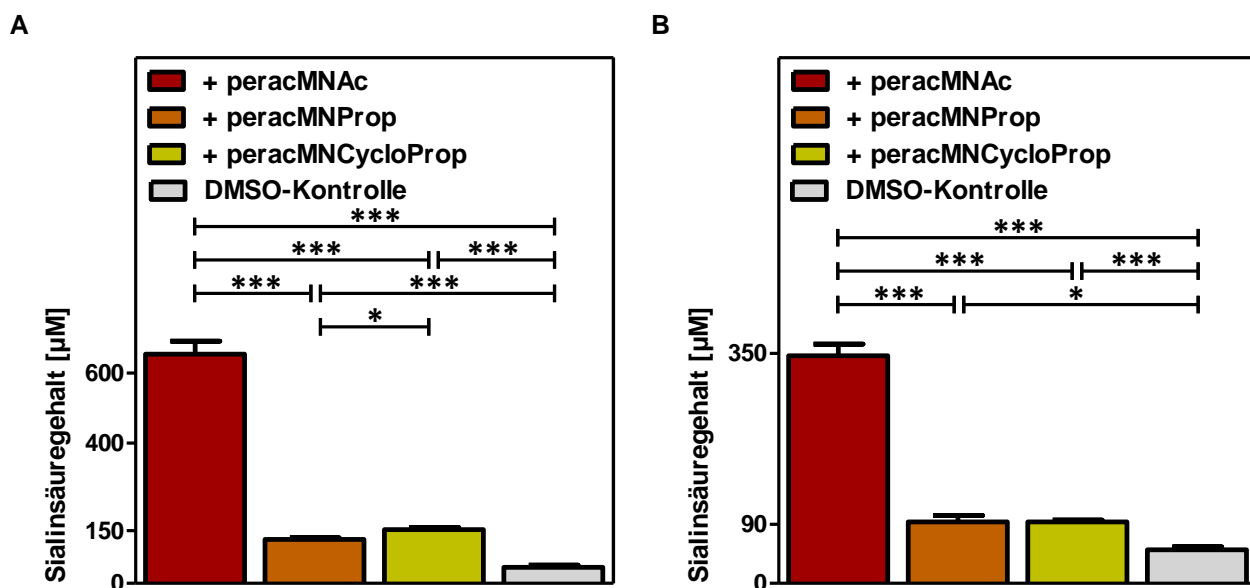


Abb. 25: Bestimmung des Sialinsäuregehalts der K562 LLL-Zellen nach *biochemical glycoengineering* mittels Resorcinassay. Bestimmung des zellulären Gesamtgehalts an Sialinsäure (A) und der in Glykokonjugaten gebundenen Sialinsäure (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten in Duplikaten. *, $p \leq 0.0184$; ***, $p < 0.0001$ (paired t test).

In Abb. 25A ist deutlich zu erkennen, dass es zu einem Einbau der Mannosamin-Vorläuferderivate in die K562 LLL-Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gekommen ist. Nach Supplementierung mit peracMNAc ist der Gehalt an natürlicher Sialinsäure signifikant höher (p -Wert < 0.0001) als der Gehalt der beiden artifiziellen Sialinsäuren nach Supplementierung mit peracMNProp und peracMNCycloProp. Dies gilt sowohl für den zellulären Gesamtgehalt an Sialinsäure (Abb. 25A) als auch für den Gehalt an Sialinsäure, welche als Glykokonjugat gebunden vorliegt (Abb. 25B). Betrachtet man den Sialinsäuregesamtgehalt der beiden artifiziellen Sialinsäuren, lässt sich sagen, dass die Zellen signifikant mehr Neu5CycloProp

besitzen als Neu5Prop (p -Wert = 0.0184). Allerdings ist die Menge an Neu5Prop und Neu5CycloProp, welche als Glykokonjugat gebunden vorliegt, annähernd gleich (Abb. 25B).

Für die weiteren Untersuchungen des Adhäsionsverhaltens der Zellen wurde die L-Selektinexpression auf der Oberfläche der K562 LLL-Zellen mittels Durchflusscytometrie bestimmt (Abb. 26).

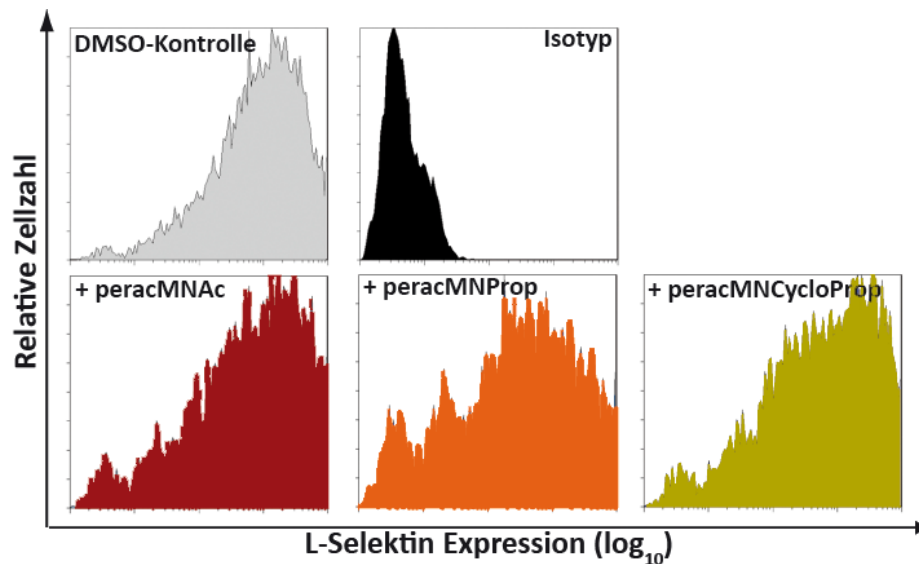


Abb. 26: Bestimmung der Oberflächenexposition von L-Selektin mittels Durchflusscytometrie.

Quantifizierung der Expression von L-Selektin auf der Oberfläche der K652 LLL-Zellen mittels anti-CD62L-PE gekoppelten Antikörpern bzw. Isotyp IgG₁-PE nach Supplementierung mit den Mannosamin-Vorläufer-derivate.

Die Supplementierung mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten hat die Expression von L-Selektin nur sehr wenig beeinflusst. Die Expressionstärke liegt in allen supplementierten Proben bei etwa 90 % bezogen auf die DMSO-Kontrolle. Die Isotyp-Kontrolle zeigt die Spezifität des Nachweises.

Nach der Untersuchung unter Einfluss der Supplementation mit Mannosamin-Vorläuferderivaten auf die L-Selektinexpression, wurde der Flux der supplementierten K562 LLL-Zellen in der FC analysiert (Abb. 27).

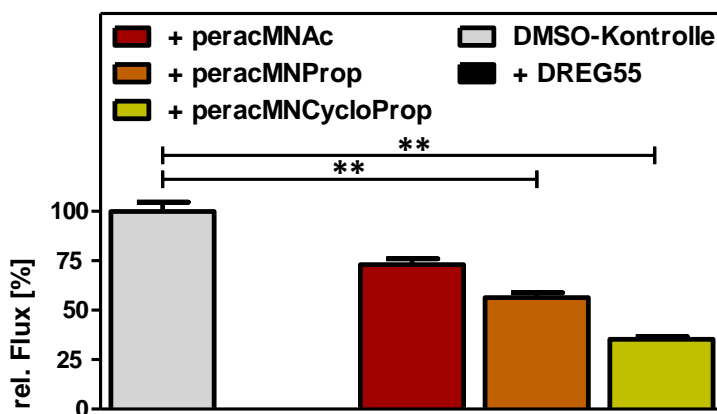


Abb. 27: Flux von K562 LLL-Zellen nach Supplementation mit Mannosamin-Vorläufern. Der Flux der DMSO-Kontrollzellen wurde mit dem Flux von supplementierten K562 LLL-Zellen durch Messungen in der FC verglichen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit DREG55 vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. **, $p \leq 0.0085$ (paired t test).

Als Positivkontrolle dienten Zellen, welche nur mit dem Lösungsmittel DMSO der Mannosamin-Vorläuferderivate behandelt wurden (DMSO-Kontrolle). Der für die DMSO-Kontrolle bestimmte Flux war vergleichbar mit den Daten der Etablierung der FC (3.1). Die DMSO-Behandlung beeinflusst somit das Adhäsionsverhalten in der FC nicht. Durch Vorinkubation der Zellen mit dem blockierenden Antikörper DREG55 konnte das Rollen der Zellen vollständig aufgehoben werden, was bedeutet, dass das Rollen durch L-Selektin vermittelt wird. In Abb. 27 ist gut zu erkennen, dass es durch den Einbau der Mannosamin-Vorläufer zu einer deutlichen Verringerung des Flux kommt. Diese Verminderung im Flux entspricht bei verwendetem peracMNAc 27 %, bei peracMNProp 44 % und bei peracMNCycloProp sogar 65 %. Diese Abnahmen sind für peracMNProp und peracMNCycloProp gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant (p -Wert ≤ 0.0085).

Bei der Untersuchung der Rollgeschwindigkeit (Abb. 28) zeigt sich für die supplementierten K562 LLL-Zellen, dass der Einbau der Mannosamin-Vorläufer keinen signifikanten Einfluss auf die Geschwindigkeit der rollenden Zellen (Abb. 28A) hat. Auch das Rollverhalten der Zellen ist unverändert (Abb. 28B).

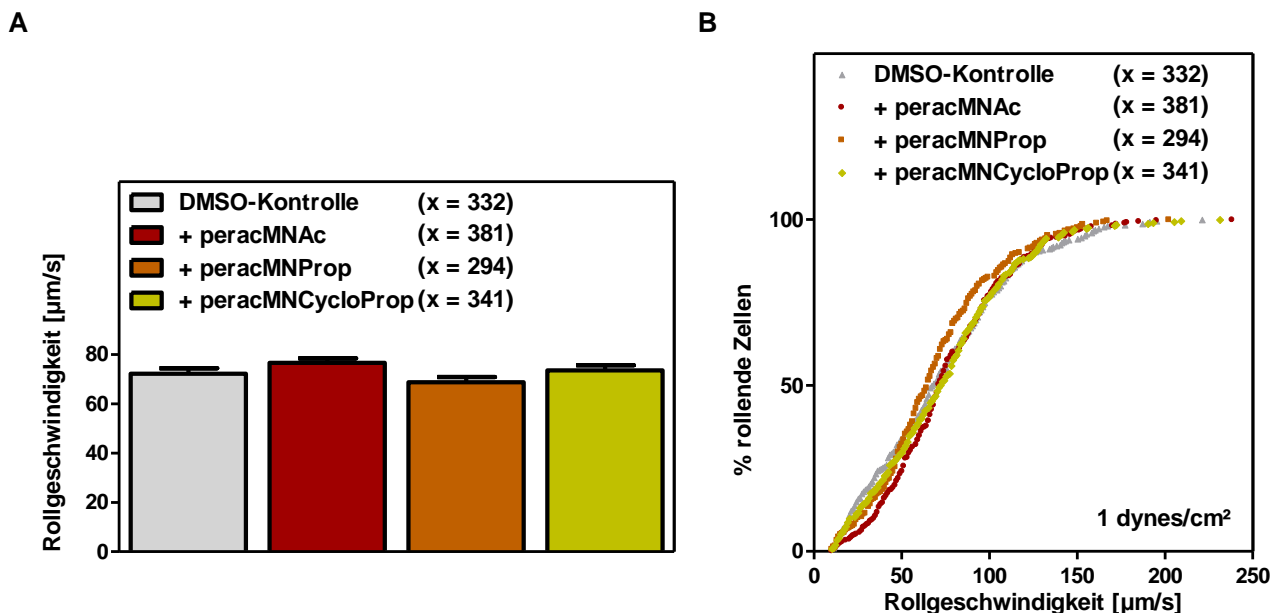


Abb. 28: Bestimmung der Rollgeschwindigkeit von K562 LLL-Zellen nach Supplementation mit Mannosamin-Vorläufern. **A**, Messung der Rollgeschwindigkeit der K562 LLL-Zellen mit und ohne Supplementation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten, x steht für die Anzahl der analysierten Zellen. **B**, Kumulatives Histogramm der Rollgeschwindigkeit bei 1 dynes/cm^2 in Abhängigkeit der Mannosamin-Supplementation.

Fasst man die Fluxdaten (Abb. 27) und die Daten zum Sialinsäureeinbau (Abb. 25B) zusammen, so weisen die Ergebnisse daraufhin, dass die Behandlung mit den Mannosamin-Vorläufern zu einer Erhöhung des Sialylierungsgrades, und damit zu einer Zunahme an negativen Ladungen führt. Dies ist wahrscheinlich Ursache der Verminderung der Bindungsfähigkeit des L-Selektins gegenüber dem Liganden PSGL-1. Die verminderte Bindungsfähigkeit lässt sich dadurch erklären, dass in der Bindungsdomäne des Liganden PSGL-1 sowohl im sLe^x-Motiv als auch in den sTyr-Resten ebenfalls negative Ladungen vorhanden sind, so dass eine verstärkte Sialylierung von L-Selektin zu einer elektrostatischen Abstoßung führt. Die beiden Ansätze mit peracMNProp und peracMNCycloProp zeigen gegenüber peracMNAc einen nochmals verminderten Flux auf, was auch auf einen Einfluss der Struktur der Sialinsäuren weist. Die Veränderung in der Seitenkette bei den artifiziellen Mannosamin-Vorläufern scheint die Bindung von L-Selektin an seinen Liganden noch weiter zu verringern, wobei der Cyclopropylrest die Bindung stärker als die nicht-zyklische Variante inhibiert. In Tab. 7 ist der Einfluss der Mannosamin-Vorläuferderivate gegenüber dem nativen L-Selektin zusammengefasst dargestellt.

Tab. 7: Einfluss des *biochemical glycoengineering* mittels Supplementation durch Mannosamin-Vorläuferderivate auf die Expression, Sialylierungsraten und die Bindung von zellulärem L-Selektin an PSGL-1. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Mannosamin-Vorläufer	Oberflächenexposition	Sialylierung <i>mean</i> \pm SEM	Flux <i>mean</i> \pm SEM	Rollgeschwindigkeit		
				<i>mean</i> \pm SEM ^a	median	x^b
	<i>MFI</i> ^c	μM	<i>Zellen/min</i>	$\mu m/s$	$\mu m/s$	
DMSO-Kontrolle	163.6	–	208 \pm 10	72.1 \pm 2.3	67.5	332
+ peracMNAc	156.0	346.6 \pm 17.4	152 \pm 6	76.6 \pm 1.9	71.0	381
+ peracMNProp	145.3	93.5 \pm 9.7	117 \pm 5 ^d	68.7 \pm 2.0	65.0	294
+ peracMNCycloProp	155.4	93.4 \pm 2.9	73 \pm 3 ^e	73.5 \pm 2.1	72.0	341

^aDie Geschwindigkeit der rollenden Zellen wurde mittels *MATLAB snake model tracking algorithm* analysiert.

^b x steht für die Anzahl der analysierten Zellen.

^c*MFI* = *mean fluorescence intensity*

^d $p = 0.0085$ gegenüber der DMSO-Kontrolle (paired *t* test); $n = 3$

^e $p = 0.0029$ gegenüber der DMSO-Kontrolle (paired *t* test); $n = 3$

3.3 Charakterisierung der L-Selektin-Bindung von DNA-Aptameren

3.3.1 Beschreibung der verwendeten DNA-Aptamere

Mit dem Ziel die L-Selektin–Ligand-Interaktion unter Flussbedingungen spezifisch zu inhibieren, wurden zwei verschiedene DNA-Aptamere auf ihr mögliches Potenzial als Inhibitor untersucht. Beide verwendeten DNA-Aptamere (Abb. 29) wurden kommerziell bezogen. Anzumerken ist, dass es sich bei dem hier verwendeten Aptamer um eine acht Nukleotide kürzere Variante des originalbeschriebenen Aptamers handelt (Abb. 8). Dr. S. Enders konnte in der Arbeitsgruppe (laborintern) mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie zeigen, dass diese Variante vergleichbar gut wie das Original-Aptamer an L-Selektin bindet (unveröffentlichte Daten).

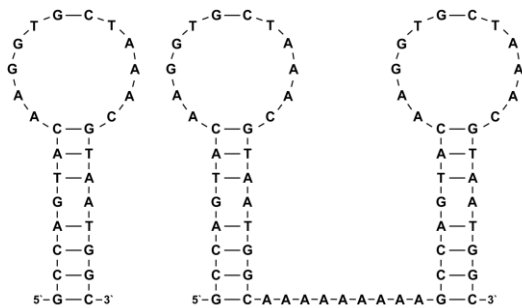


Abb. 29: Schematische Darstellung der beiden verwendeten L-Selektin-Aptamere. Dargestellt ist eine mögliche Struktur des monomeren DNA-Aptamers (*links*) und des dimeren Aptamers (*rechts*).

Zur Kontrolle der Aptamere wurden diese auf ein Polyacrylamidgel (2.2.1) aufgetragen. Das Ergebnis zeigt Abb. 30. Der Größenunterschied beider Aptamer-Varianten zueinander ist hierbei gut feststellbar. Ein weitere Aussage ist hierbei nicht zu treffen, auf die Korrektheit der beiden Aptamer-Varianten wurde sich auf die Qualitätssicherung der Firma Metabion verlassen.

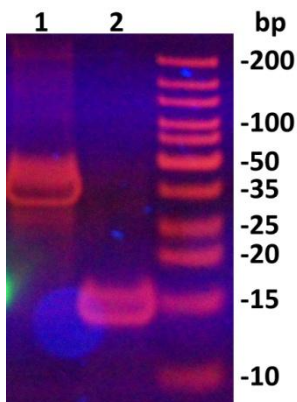


Abb. 30: Visueller Nachweis des monomeren und des dimeren Aptamers. Gelelektrophoretischer Nachweis sowohl des monomeren DNA-Aptamers (2) als auch der dimeren Aptamer-Variante (1).

3.3.2 Bindung der DNA-Aptamere an L-Selektin

Zur Verifizierung der Bindung der beiden Aptamer-Varianten, wurde wie unter 2.4.2 beschrieben ein colorimetrischer Festphasenassay verwendet. Abb. 31 zeigt das Ergebnis.

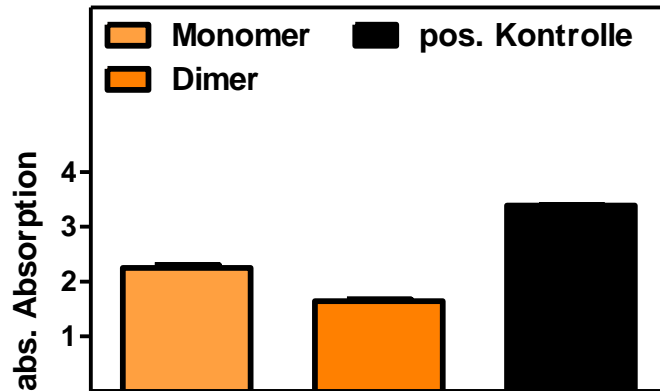


Abb. 31: Bestimmung der Bindung der Aptamer-Varianten mittels colorimetrischen Festphasenassays. Untersuchung der Bindungsfähigkeit des monomeren Aptamers (*links*) und des dimeren Aptamers (*mitte*) in einem colorimetrischen Festphasenassay. Als Positivkontrolle diente der DREG55 Antikörper (*rechts*). Sowohl die Aptamere als auch der Antikörper waren biotinyliert und die Detektion erfolgte mittels eines Avidin-Peroxidase-Konjugates und TMB. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

Es ist gut zu erkennen, dass in alle drei Ansätzen ein Signal detektiert werden konnte (Abb. 31). Dies bedeutet, dass beide Aptamer-Varianten (jeweils 1 μ M) und der Antikörper (67 nM) an das immobilisierte L-Selektin gebunden haben. Dies bestätigt die Bindungsfähigkeit der Aptamere an L-Selektin. Die Ansätze, bei denen zwar L-Selektin immobilisiert wurde, aber kein Biotin-Konjugat inkubiert wurde, wurden als Leerwert von den Messwerten abgezogen.

3.3.3 Inhibitionsstudien der L-Selektin–Ligand-Interaktion in Anwesenheit von DNA-Aptameren

Die Untersuchungen des Einflusses der L-Selektin-spezifischen DNA-Aptamere auf die L-Selektin–Ligand-Interaktion wurden auf zellulärer Ebene in der FC durchgeführt. Wie unter 2.5.4 beschrieben, wurden die K562 LLL-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen DNA-Aptamere vorinkubiert und die Zellen bzgl. Flux, Rollgeschwindigkeit und Rollverhalten analysiert und IC_{50} -Werte bestimmt. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Negativkontrolle wurden die Zellen mit blockierendem anti-L-Selektin Antikörper behandelt; als Ligand diente PSGL-1.

Vor den FC-Experimenten wurde die Expression von L-Selektin auf der Oberfläche der K562 LLL-Zellen (2.5.3) bestimmt (Abb. 32).

Während die Isotyp-Kontrolle in der Durchflusscytometrie nur ein Signal der ungefärbten Zellen zeigt (*links*), ist bei den mit anti-CD62L-PE markierten K562 LLL-Zellen ein starkes Signal als

Zeichen der hohen Expression von L-Selektin auf der Zelloberfläche zu erkennen (*rechts*). Dies zeigt, dass die K562 LLL-Zellen L-Selektin exprimieren.

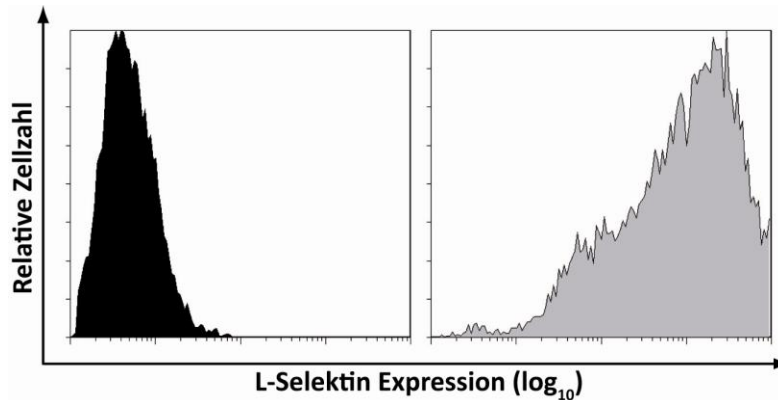


Abb. 32: Bestimmung der L-Selektinexpression mittels Durchflusscytometrie. Gezeigt ist die Analyse der L-Selektinexpression auf K562 LLL-Zellen mittels Isotyp IgG₁-PE (*links*) bzw. anti-CD62L-PE gekoppelten Antikörpern (*rechts*).

Die Ergebnisse der FC-Experimente zur Bestimmung des Flux sind in Abb. 33 zusammenfassend dargestellt.

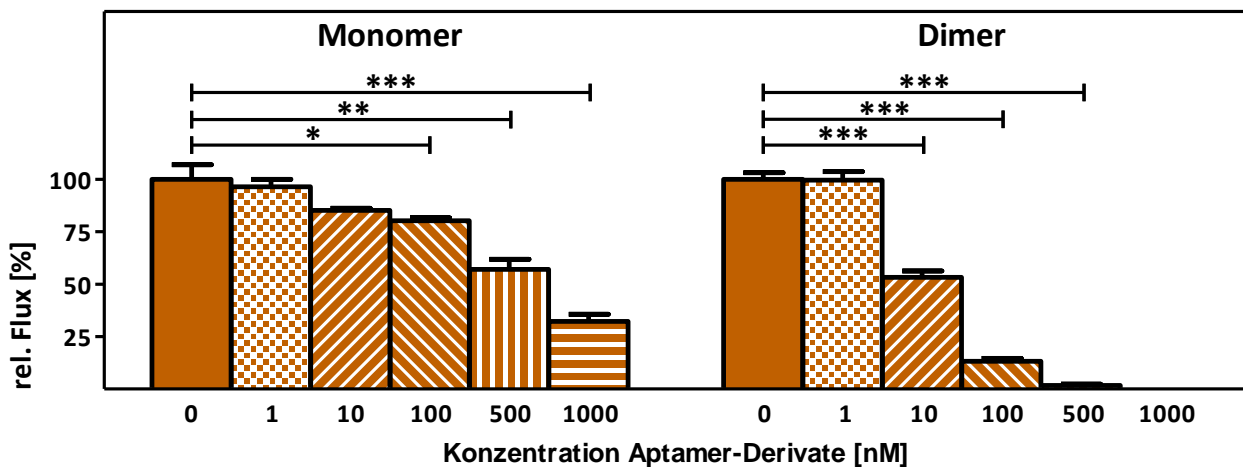


Abb. 33: Flux der K562 LLL-Zellen in Abhängigkeit der beiden Aptamer-Varianten. K562 LLL-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Aptamer-Varianten inkubiert und der Flux bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten in Duplikaten, normalisiert auf den Flux der nativen (unbehandelten) Zellen. *, $p = 0.0263$; **, $p = 0.0045$; ***, $p \leq 0.0002$ (paired t test).

Das Monomer weist bei der geringsten verwendeten Konzentration von 1 nM keine und bei 10 nM nur eine leichte inhibitorische Wirkung auf. Erst bei 100 nM kommt es zu signifikanten Änderungen im Flux und damit zu etwa 20 % weniger rollenden Zellen (p -Wert = 0.0263). Durch eine stufenweise Erhöhung der Aptamerkonzentration kommt es zu einem deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt. Bei 500 nM rollen etwa nur die Hälfte der Zellen (p -Wert = 0.0045) und bei 1000 nM nur noch etwa $\frac{1}{4}$ der Zellen (p -Wert = 0.002). Daraus lässt sich ein IC_{50} -Wert von etwa 6×10^{-7} M bestimmen (Abb. 40).

Das Dimer hat, wie das Monomer, bei 1 nM keinen Einfluss auf das Rollverhalten der Zellen. Bei Verwendung von 10 nM dieser Aptamer-Variante kommt es allerdings zu einer Inhibition des Rollens der K562 LLL-Zellen um fast 50 % (p-Wert = 0.0002). Diese Wirkung lässt sich durch Erhöhung der eingesetzten Konzentration noch verstärken. Bei 100 nM rollen nur noch etwa 10 % der Zellen (p-Wert < 0.0001) und bei 500 nM ist das Rollen der Zellen fast komplett inhibiert. Der Einsatz von 1 μ M des dimeren Aptamers zeigt keine rollenden Zellen mehr. Bei dieser Aptamer-Variante lässt sich ein IC_{50} -Wert von etwa 1.2×10^{-8} M bestimmen (Abb. 40).

Mittels der FC wurde der Einfluss der verschiedenen Aptamer-Varianten auch auf die Rollgeschwindigkeit (Abb. 34) und das Rollverhalten (Abb. 35) der K562 LLL-Zellen analysiert.

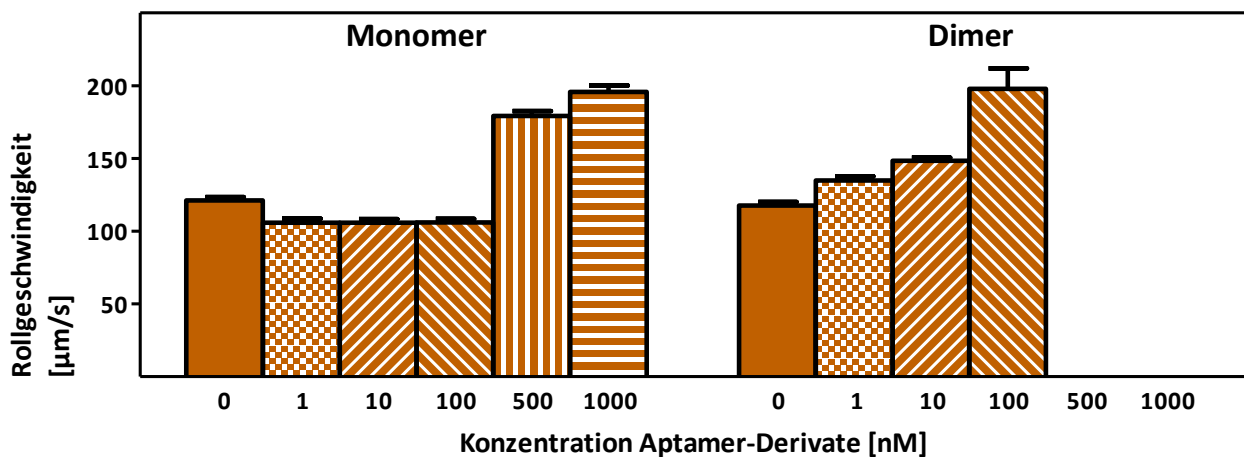


Abb. 34: Bestimmung der Rollgeschwindigkeit der K562 LLL-Zellen nach Vorinkubation mit den unterschiedlichen Aptamer-Varianten in Abhängigkeit der Konzentration. Vergleich der Geschwindigkeit der rollenden K562 LLL-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen des monomeren und des dimeren Aptamers. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Pro Ansatz wurden zwischen 42 bis 667 Zellen analysiert.

Die Untersuchungen zur Rollgeschwindigkeit zeigen, dass es durch die Verwendung des Monomers bei Konzentrationen zwischen 1 nM bis 100 nM zu keiner Änderung in der Geschwindigkeit der rollenden Zellen kommt. Bei einer Konzentrationen von 500 nM und darüber hinaus kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Rollgeschwindigkeit.

Durch die Behandlung der Zellen mit dem Dimer kommt es schon bei einer Konzentration von 1 nM zu einer leichten Erhöhung der Rollgeschwindigkeit. Diese nimmt konzentrationsabhängig weiter zu. Da bei den Konzentrationen 500 nM und 1000 nM kaum bzw. kein Rollen mehr festgestellt werden konnte, kann auch keine Auswertung bzgl. der Geschwindigkeit gemacht werden.

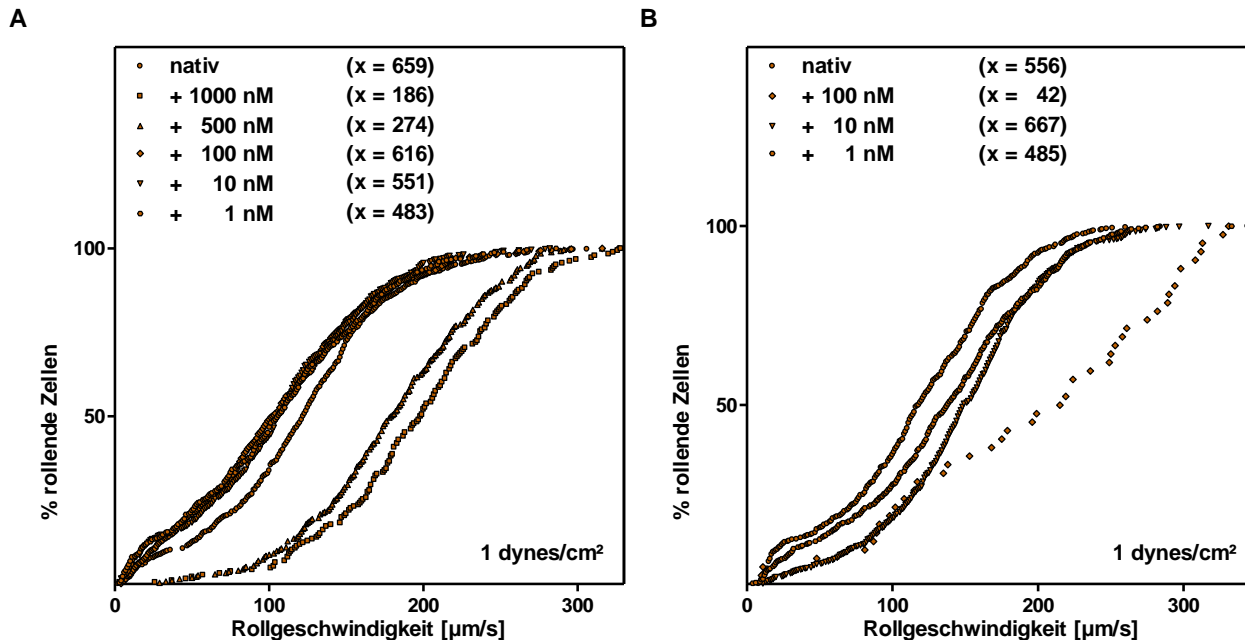


Abb. 35: Kumulatives Histogramm der Rollgeschwindigkeit von K562 LLL-Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen Aptamer-Varianten. Dargestellt ist die Analyse von bis zu 667 Zellen pro Ansatz. Die Untersuchungen erfolgten bei 1 dynes/cm² mit verschiedenen Konzentrationen des Monomers (A) und des Dimers (B). x steht für die Anzahl der analysierten Zellen.

Ein Einfluss der beiden verwendeten Aptamere auf das Rollverhalten der K562 LLL-Zellen (Abb. 35), ist nicht festzustellen. Die Rechtsverschiebung der Graphen ist auf die höhere Rollgeschwindigkeit zurückzuführen. Lediglich beim Dimer weist ein geringer Anteil der rollenden Zellen bei 100 nM eine verhältnismäßig kleinere Geschwindigkeit im Vergleich zu den übrigen Zellen auf.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass eine dimere Präsentation des Bindungs epitops der Aptamere zu einer stärkeren Inhibition der L-Selektin–Ligand-Interaktion führt. Dies weist darauf hin, dass für die Interaktion mit L-Selektin die Multivalenz des Aptamers von hoher Bedeutung ist.

3.4 Charakterisierung der L-Selektin–Ligand-Interaktion mittels dendritischer Polyglycerolsulfate

3.4.1 Beschreibung der verwendeten dendritischen Polyglycerolsulfaten

Für die Inhibitionsstudien der L-Selektin–Ligand-Interaktion wurden die Substanzen dPG_{2 kDa}S₂₃, dPG_{6 kDa}S₆₇ und dPG_{480 kDa}S₅₁₈₅ aus der Gruppe der dendritischen Polyglycerolsulfate verwendet,

wobei die kDa die molare Masse des Polyglycerolgerüst angibt und die Zahl S die Anzahl der Sulfate. Somit unterscheiden sich diese drei Verbindungen sowohl in der Größe des Polyglycerolgerüst als auch (daraus resultierend) in der Beladungsdichte mit Sulfaten.

Dendritische Polyglycerolsulfate sind polyanionische Verbindungen mit einem hohen Sulfatierungsgrad, die sich in Plasmonresonanzuntersuchungen als effektive Inhibitoren der L-Selektin–Ligand-Interaktion erwiesen haben [124]. Die drei Substanzen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Haag (Institut für Chemie und Biochemie, FU–Berlin) synthetisiert und für die Inhibitionstudien zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Inhibitionsstudien in Anwesenheit von dendritischen Polyglycerolsulfaten

Die Untersuchungen wurden auf zellulärer Ebene mit den Nalm6 LLL-Zellen in der FC durchgeführt. Wie unter 2.5.4 beschrieben, wurden die Nalm6 LLL-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von dendritischen Polyglycerolsulfaten vorinkubiert und anschließend in der FC hinsichtlich Flux, Rollgeschwindigkeit und Rollverhalten untersucht. Weiterhin wurde der IC_{50} -Wert für zwei der drei dendritischen Polyglycerolsulfate bestimmt. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Negativkontrolle wurden die Zellen mit blockierendem anti-L-Selektin Antikörper behandelt. $dPG_{480\text{ kDa}S_{5185}}$ konnte aufgrund der nur begrenzt verfügbaren Substanzmenge nicht in einer $10\text{ }\mu\text{M}$ Konzentration untersucht werden.

Vor den FC-Experimenten wurde die Expression von L-Selektin auf der Oberfläche der Nalm6 LLL-Zellen mittels Durchflusszytometrie (2.5.3) sichergestellt (Abb. 36).

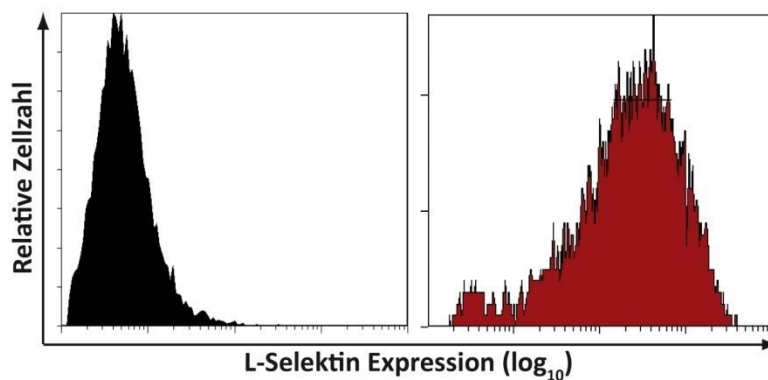


Abb. 36: Bestimmung der L-Selektinexpression mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt ist die Analyse der L-Selektinexpression auf Nalm6 LLL-Zellen mittels Isotyp IgG_1 -PE (*links*) bzw. anti-CD62L-PE gekoppelten Antikörpern (*rechts*).

Der Flux der Nalm6 LLL-Zellen in der FC nach Inkubation der Zellen mit den dendritischen Polyglycerolsulfaten ist in Abb. 37 dargestellt.

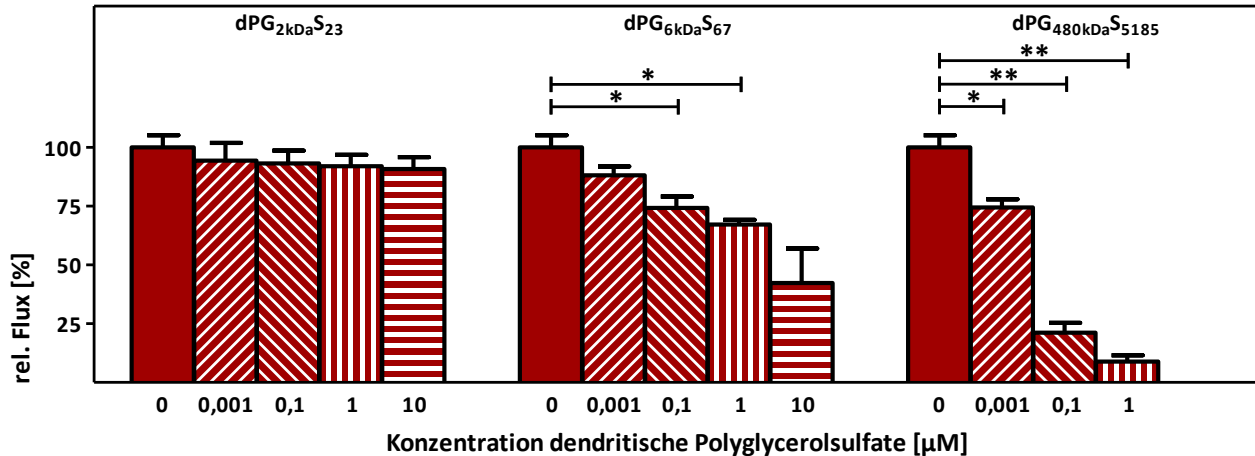


Abb. 37: Flux der Nalm6 LLL-Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen dendritischen Polyglycosulfate. Vergleich des Flux der Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an dPG_{2kDaS₂₃}, dPG_{6kDaS₆₇} und dPG_{480kDaS₅₁₈₅}. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten normalisiert auf den Flux der nativen Zellen. *, p ≤ 0.0418; **, p ≤ 0.0080 (paired t test).

dPG_{2kDaS₂₃} zeigt in den getesteten Konzentrationen keine inhibitorische Wirkung auf die Interaktion zwischen zellulärem L-Selektin und dem Liganden PSGL-1.

dPG_{6kDaS₆₇} weist bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 1 nM keine inhibitorische Wirkung auf. Konzentrationen ab 100 nM zeigen dagegen eindeutig inhibitorische Effekte (p-Wert ≤ 0.0418). Bei einer stufenweisen Erhöhung der eingesetzten Konzentrationen zeigt sich eine deutliche Zunahme der Inhibition des Rollens der Zellen. Aus diesen Daten lässt sich für dPG_{6kDaS₆₇} ein IC₅₀-Wert von 5×10^{-6} M bestimmen (Abb. 40).

Gegenüber den beiden kleinen Polyglycosulfaten zeigt dPG_{480kDaS₅₁₈₅} schon bei der geringsten untersuchten Konzentration von 1 nM einen inhibitorischen Effekt (p-Wert = 0.0396) von 25%. Bei 100 nM rollen weniger als ¼ der eingesetzten Zellen (p-Wert = 0.0080) und bei 1 µM kommt es zu einer fast vollständigen Inhibition (p-Wert = 0.0037). Aus den einzelnen Daten lässt sich ein IC₅₀-Wert von 8×10^{-9} M für dPG_{480kDaS₅₁₈₅} bestimmen (Abb. 40).

Mittels der FC wurde auch die Rollgeschwindigkeit (Abb. 38) und das Rollverhalten (Abb. 39) der Nalm6 LLL-Zellen unter Einfluss der dendritischen Polyglycosulfate nach Vorinkubation untersucht.

Die Untersuchung der Rollgeschwindigkeit unter dPG_{2kDaS₂₃} Inhibition (Abb. 38) zeigt nur bei Verwendung von 10 µM eine Erhöhung der Rollgeschwindigkeit. Geringere Konzentrationen dieses dPGS haben keinen Einfluss auf die Rollgeschwindigkeit.

Durch Einsatz von $10 \mu\text{M}$ $\text{dPG}_{6 \text{ kDa} \text{ S}_{67}}$ kommt es fast zu einer Verdopplung der Geschwindigkeit der rollenden Zellen, wohingegen $1 \mu\text{M}$ nur eine leichte Erhöhung der Rollgeschwindigkeit zur Folge hat und niedrigere Konzentrationen zu keiner Änderung der Geschwindigkeit führen. Die Geschwindigkeitserhöhung lässt sich durch die vom Inhibitor bewirkte geringere Interaktion mit dem Liganden PSGL-1 erklären.

Dahingegen zeigt sich bei Verwendung von $\text{dPG}_{480 \text{ kDa} \text{ S}_{5185}}$ eine leichte Erhöhung der Rollgeschwindigkeit bereits bei einer Konzentration von 1 nM ; bei einer Konzentration von 0.1 bzw. $1 \mu\text{M}$ kommt es zu mehr als einer Verdopplung der Geschwindigkeit der rollenden Zellen.

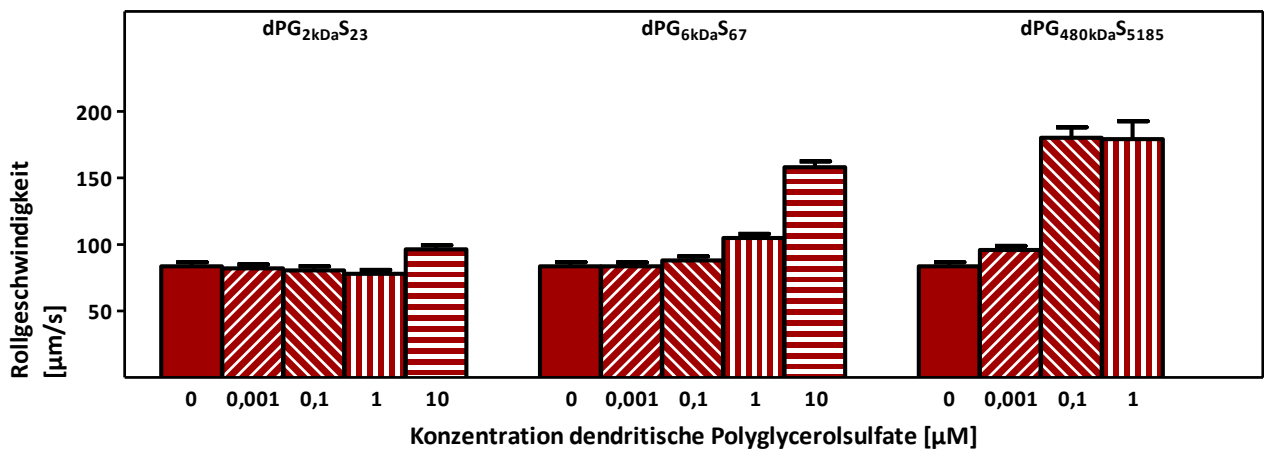


Abb. 38: Bestimmung der Rollgeschwindigkeit der Nalm6 LLL-Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen dPGS-Varianten. Vergleich der Geschwindigkeit der rollenden Nalm6 LLL-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen nach Vorinkubation mit den Inhibitoren $\text{dPG}_{2 \text{ kDa} \text{ S}_{23}}$, $\text{dPG}_{6 \text{ kDa} \text{ S}_{67}}$ und $\text{dPG}_{480 \text{ kDa} \text{ S}_{5185}}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Pro Ansatz wurden 30 bis 281 Zellen analysiert.

Das Rollverhalten der Zellen wird durch die Verwendung der unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen dPGs (Abb. 39) nicht verändert. In allen Ansätzen zeigen die Zellen das gleiche einheitliche Rollverhalten. Die Rechtsverschiebung der Kurven kommt aufgrund der generellen Geschwindigkeitszunahme der rollenden Zellen in Gegenwart der Inhibitoren zustande. Allerdings ist zu erkennen, dass bei Verwendung von $1 \mu\text{M}$ $\text{dPG}_{480 \text{ kDa} \text{ S}_{5185}}$ ein geringer Anteil der rollenden Zellen eine im Vergleich zu den restlichen Zellen niedrigere Rollgeschwindigkeit aufweisen.

Die Untersuchungen zeigen, dass die multivalente Präsentation der Bindungs epitope, also der Sulfatgruppen, auf dem Polyglycerolgerüst einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung an das zelluläre L-Selektin und dadurch auf die Inhibition der Interaktion mit dem Liganden PSGL-1

hat. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung höher ist, je größer das Polyglycerolgerüst und damit je mehr Sulfatreste präsentiert werden.

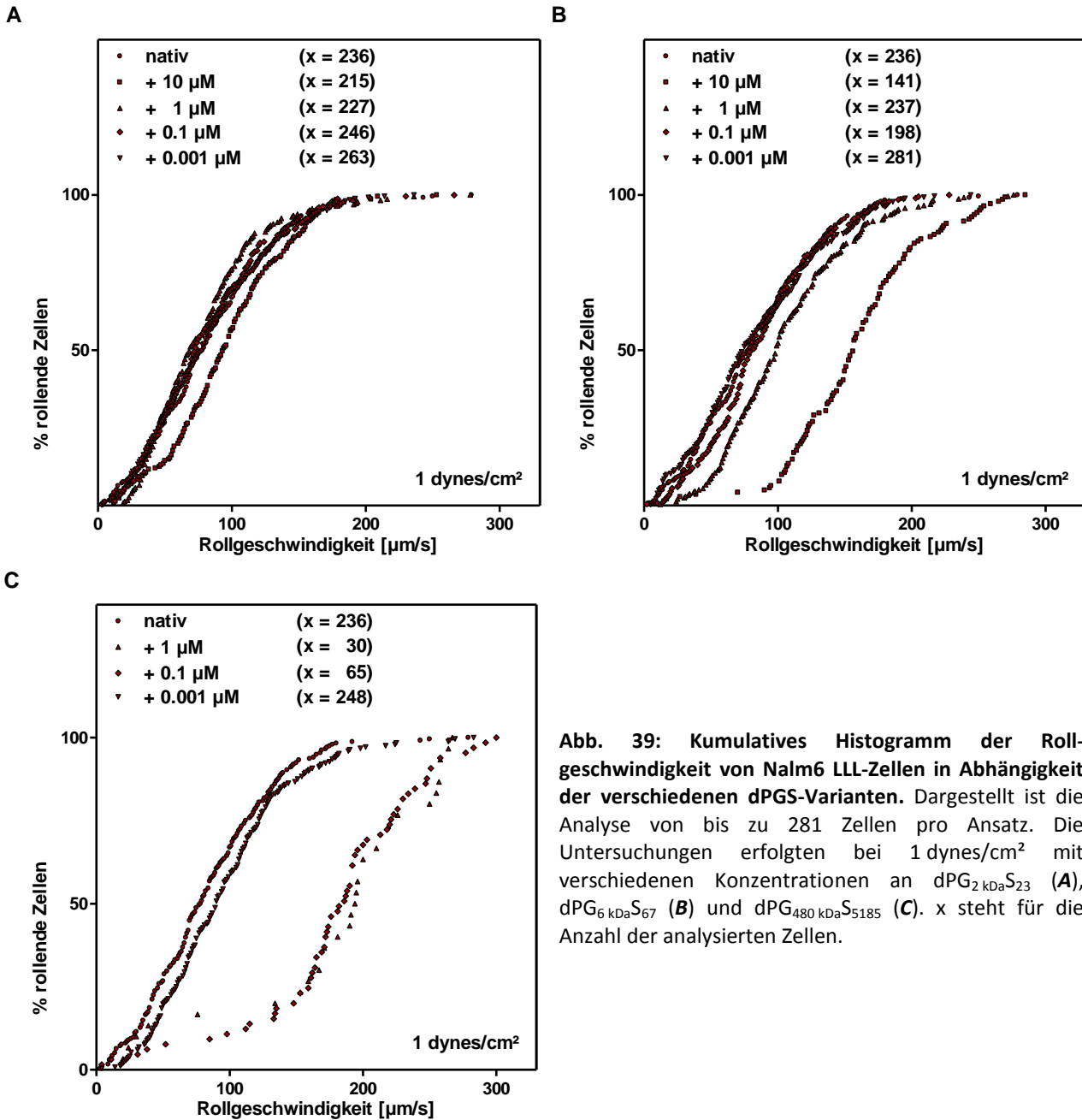


Abb. 39: Kumulatives Histogramm der Rollgeschwindigkeit von Nalm6 LLL-Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen dPGs-Varianten. Dargestellt ist die Analyse von bis zu 281 Zellen pro Ansatz. Die Untersuchungen erfolgten bei 1 dynes/cm² mit verschiedenen Konzentrationen an dPG_{2 kDa}S₂₃ (A), dPG_{6 kDa}S₆₇ (B) und dPG_{480 kDa}S₅₁₈₅ (C). x steht für die Anzahl der analysierten Zellen.

3.5 Vergleich des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf die L-Selektin–Ligand-Interaktion

Vergleicht man die IC_{50} -Werte der Aptamer-Varianten und der verschiedenen dendritischen Polyglycerolsulfate miteinander (Abb. 40), so stellt man fest, dass $dPG_{2\text{ kDa}S_{23}}$ keine inhibitorische Wirkung in dem untersuchten Konzentrationsbereich aufweist. Das dimere Aptamer sowie das sulfatierten Polyglycerole $dPG_{480\text{ kDa}S_{5185}}$ zeigen eine starke Hemmung der L-Selektin–Ligand-Bindung, wobei $dPG_{480\text{ kDa}S_{5185}}$ die stärkste Inhibition mit einem IC_{50} -Wert von 8×10^{-9} M aufweist. $dPG_{6\text{ kDa}S_{67}}$ und das monomere Aptamer weisen dahingegen eine moderate Hemmwirkung auf, wobei das monomere Aptamer einen um eine Zehnerpotenz besseren IC_{50} -Wert aufweist.

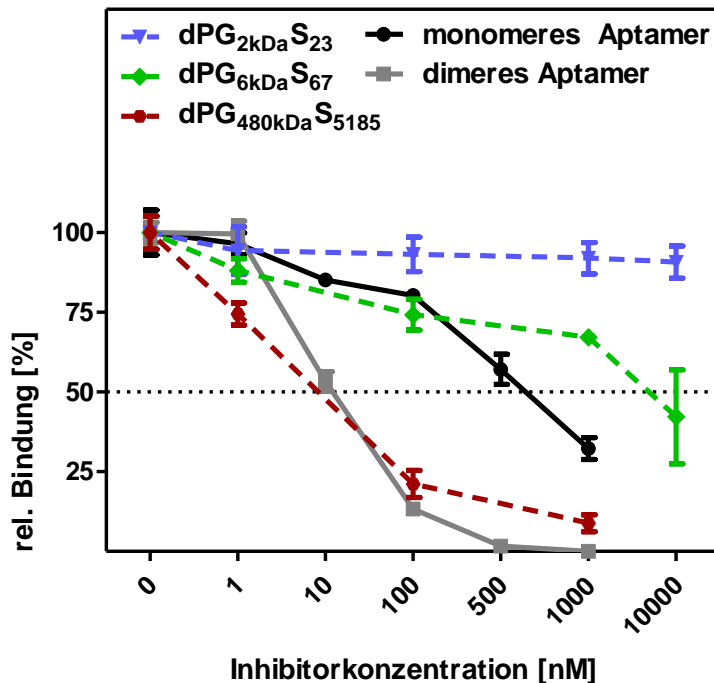


Abb. 40: Bestimmung der IC_{50} -Werte. Zusammenfassende Darstellung der IC_{50} -Werte der getesteten Aptamer-Varianten (*durchgezogene Linie*) und der dendritische Polyglycerolsulfate (*gestrichelte Linie*) auf die L-Selektin–Ligand-Interaktion aus den ermittelten Flux-Daten.

Es ist anzumerken, dass die IC_{50} -Werte visuell aus der Grafik abgelesen wurden. Die einzelnen IC_{50} -Werte sind in Tab. 8 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 8: Zusammenfassung der IC_{50} -Werte der einzelnen eingesetzten Inhibitoren.

Inhibitor	Aptamer-Derivate		dendritische Polyglycerole		
	Monomer	Dimer	$dPG_{2\text{ kDa}S_{23}}$	$dPG_{6\text{ kDa}S_{67}}$	$dPG_{480\text{ kDa}S_{5185}}$
IC_{50} -Wert	0.6×10^{-6} M	12×10^{-9} M	–	5×10^{-6} M	8×10^{-9} M

4 Diskussion

4.1 Modulation der Selektin–Ligand-Interaktion

Die Interaktion der Selektine mit ihren entsprechenden Liganden ist eine Wechselwirkung zwischen der Lektindomäne der Selektine und den vier Monosaccharidresten des sLe^x-Motivs sowie benachbarter Sulfatgruppen, die von den Liganden präsentiert werden. Die Modulation der L-Selektin–Ligand-Interaktion ist von großem medizinischem Interesse, da diese Wechselwirkung das Einwandern von Leukozyten in entzündetes Gewebe steuert. Untersucht wurde die L-Selektin–Ligand-Wechselwirkung in Bindungsstudien unter Flussbedingungen. Dabei wurde versucht, die Wechselwirkung zu beeinflussen durch:

- ♦ die Modifikation der Glykanstrukturen von Rezeptor und Ligand mittels *biochemical glycoengineering*,

sowie durch den Einsatz von

- ♦ Inhibitoren aus der Gruppe der dendritischen Polyglycerolsulfate (dPG_{2 kDa}S₂₃, dPG_{6 kDa}S₆₇ und dPG_{480 kDa}S₅₁₈₅) und verschiedener Varianten von L-Selektin-Aptameren (Monomer und Dimer).

4.1.1 Modifikation der Glykane von Selektinen und Liganden

Mit dem Ziel der Veränderung der Glykosylierung wurden Jurkat T-Zellen mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten peracMNAc, peracMNProp und peracMNCycloProp behandelt. Der natürliche und die beiden artifiziellen Analoga wurden in den Zellen verstoffwechselt und in Glykokonjugate eingebaut. Untersucht wurde der Einfluss des Einbaus der verstoffwechselten Analoga auf das zelluläre Bindungsverhalten des membranständig exprimierten Selektinliganden PSGL-1.

Die Messung des Sialinsäuregehalts der Jurkat T-Zellen nach der Inkubation der Zellen mit den Vorläufern zeigt, dass es zu einem verstärkten Einbau der Neuraminsäuren Neu5Ac, Neu5Prop und Neu5CycloProp in Glykokonjugate kam (Abb. 21). Arbeiten anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass es bei Mannosaminderivaten mit einer Seitenkette an Position C5 erst ab einer

Länge von mehr als sechs C-Atomen zu einer Abnahme der Einbauraten kommt [125]. Diese Ergebnisse konnten für die hier verwendeten Analoga mit kürzeren Seitenketten nicht bestätigt werden. Nach Supplementierung mit peracMNAc, peracMNProp und peracMNCycloProp war der Gehalt an Neu5Prop und Neu5CycloProp (diese Neuraminsäuren haben in ihren Seitenketten drei bzw. vier C-Atome) gegenüber Neu5Ac (zwei C-Atome an Position C5) deutlich geringer. Allerdings war der Gehalt an Neuraminsäure der Zellen bei Supplementierung mit allen Vorläufern deutlich höher als bei den nicht-supplementierten Kontrollzellen.

Unter Zuhilfenahme des mathematischen Modells zur Einberechnung der veränderten Oberflächenexposition von PSGL-1 auf den Jurkat T-Zellen (Abb. 22, Tab. 5), zeigten die Untersuchungen zur Adhäsion, dass die Mannosamin-Vorläuferderivate einen verstärkenden Effekt auf die Adhäsion unter Flussbedingungen haben (Tab. 6). Dies könnte zum Einen an der erhöhten Sialylierung und damit an einem in der Folge möglicherweise vermehrten Gehalt am sLe^x-Motiv liegen, wobei dies nicht spezifisch am Liganden PSGL-1 gezeigt wurde, sondern nur auf der zellulären Ebene. Für eine Verifizierung dieser Aussage müsste man aber in zukünftigen Untersuchungen zwischen dem Gehalt an Sialinsäuren und der Menge des sLex-Motivs nach Supplementierung diskriminieren. Zum Anderen könnte die Verstärkung der Adhäsion auf die Verlängerung der Seitenkette der verwendeten Mannosamin-Vorläufer zurückzuführen sein. Sowohl peracMNProp als auch peracMNCycloProp zeigten eine deutlich stärkere Adhäsion als peracMNAc (basierend auf dem mathematischen Modell). Ohne die genauen Ursachen der erhöhten Adhäsion zu kennen, kann man dennoch darauf schließen, dass die verbesserte Adhäsion der Jurkat T-Zellen auf eine höhere Avidität des P-Selektins zum veränderten PSGL-1 zurückzuführen sein muss. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, dass das immobilisierte P-Selektin nur an PSGL-1 auf den Jurkat T-Zellen bindet, was durch den Einsatz des blockierenden Antikörpers KPL1 als Kontrolle gezeigt wird (Abb. 23). Folglich kommt es möglicherweise in der Folge des verstärkten Einbaus von Neuraminsäure und aufgrund der hydrophoben Seitenketten der Neuraminsäure zu einer verstärkten Bindung von P-Selektin an PSGL-1. Dies konnte für MNAc und MNProp bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden [114]. Supplementiert man HL-60 Zellen mit diesen beiden Monosacchariden, kommt es im Vergleich zu Kontrollzellen unter statischen Bedingungen zu einer vermehrten Adhäsion der Zellen sowohl an P- als auch an E-Selektin. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexposition des sLe^x-Motivs durch die Supplementierung mit den beiden Monosacchariden stark erhöht war. Das

verwendete MNPProp bewirkte im Vergleich zu MNAc einen starken Effekt auf die Präsentation des sLe^x-Motivs. In derselben Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass die Expression des PSGL-1 nicht durch die Mannosamin-Vorläufer beeinflusst wurde. Dies steht im Widerspruch mit den hier gezeigten Daten, da die Durchflusscytometrie zeigte, dass die Oberflächenexposition des PSGL-1 durch die Supplementation verändert wurde (Abb. 22). Es ist allerdings denkbar, dass die hier verwendete T-Zelllinie Jurkat anders auf die Supplementierung mit den Vorläufer-Monosacchariden reagiert als HL-60 Zellen.

In einem zweiten Teil der Untersuchung wurden K562-Zellen, die L-Selektin stabil auf der Zelloberfläche exprimieren (K562 LLL-Zellen), mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten behandelt und die Interaktion der Zellen mit dem gereinigtem und immobilisierten Liganden PSGL-1 unter Flussbedingungen untersucht. Hierbei wurden die Glykane des L-Selektins modifiziert. Ziel war es zu untersuchen, ob die Modifikationen der Glykosylierung des Rezeptors die Ligandenbindung beeinflusst.

Die Untersuchungen der Zellen mittels Durchflusscytometrie zeigten, dass es zu keiner Veränderung der Oberflächenexpression von L-Selektin nach der Supplementierung mit den Vorläufern peracMNAc, peracMNPProp und peracMNCycloProp gekommen ist (Abb. 26). Dies ist ein deutlicher Unterschied gegenüber den zuvor verwendeten Jurkat T-Zellen, bei denen die Expression des PSGL-1 nach der Supplementierung verändert wurde. Ähnlich wie bei den Jurkat T-Zellen kam es in den K562 LLL-Zellen nach Supplementierung mit den Vorläufern zu einer Erhöhung des Gesamtgehalts an Sialinsäuren (Abb. 25). In Analogie zu den Jurkat T-Zellen war auch bei den K562 LLL-Zellen der Effekt nach Supplementierung mit peracMNAc um ein Vielfaches stärker als nach Supplementierung mit peracMNPProp oder peracMNCycloProp.

Es zeigte sich, dass die Supplementierung mit den Mannosamin-Vorläuferderivaten einen deutlichen Einfluss auf die Rezeptor–Ligand-Interaktion unter Flussbedingungen ausübt, obwohl die Glykane von L-Selektin, nach gegenwärtigem Stand des Wissens, nicht direkt an der Bindung beteiligt sind. Die mit den Vorläuferderivaten behandelten K562 LLL-Zellen wiesen dabei einen deutlich geringeren Flux als die entsprechenden Kontrollzellen auf (Abb. 27), was bedeutet, dass die supplementierten Zellen in diesen Versuchen weniger rollen. Dieser Effekt war bei den beiden artifiziellen Mannosamin-Vorläufern stärker ausgeprägt als bei Verwendung des natürlichen Derivates, wobei die Zellen nach Inkubation mit peracMNCycloProp den geringsten

Flux aufwiesen. Das Rollverhalten und die Geschwindigkeit der rollenden Zellen wurde durch die Supplementation nicht beeinflusst (Abb. 28).

Bis heute ist nicht bekannt, ob die Glykane von L-Selektin direkt oder indirekt an der Ligandbindung beteiligt sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen daraufhin, dass die Glykane zumindest einen modulierenden Einfluss auf die Bindung ausüben. Dieser Einfluss könnte durch eine verstärkte Abstoßung zwischen Ligand und L-Selektin aufgrund vermehrter negativer Ladungen der Glykane hervorgerufen werden. Auf der zellulären Ebene könnte dies durch die erhöhte Sialylierung der Oberflächenproteine der Zelle und des an der Bindung beteiligten L-Selektins hervorgerufen werden. In Oberflächenplasmonresonanz-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass rekombinantes L-Selektin, das nach Supplementierung mit MNAc isoliert wurde, eine höhere Sialylierung und eine niedrigere Affinität zum synthetischen Minimalliganden sTyr/sLe^x-PAA aufweist als L-Selektin aus nicht-supplementierten Kontrollzellen [113]. Allerdings kann der hohe Sialylierungsgrad nicht die alleinige Ursache für die beobachtete Veränderung des Fluxs sein (Abb. 27), da die mit peracMNAc supplementierten Zellen zwar eine deutlich höhere Sialylierung jedoch eine nicht so starke Änderung im Flux aufweisen als die mit den artifiziellen Mannosamin-Derivate supplementierten Zellen. Daher hat möglicherweise auch die Struktur der Sialinsäure-Derivate, die bei Supplementierung mit den Mannosamin-Vorläufern entstehen, einen Einfluss auf die L-Selektin-Funktion. Da die Glykane nach heutigem Wissen nicht an der L-Selektin-PSGL-1-Interaktion direkt beteiligt sind, ist es denkbar, dass sie modulierend auf die korrekte Präsentation der Bindungsdomäne wirken. Da solch ein Einfluss für die *EGF-like* Domäne von Selektinen nachgewiesen werden konnte [63, 64], ist es vorstellbar, dass die bis zu sieben Glykane des L-Selektins ebenfalls an der Ausrichtung der Bindungsdomäne beteiligt sind. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungsaffinitäten von Glykosylierungsmutanten von L-Selektin gegenüber dem Minimalliganden sTyr/sLe^x-PAA verringern, je mehr Glykane das L-Selektin trägt [126]. Dies zeigt ebenfalls, dass die Glykane des L-Selektins modulierend auf die Interaktion mit dem Liganden einwirken. Da die Glykosylierung von Proteinen zahlreichen Einflüssen unterworfen ist und bei Entzündung gesetzmäßige Veränderungen aufweist [127], übt die Glykosylierung möglicherweise eine physiologischen Regulationsfunktion auf die Diapedese durch L-Selektin aus.

4.1.2 Untersuchungen zur Inhibition der Funktion von L-Selektin durch dendritische Polyglycerolsulfate

dPG_{2 kDaS₂₃}, dPG_{6 kDaS₆₇} und dPG_{480 kDaS₅₁₈₅} gehören zur Gruppe der dendritischen Polyglycerolsulfate, die erstmalig als Heparin-Analoga beschrieben wurden [97]. Da sie hochsulfatiert sind und Sulfate bei der Selektin–Ligand-Bindung ein entscheidendes Bindungsepitop darstellen, wurden diese drei dPGS-Varianten in der vorliegenden Arbeit als potentielle Inhibitoren der L-Selektin–Ligand-Interaktion untersucht.

Die Untersuchungen in der Flusskammer zeigen klar, dass dPG_{6 kDaS₆₇} und dPG_{480 kDaS₅₁₈₅} die Bindung von L-Selektin an PSGL-1 hemmt. Die Analyse des Flux der Nalm6 LLL-Zellen zeigt bei diesen beiden Substanzen eindeutig eine konzentrationsabhängige Inhibition der L-Selektin-Wechselwirkung mit dem Liganden PSGL-1 (Abb. 37). Dabei konnte ein IC₅₀-Wert von 5×10^{-6} M für dPG_{6 kDaS₆₇} bzw. von 8×10^{-9} M für dPG_{480 kDaS₅₁₈₅} ermittelt werden (Abb. 40). Die kleinere Verbindung dPG_{2 kDaS₂₃} wies hingegen keinerlei inhibitorische Wirkung auf. Neben dPGS hemmen weitere funktionalisierte dendritische Polyglycerole die Selektin–Ligand-Bindung. So konnte gezeigt werden, dass mit Galaktose funktionalisiertes Polyglycerol die Bindung mit einem IC₅₀-Wert von 70 nM hemmt. Eine Sulfatierung der Galaktose verstärkt die Inhibition, für die ein IC₅₀-Wert von etwa 1 nM ermittelt wurde [98]. Diese Werte wurden allerdings mittels Oberflächenplasmonresonanz bestimmt und sind daher nicht mit den hier in der FC ermittelten Ergebnissen vergleichbar. Untersucht man die Inhibition der hier verwendeten sulfatierten Polyglycerole auf die L-Selektin–Ligand-Bindung mittels Oberflächenplasmonresonanz, erhält man IC₅₀-Werte im mittleren nano- bis unteren picomolaren Bereich [128]. Diese mittels Plasmonresonanz ermittelten niedrigeren IC₅₀-Werte lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass in der FC aufgrund der hohen Zellzahl deutlich mehr L-Selektin vorhanden ist, das geblockt werden muss.

Heparin zeigte bei der Messung der Inhibition mittels Plasmonresonanz einen IC₅₀-Wert von etwa 12 µM, der somit deutlich über den Werten liegt, die für die dendritischen Polyglycerole ermittelt wurden. Dies zeigt, welche wirksamen Inhibitoren dPGS bei der Inhibition der L-Selektin–Ligand-Interaktion sind. Die Erhöhung der Rollgeschwindigkeit (Abb. 38) ist ein Resultat der Bindung der dendritischen Polyglycerolsulfate an L-Selektin. Da aufgrund dieser Bindung nur ein

Teil der L-Selektine für eine Interaktion mit PSGL-1 zur Verfügung steht, führt der verminderte Kontakt mit dem Liganden zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit der rollenden Zellen.

Das dPGS-Derivat $\text{dPG}_{6\text{kDaS}_{67}}$ konnte bereits erfolgreich in zwei Entzündungsmodellen, der Kontakt-Dermatitis und dem Komplement-Aktivierungsmodell der Maus, getestet werden. Dabei wurde gezeigt, dass dPGS am Entzündungsherd angereichert wurde und eine starke anti-inflammatorische Wirkung entfaltet. Bis 30 mg/kg Körpergewicht konnte keine cytotoxische Wirkung festgestellt werden [99]. Da bei diesen *in vivo*-Experimenten nur dendritisches Polyglycerolsulfat mit einem 6000 Da Kern / Gerüst, welches mit dem $\text{dPG}_{6\text{kDaS}_{67}}$ vergleichbar ist, untersucht wurde, wäre es interessant, die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten beiden weiteren dendritischen Polyglycerolsulfate ebenfalls *in vivo* zu testen.

4.1.3 Inhibition der L-Selektin-Funktion in Anwesenheit durch DNA-Aptamere

DNA- oder RNA-Aptamere sind kurze einzelsträngige Oligonukleotide, die aufgrund ihrer Struktur spezifisch an bestimmte Liganden binden können [129, 130]. Sie sind leicht zu modifizieren, sind *in vivo* therapeutisch wirksam und weisen nur geringe Nebenwirkungen auf [131-133]. Aptamere sind zwar anfällig gegenüber Nucleasen und werden rasch renal ausgeschieden, allerdings kann ihre Halblebenszeit durch chemische Modifikationen mit Aminoalkyl-Linkern oder Polyethylenglykol (PEG) drastisch verlängert werden [134-136]. Mittlerweile werden verschiedene DNA- bzw. RNA-Aptamere in klinischen Studien untersucht und finden in der Medizin Anwendung wie z.B. Pegaptanib bei altersbedingter Makulardegeneration oder ARC1779 beim Moschcowitz-Syndrom (klinische Phase II) [131].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Aptamer basiert auf einem bereits 1996 erstmals synthetisierten L-Selektin-spezifischen DNA-Aptamer [101]. Durch Struktur-Wirkungsuntersuchungen konnte das ursprünglich 40 Nukleotide umfassende Aptamer auf 28 Basen verkürzt werden. Diese verkürzte Variante zeigt in Bindungsstudien mittels Plasmonresonanzspektroskopie gegenüber dem ursprünglich beschriebenen Aptamer einen nur leicht erhöhten IC_{50} -Wert (unveröffentlichte Daten). Es weist jedoch Vorteile bei der Multimerisierung auf. Das verwendete dimere Aptamer basiert auf diesem verkürzten Aptamer, wobei zwei monomere Einheiten des Aptamers durch neun Adenosine miteinander verknüpft sind. Die Untersuchungen zeigen, dass beide Aptamer-Varianten die Bindung von L-Selektin an den

Liganden PSGL-1 konzentrationsabhängig inhibieren. Dabei wies das Monomer verglichen mit dem Dimer mit einem IC_{50} -Wert von 6×10^{-7} M (Abb. 40) die geringere inhibitorische Wirkung auf. Dieser IC_{50} -Wert liegt deutlich unter dem in der Literatur beschriebenen IC_{50} -Wert von 3 μ M. Bei dieser Konzentration konnte eine 50 %ige Inhibition der Bindung von Neutrophilen an aktivierte *human umbilical vein endothelial cells* und eine 70 %ige Inhibition der entsprechenden Bindung von *peripheral blood mononuclear cells* erreicht werden [101]. Das hier verwendete monomere Aptamer zeigt schon bei etwa 1 μ M eine 70 %ige inhibitorische Wirkung der Bindung von K562 LLL-Zellen an PSGL-1 in der FC. Gegenüber dem monomeren Aptamer wies die dimere Varianten eine deutliche Steigerung dieser Inhibition auf. Dabei lag der IC_{50} -Wert um das 50fache unter dem der monomeren Variante. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte IC_{50} -Wert von 12×10^{-9} M für das Dimer ist deutlich niedriger, als der für ein dimeres L-Selektin Aptamer in der Literatur beschriebene Wert von 1 μ M [137]. Das von dieser Arbeitsgruppe verwendete dimere Aptamer bestand aber aus 39 Basen pro monomerer Variante und wurde über einen Linker bestehend aus 18 Oligonukleotiden dimerisiert. Weiterhin wurde dabei die Neutrophilen-Neutrophilen-Interaktion untersucht, so dass die IC_{50} -Werte nicht ohne weiteres vergleichbar sind.

Die verstärkende Wirkung durch die Dimerisierung der in dieser Arbeit verwendeten Aptamere auf die Inhibition der L-Selektin–Ligand-Bindung konnte auch mittels der Plasmonresonanz gezeigt werden. Dabei wies das Dimer gegenüber dem Monomer einen 26fach niedrigeren IC_{50} -Wert auf (unveröffentlichte Daten).

Der Einfluss einer monomeren Variante des L-Selektin Aptamers auf die Rezirkulation von Lymphozyten in periphere Lymphknoten wurde im Mausmodell untersucht. Dabei konnte ein ED_{50} (effektive Dosis)-Wert von 80 pmol/kg Körpergewicht ermittelt werden [102]. Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung dimerer Aptamere in solch einem System der Lymphozytenrezirkulation liegen bislang noch nicht vor.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der angeborenen Immunreaktion kommt es zum Austritt aktivierter Leukozyten aus dem Blutstrom in entzündetes Gewebe. Bei der Auswanderung (**Extravasation**) werden Leukozyten zuerst eingefangen und verlangsamt (**initialer Kontakt**), um anschließend auf dem Gewebeendothel zu rollen, fest zu adhären und schließlich durch das Endothel hindurch zu wandern, um den Entzündungsherd zu erreichen. Diese gezielte Auswanderung ist ein physiologischer Prozess. Da es durch Persistenz des Antigens bei **chronischen Erkrankungen** zu einem unkontrollierten Auswandern der Leukozyten mit der Folge eines sekundären Gewebeschadens kommt, ist die Möglichkeit der gezielten Hemmung der Extravasation von großem medizinischen Interesse. Ein möglicher Ansatzpunkt ist dabei die Modulierung der **L-Selektin-Ligand-Interaktion**, da L-Selektin, das konstitutiv auf Leukozyten exprimiert wird, eine entscheidende Rolle während des initialen Kontaktes der Leukozyten mit dem Endothel spielt. Diese Interaktion wird durch Bindung der Lektindomäne des L-Selektins an **sLe^x-Motive** und **Sulfatgruppen** endothelialer Liganden vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die L-Selektin-Ligand-Interaktion auf zwei verschiedenen Wegen moduliert, wobei für die Interaktionsstudien initial ein **Flusskammer-Assay** etabliert wurde, mit dem erfolgreich die Zell / Ligand-Interaktion quantifiziert werden konnte.

Erstens wurden in intakten Zellen die Neuraminsäurereste der zellulären Glykoproteine durch Behandlung der Zellen sowohl mit dem natürlichen Mannosamin-Vorläuferderivat peracMNAc, als auch mit den artifiziellen Derivaten peracMNProp und peracMNCycloProp verändert. In diesen modifizierten Zellen wurde untersucht, ob die veränderte Sialylierung zu einer veränderten Interaktion zwischen Selektinen und dem Liganden PSGL-1 kommt.

Die Untersuchungen zeigten, dass es bei allen Behandlungen zu einer Hypersialylierung der Zellen kam, wobei die Behandlung mit peracMNProp bzw. peracMNCycloProp zum Einbau der strukturell veränderten Neuraminsäure *N*-Propanoylneuraminsäure bzw. *N*-Cyclopropyl-carbonyl-Neuraminsäure führte. Weiterhin konnte eine verstärkte Adhäsion der PSGL-1-exprimierenden Zellen an den Liganden P-Selektin nach Supplementierung gemessen werden, die durch den Einbau der artifiziellen Sialinsäuren noch verstärkt wurde. Dahingegen zeigten die

entsprechend behandelten L-Selektin-exprimierenden Zellen aufgrund der Hypersialylierung eine verminderte Interaktion mit dem Liganden PSGL-1. Durch die Behandlung mit den artifiziellen Derivaten kam es dabei zu einer weiteren Verminderung der Interaktion mit PSGL-1.

Zweitens wurden unterschiedliche potentielle L-Selektin-Inhibitoren zur Modulation der Interaktion verwendet: zwei L-Selektin-Aptamere, welche sich in der Anzahl der Bindungsdomäne unterschieden (**Monomer** und **Dimer**) und drei Vertreter aus der Gruppe der dendritischen Polyglycerolsulfate (**dPG_{2 kDa}S₂₃**, **dPG_{6 kDa}S₆₇** und **dPG_{480 kDa}S₅₁₈₅**), die sich in der Größe des Polyglycerolgerüsts und in der Anzahl der funktionalisierten Sulfate unterschieden.

Die dendritischen Polyglycerolsulfate zeigten eine inhibitorische Wirkung auf die L-Selektin–Ligand-Interaktion, wobei sich die gewünschte inhibitorische Wirkung in Abhängigkeit der Anzahl bindungsrelevanter Sulfate einstellte. So konnte eine eindrucksvolle Verbesserung der Inhibition bei Verwendung von dPG_{480 kDa}S₅₁₈₅ um das 1000fache gegenüber dPG_{6 kDa}S₆₇ erzielt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass eine multivalente Präsentation der Bindungs-epitope eine entscheidende Rolle für die Bindung an L-Selektin spielt. Die Bindungsstudien an den DNA-Aptameren konnten dieses Ergebnis untermauern, da die dimere Präsentation des Bindungsepitops zu einer 50fachen besseren inhibitorischen Wirkung gegenüber dem monomeren Aptamer führt.

Diese Resultate zeigen eindeutig, dass eine gezielte Modulation der L-Selektin–Ligand-Interaktion möglich ist und dass mit den dendritischen Polyglycerolsulfaten und den DNA-Aptamer-Varianten neuartige Inhibitoren charakterisiert wurden, die das Potential für eine therapeutische Anwendung besitzen.

6 Abstract

During inflammation leukocytes exit the bloodstream into the site of inflammation (**extravasation**). Therefore, free floating cells are captured by endothelial ligands, slowed down by transient interactions (**initial contact**) and start rolling on the vascular endothelium and attach firmly to pass through the endothelium and to finally access the center of inflammation. This is a desired process during the innate immune response, but in **chronic diseases** extravasation of leukocytes is misregulated and leads to tissue damage. Therefore, it is desirable to regulate the uncontrolled leukocyte migration, e.g. by modulation of the **L-selectin–ligand interaction**. L-selectin, which is constitutively expressed on leukocytes, plays an important role for the initial contact of leukocytes to the endothelium. The binding of L-selectin depends on the interaction of its lectin domain to the endothel ligands containing the **sLe^x-motif** and **sulfate groups**.

In the present study, the modulation of the L-selectin–ligand interaction was studied in two different ways. Initially a **flow chamber assay** was established to quantify the cell / ligand interaction under defined conditions.

In a first step the neuraminic acids of glycoproteins of intact cells were modified by incorporation of the natural mannosamine derivative **peracMNAc** and the unnatural derivatives **peracMNProp** and **peracMNCycloProp**. These modified cells were examined concerning the changes in the interaction between selectins and their ligand PSGL-1.

Analyses confirmed the successful incorporation of the sialic acid derivatives and therefore the hypersialylation of the cells. The treatment with the unnatural derivatives peracMNProp and peracMNCycloProp lead to the integration of the artificial neuraminic acids *N*-propanoyl neuraminic acid and *N*-cyclopropylcarbonyl neuraminic acid into the glycan structures. The modifications lead to improved adhesion of PSGL-1 expressing cells to P-selectin due to a higher incorporation of sialic acids and its derivatives in glycan structures. In contrast, the modification of the L-selectin glycans with the sialic acid derivatives leads to a reduced interaction of L-selectin expressing cells with the ligand PSGL-1.

The second way to modulate L-selectin interactions relied on different potential inhibitors: three different dendritic polyglycerol sulfates (**dPG**_{2 kDa}**S**₂₃, **dPG**_{6 kDa}**S**₆₇ and **dPG**_{480 kDa}**S**₅₁₈₅), which differed in the size of the polyglycerol core and in the amount of sulfate groups, and two L-selectin-aptamers, which differed in the presentation of the L-selectin specific binding epitope (**monomer** and **dimer**).

The application of the polyglycerol sulfates showed significant inhibition dependent on the amount of the binding sulfates on the L-selectin-ligand interaction. This work demonstrates thus an impressive 1000-fold stronger inhibition by **dPG**_{480 kDa}**S**₅₁₈₅ compared to **dPG**_{6 kDa}**S**₆₇. This reflects the important role of multivalent presentation of the binding epitopes for the L-selectin–ligand interaction. The interaction studies with the DNA-aptamers confirmed this observation. Compared to the monomeric aptamer, the dimeric epitope presentation shows a 50-fold (dimer-flex) better inhibition.

These results clearly demonstrate the possibility to modulate the L-selectin-ligand interaction specifically and present the dendritic polyglycerol sulfates and DNA-aptamer variants as novel inhibitors with the potential for a successful therapeutic application.

7 Literatur

1. Springer, T. A., Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 301-14.
2. Ley, K. *et al.*, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-89.
3. Moore, K. L. *et al.*, Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol*, 1992. **118**(2): p. 445-56.
4. Carlow, D. A. *et al.*, PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. *Immunol Rev*, 2009. **230**(1): p. 75-96.
5. Steegmaier, M. *et al.*, The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*, 1995. **373**(6515): p. 615-20.
6. Katayama, Y. *et al.*, CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med*, 2005. **201**(8): p. 1183-9.
7. Baumharter, S. *et al.*, Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*, 1993. **262**(5132): p. 436-8.
8. Dowbenko, D. *et al.*, Structure and chromosomal localization of the murine gene encoding GLYCAM 1. A mucin-like endothelial ligand for L selectin. *J Biol Chem*, 1993. **268**(6): p. 4525-9.
9. Sasseti, C. *et al.*, Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 1965-75.
10. Samulowitz, U. *et al.*, Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope. *Am J Pathol*, 2002. **160**(5): p. 1669-81.
11. Spertini, O. *et al.*, P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol*, 1996. **135**(2): p. 523-31.
12. Rivera-Nieves, J. *et al.*, Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. *J Exp Med*, 2006. **203**(4): p. 907-17.
13. Urzainqui, A. *et al.*, ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity*, 2002. **17**(4): p. 401-12.
14. Abbal, C. *et al.*, Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *Blood*, 2006. **108**(10): p. 3352-9.
15. Zarbock, A. *et al.*, Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity*, 2007. **26**(6): p. 773-83.
16. Simon, S. I. *et al.*, Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol*, 2000. **164**(8): p. 4348-58.
17. Bruehl, R. E. *et al.*, Leukocyte activation induces surface redistribution of P-

- selectin glycoprotein ligand-1. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(4): p. 489-99.
18. Schaff, U. *et al.*, Neutrophil adhesion to E-selectin under shear promotes the redistribution and co-clustering of ADAM17 and its proteolytic substrate L-selectin. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(1): p. 99-105.
 19. Rossy, J. *et al.*, Flotillins interact with PSGL-1 in neutrophils and, upon stimulation, rapidly organize into membrane domains subsequently accumulating in the uropod. *PLoS One*, 2009. **4**(4): p. e5403.
 20. Eriksson, E. E. *et al.*, Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med*, 2001. **194**(2): p. 205-18.
 21. Sperandio, M. *et al.*, P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med*, 2003. **197**(10): p. 1355-63.
 22. Berlin, C. *et al.*, alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, 1995. **80**(3): p. 413-22.
 23. Chan, J. R. *et al.*, Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med*, 2001. **193**(10): p. 1149-58.
 24. Singbartl, K. *et al.*, A CD2-green fluorescence protein-transgenic mouse reveals very late antigen-4-dependent CD8+ lymphocyte rolling in inflamed venules. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7520-6.
 25. Kerfoot, S. M. *et al.*, Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2002. **169**(2): p. 1000-6.
 26. Salas, A. *et al.*, Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity*, 2004. **20**(4): p. 393-406.
 27. Astrof, N. S. *et al.*, Importance of force linkage in mechanochemistry of adhesion receptors. *Biochemistry*, 2006. **45**(50): p. 15020-8.
 28. Huo, Y. *et al.*, Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res*, 2000. **87**(2): p. 153-9.
 29. Vajkoczy, P. *et al.*, Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J Clin Invest*, 2001. **108**(4): p. 557-65.
 30. Sigal, A. *et al.*, The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. *J Immunol*, 2000. **165**(1): p. 442-52.
 31. Kadono, T. *et al.*, Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1

- functions. *J Immunol*, 2002. **169**(8): p. 4542-50.
32. Chesnutt, B. C. *et al.*, Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation*, 2006. **13**(2): p. 99-109.
33. Lo, S. K. *et al.*, Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha m beta 2) on human neutrophils. *J Exp Med*, 1991. **173**(6): p. 1493-500.
34. Dunne, J. L. *et al.*, Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*, 2002. **99**(1): p. 336-41.
35. Schenkel, A. R. *et al.*, Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol*, 2004. **5**(4): p. 393-400.
36. Phillipson, M. *et al.*, Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
37. Feng, D. *et al.*, Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*, 1998. **187**(6): p. 903-15.
38. Staunton, D. E. *et al.*, Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature*, 1989. **339**(6219): p. 61-4.
39. Xie, J. *et al.*, Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J Immunol*, 1995. **155**(7): p. 3619-28.
40. Mamdouh, Z. *et al.*, Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature*, 2003. **421**(6924): p. 748-53.
41. Muller, W. A., Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*, 2003. **24**(6): p. 327-34.
42. Imhof, B. A. *et al.*, Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(6): p. 432-44.
43. Dejana, E., Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(4): p. 261-70.
44. Wegmann, F. *et al.*, ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1671-7.
45. Bixel, M. G. *et al.*, A CD99-related antigen on endothelial cells mediates neutrophil but not lymphocyte extravasation in vivo. *Blood*, 2007. **109**(12): p. 5327-36.
46. Okada, S. *et al.*, Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. **17**(4): p. 519-28.
47. Delclaux, C. *et al.*, Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **14**(3): p. 288-95.
48. Vestweber, D., Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration

- of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev*, 2007. **218**: p. 178-96.
49. Vestweber, D., VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(2): p. 223-32.
50. Vestweber, D. *et al.*, Control of endothelial barrier function by regulating vascular endothelial-cadherin. *Curr Opin Hematol*, 2010. **17**(3): p. 230-6.
51. Kansas, G. S., Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
52. Poppe, L. *et al.*, Conformation of sLex tetrasaccharide, free in solution and bound to E-, P-, and L-selectin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1997. **119**(7): p. 1727-1736.
53. Beauharnois, M. E. *et al.*, Affinity and kinetics of sialyl Lewis-X and core-2 based oligosaccharides binding to L- and P-selectin. *Biochemistry*, 2005. **44**(27): p. 9507-19.
54. Somers, W. S. *et al.*, 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*, 2000. **103**(3): p. 467-79.
55. Kretzschmar, G. *et al.*, Oligosaccharide recognition by selectins: Synthesis and biological activity of multivalent sialyl lewis-X ligands. *Tetrahedron*, 1995. **51**(47): p. 13015-13030.
56. Baisch, G. *et al.*, Chemoenzymatic synthesis of sialyl lewisx glycopeptides. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1996. **35**(16): p. 1812-1815.
57. Bruehl, R. E. *et al.*, Polymerized liposome assemblies: bifunctional macromolecular selectin inhibitors mimicking physiological selectin ligands. *Biochemistry*, 2001. **40**(20): p. 5964-74.
58. Enders, S. *et al.*, Inhibition of L-selectin binding by polyacrylamide-based conjugates under defined flow conditions. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1770**(10): p. 1441-9.
59. Koenig, A. *et al.*, Selectin inhibition: synthesis and evaluation of novel sialylated, sulfated and fucosylated oligosaccharides, including the major capping group of GlyCAM-1. *Glycobiology*, 1997. **7**(1): p. 79-93.
60. Dervedde, J. *et al.*, Inhibition of selectin binding by colloidal gold with functionalized shells. *Chem Commun (Camb)*, 2009(8): p. 932-4.
61. Dwir, O. *et al.*, An activated L-selectin mutant with conserved equilibrium binding properties but enhanced ligand recognition under shear flow. *J Biol Chem*, 2000. **275**(25): p. 18682-91.
62. Kansas, G. S. *et al.*, A role for the epidermal growth factor-like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol*, 1994. **124**(4): p. 609-18.
63. Pigott, R. *et al.*, Structural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leucocyte adhesion molecule-1 using a panel of monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1991. **147**(1): p. 130-5.
64. Gibson, R. M. *et al.*, Lectin and epidermal growth factor domains of P-selectin at physiologic density are the

- recognition unit for leukocyte binding. *Blood*, 1995. **85**(1): p. 151-8.
65. Lou, J. *et al.*, Flow-enhanced adhesion regulated by a selectin interdomain hinge. *J Cell Biol*, 2006. **174**(7): p. 1107-17.
66. Patel, K. D. *et al.*, Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *J Clin Invest*, 1995. **96**(4): p. 1887-96.
67. Lawrence, M. B. *et al.*, Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol*, 1997. **136**(3): p. 717-27.
68. Finger, E. B. *et al.*, Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature*, 1996. **379**(6562): p. 266-9.
69. Chen, S. *et al.*, An automatic braking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear. *J Cell Biol*, 1999. **144**(1): p. 185-200.
70. Yago, T. *et al.*, Transport governs flow-enhanced cell tethering through L-selectin at threshold shear. *Biophys J*, 2007. **92**(1): p. 330-42.
71. Marshall, B. T. *et al.*, Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 2003. **423**(6936): p. 190-3.
72. Yago, T. *et al.*, Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear. *J Cell Biol*, 2004. **166**(6): p. 913-23.
73. Zhu, C. *et al.*, Mechanisms for flow-enhanced cell adhesion. *Ann Biomed Eng*, 2008. **36**(4): p. 604-21.
74. Bruehl, R. E. *et al.*, Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 1996. **44**(8): p. 835-44.
75. Buscher, K. *et al.*, The transmembrane domains of L-selectin and CD44 regulate receptor cell surface positioning and leukocyte adhesion under flow. *J Biol Chem*, 2010. **285**(18): p. 13490-7.
76. von Andrian, U. H. *et al.*, A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell*, 1995. **82**(6): p. 989-99.
77. Sako, D. *et al.*, Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*, 1993. **75**(6): p. 1179-86.
78. Moore, K. L. *et al.*, P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*, 1995. **128**(4): p. 661-71.
79. Leppanen, A. *et al.*, 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*, 2003. **278**(29): p. 26391-400.
80. Goetz, D. J. *et al.*, Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin. *J Cell Biol*, 1997. **137**(2): p. 509-19.
81. Liu, W. *et al.*, Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P-selectin. *J Biol Chem*, 1998. **273**(12): p. 7078-87.

82. Sako, D. *et al.*, A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell*, 1995. **83**(2): p. 323-31.
83. Pouyani, T. *et al.*, PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell*, 1995. **83**(2): p. 333-43.
84. Bernimoulin, M. P. *et al.*, Molecular basis of leukocyte rolling on PSGL-1. Predominant role of core-2 O-glycans and of tyrosine sulfate residue 51. *J Biol Chem*, 2003. **278**(1): p. 37-47.
85. Kishimoto, T. K. *et al.*, Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(6): p. 2244-8.
86. Schön, M. P. *et al.*, Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. *Nat Med*, 2002. **8**(4): p. 366-72.
87. Oostingh, G. J. *et al.*, Diminished lymphocyte adhesion and alleviation of allergic responses by small-molecule- or antibody-mediated inhibition of L-selectin functions. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(1): p. 90-7.
88. Kogan, T. P. *et al.*, Rational design and synthesis of small molecule, non-oligosaccharide selectin inhibitors: (alpha-D-mannopyranosyloxy)biphenyl-substituted carboxylic acids. *J Med Chem*, 1995. **38**(26): p. 4976-84.
89. Kogan, T. P. *et al.*, Novel synthetic inhibitors of selectin-mediated cell adhesion: synthesis of 1,6-bis[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2-alpha-D-mannopyranosyloxy)phenyl]hexane (TBC1269). *J Med Chem*, 1998. **41**(7): p. 1099-111.
90. Romano, S. J. *et al.*, Targeting selectins for the treatment of respiratory diseases. *Curr Opin Investig Drugs*, 2001. **2**(7): p. 907-13.
91. Romano, S. J., Selectin antagonists : therapeutic potential in asthma and COPD. *Treat Respir Med*, 2005. **4**(2): p. 85-94.
92. Kaneider, N. C. *et al.*, Therapeutic targeting of molecules involved in leukocyte-endothelial cell interactions. *FEBS J*, 2006. **273**(19): p. 4416-24.
93. Chang, J. *et al.*, GMI-1070, a novel pan-selectin antagonist, reverses acute vascular occlusions in sickle cell mice. *Blood*, 2010. **116**(10): p. 1779-86.
94. Sunder, A. *et al.*, Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization. *Macromolecules*, 1999. **32**(13): p. 4240-4246.
95. Sunder, A. *et al.*, Hyperbranched Polyether Polyols: A Modular Approach to Complex Polymer Architectures. *Advanced Materials*, 2000. **12**(3): p. 235-239.
96. Frey, H. *et al.*, Dendritic polyglycerol: a new versatile biocompatible-material. *J Biotechnol*, 2002. **90**(3-4): p. 257-67.
97. Türk, H. *et al.*, Dendritic polyglycerol sulfates as new heparin analogues and potent inhibitors of the complement system. *Bioconjug Chem*, 2004. **15**(1): p. 162-7.
98. Papp, I. *et al.*, Modular synthesis of multivalent glycoarchitectures and their

- unique selectin binding behavior. *Chem Commun (Camb)*, 2008(44): p. 5851-3.
99. Dervedde, J. *et al.*, Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(46): p. 19679-84.
100. O'Connell, D. *et al.*, Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 5883-7.
101. Hicke, B. J. *et al.*, DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice. *J Clin Invest*, 1996. **98**(12): p. 2688-92.
102. Watson, S. R. *et al.*, Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000. **10**(2): p. 63-75.
103. Jenison, R. D. *et al.*, Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1998. **8**(4): p. 265-79.
104. Lefer, D. J., Pharmacology of selectin inhibitors in ischemia/reperfusion states. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000. **40**: p. 283-94.
105. Buerke, M. *et al.*, Humanized monoclonal antibody DREG-200 directed against I-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **271**(1): p. 134-42.
106. Kayser, H. *et al.*, Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *J Biol Chem*, 1992. **267**(24): p. 16934-8.
107. Keppler, O. T. *et al.*, Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology*, 2001. **11**(2): p. 11R-18R.
108. Campbell, C. T. *et al.*, Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions. *Mol Biosyst*, 2007. **3**(3): p. 187-94.
109. Bork, K. *et al.*, Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway. *J Pharm Sci*, 2009. **98**(10): p. 3499-508.
110. Schmidt, C. *et al.*, Biochemical engineering of neural cell surfaces by the synthetic N-propanoyl-substituted neuraminic acid precursor. *J Biol Chem*, 1998. **273**(30): p. 19146-52.
111. Reutter, W. *et al.*, Biochemical engineering by new N-Acylmannosamines of sialic acids creates new biological characteristics and technical tools of its N-acyl side chain. In: Y. Inoue, Y.C. Lee and F.A. Troy II (eds.), *Sialobiology and other forms of glycosylation*, 1999: p. 281-288.
112. Wieser, J. R. *et al.*, In vivo modulated N-acyl side chain of N-acetylneuraminic acid modulates the cell contact-dependent inhibition of growth. *FEBS Lett*, 1996. **395**(2-3): p. 170-3.
113. Enders, S. *et al.*, Binding activity of recombinant human L-selectin-Fc is modified by sialylation. *Biochemical Engineering Journal*, 2009. **48**(2): p. 253-259.

114. Horstkorte, R. *et al.*, Increased expression of the selectin ligand sialyl-Lewis(x) by biochemical engineering of sialic acids. *Exp Cell Res*, 2004. **295**(2): p. 549-54.
115. Jones, M. B. *et al.*, Characterization of the cellular uptake and metabolic conversion of acetylated N-acetylmannosamine (ManNAc) analogues to sialic acids. *Biotechnol Bioeng*, 2004. **85**(4): p. 394-405.
116. Jourdian, G. W. *et al.*, The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J Biol Chem*, 1971. **246**(2): p. 430-5.
117. Gröbe, D., Biochemische Modifikation von Glykan-Strukturen durch nicht natürliche Monosaccharide und ihr Einfluss auf die Sialidase-Resistenz. *Dissertationsschrift*, 2008.
118. Tu, L. *et al.*, L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity. *J Immunol*, 1996. **157**(9): p. 3995-4004.
119. Forlow, S. B. *et al.*, Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*, 2000. **95**(4): p. 1317-23.
120. Takalkar, A. M. *et al.*, Binding and detachment dynamics of microbubbles targeted to P-selectin under controlled shear flow. *J Control Release*, 2004. **96**(3): p. 473-82.
121. Snapp, K. R. *et al.*, A novel P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody recognizes an epitope within the tyrosine sulfate motif of human PSGL-1 and blocks recognition of both P- and L-selectin. *Blood*, 1998. **91**(1): p. 154-64.
122. Lasky, L. A. *et al.*, Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell*, 1989. **56**(6): p. 1045-55.
123. Siegelman, M. H. *et al.*, Human homologue of mouse lymph node homing receptor: evolutionary conservation at tandem cell interaction domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(14): p. 5562-6.
124. Enders, S., Hemmung des Adhäsionsrezeptors L-Selektin - Charakterisierung inhibitorischer Oligosaccharide und Glykomimetika. *Dissertationsschrift*, 2007.
125. Jacobs, C. L. *et al.*, Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 2001. **40**(43): p. 12864-74.
126. Wedepohl, S., Struktur und Funktion des Adhäsionsrezeptors L-Selektin. *Dissertationsschrift*, 2010.
127. Oefner, C. M. *et al.*, Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **129**(6): p. 1647-55 e13.
128. Weinhart, M. *et al.*, The role of dimension in multivalent binding events: structure-activity relationship of dendritic polyglycerol sulfate binding to L-selectin in correlation with size and surface charge density. *Macromol Biosci*, 2011. **11**(8): p. 1088-98.

129. Ellington, A. D. *et al.*, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
130. Gold, L., Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J Biol Chem*, 1995. **270**(23): p. 13581-4.
131. Thiel, K. W. *et al.*, Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides*, 2009. **19**(3): p. 209-22.
132. Syed, M. A. *et al.*, Advances in aptamers. *Oligonucleotides*, 2010. **20**(5): p. 215-24.
133. Bouchard, P. R. *et al.*, Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010. **50**: p. 237-57.
134. Healy, J. M. *et al.*, Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res*, 2004. **21**(12): p. 2234-46.
135. Boomer, R. M. *et al.*, Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues. *Oligonucleotides*, 2005. **15**(3): p. 183-95.
136. Matsuda, A., [Development of highly nuclease-resistant chemically-modified oligonucleotides]. *Yakugaku Zasshi*, 2011. **131**(2): p. 285-98.
137. Ringquist, S. *et al.*, Anti-L-selectin oligonucleotide ligands recognize CD62L-positive leukocytes: binding affinity and specificity of univalent and bivalent ligands. *Cytometry*, 1998. **33**(4): p. 394-405.

8 Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
dPGS	dendritisches Polyglycerolsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ESAM	<i>endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
FC	Flusskammer
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FoV	<i>field of view</i>
Fuc	Fucose
G418	Geneticin
Gal	Galaktose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GlyCAM-1	<i>glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> (mit 1.26 mM Ca ²⁺)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICAM-1 (2)	<i>intracellular adhesion molecule-1 (2)</i>
IgG	Immunglobulin G
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MNAc, ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>

MNCycloProp	<i>N</i> -Cyclopropylcarbonylmannosamin
MNProp	<i>N</i> -Propanoylmannosamin
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
PAA	Polyacrylamid
PBS ^{+/+}	<i>phosphate buffered saline</i> (mit 0.89 mM Ca ²⁺)
PE	Phycoerythrin (Emission bei 575 nm)
PECAM-1	<i>platelet / endothelial-cell adhesion molecule-1</i>
perac	peracetyliert
PSGL-1	P-Selektin Glykoproteinligand-1
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1640
scr	<i>short consensus repeat</i>
sLe ^x	sialyl Lewis X
sTyr/sLe ^x -PAA	sulfo Tyrosin / sialyl Lewis X-Polyacrylamid
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit Tween 20
TBE	Tris / Borat / EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris-hydroxymethylaminoethan
Triton-X 100	T-octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
x × g	x-faches der Erdbeschleunigung

9 Anhang

Der *shear stress* τ ist eine physikalische Größe, welche von der Flussrate ϕ und den Dimensionen des Flusskanals abhängt, wobei ϕ abhängig von der Viskosität der Lösung und vom angelegten Druck ist. τ wird in dyn/cm^2 und ϕ in ml/min angegeben.

Da wässrige Lösungen sogenannte Newtonsche Flüssigkeiten sind, besteht eine lineare Beziehung zwischen dem *shear stress* τ und der Flussrate ϕ , die durch die Proportionalitätskonstante η (dynamische Viskosität) beschrieben wird:

$$\tau = \eta * \gamma$$
$$\text{mit } \gamma = \frac{dv}{dy}$$

wobei γ für die *shear rate*, v für die Strömungsgeschwindigkeit und y für die Ortskoordinate normal zur Wand steht. In der hier verwendeten Flusskammer μ -Slide VI von der Firma ibidi lässt sich dieser Zusammenhang wie folgt darstellen:

$$\tau [\text{dyn/cm}^2] = 1.761 \phi [\text{ml/min}]$$

Dies bedeutet nichts anderes, als dass die Flussrate auf 0.57 ml/min eingestellt werden muss, um einen *shear stress* von 1 dynes/cm^2 zu erhalten. In Abb. 41 ist dieser Zusammenhang grafisch dargestellt:

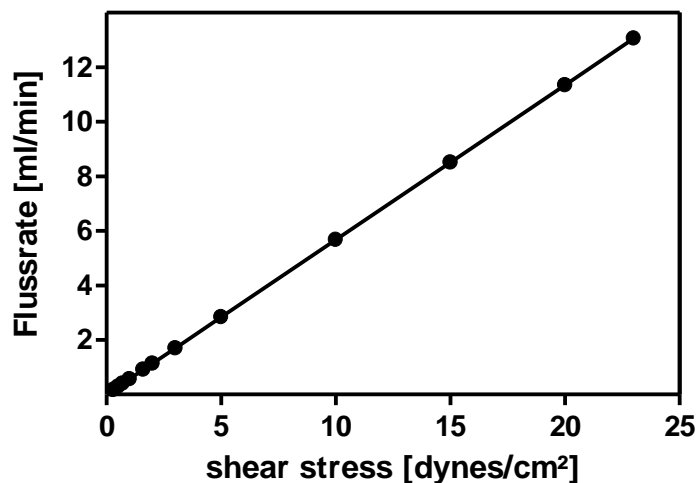


Abb. 41: Zusammenhang zwischen Flussrate und *shear stress*. Gezeigt ist der lineare Zusammenhang zwischen dem *shear stress* und der Flussrate in der Flusskammer μ -Slide VI von ibidi.

Betrachtet man das Strömungsprofil (Abb. 42), welches in einer Flusskammer besteht, erkennt man, dass der maximale *shear stress* im Zentrum zu finden ist (helle Bereiche). Er nimmt nach außen hin kontinuierlich ab und verschwindet zu den Ecken der Flusskammer (graue bis dunkle Bereiche). Dies zeigt, wie stark der *shear stress* von dem Aufbau des Flusskanals abhängig ist und wie entscheidend es ist, für die mikroskopischen Aufnahmen den korrekten Bildausschnitt zu wählen. Dies zeigt auch Abb. 43, in der dargestellt ist, wo in der Kammer ein homogener *shear stress* existiert.

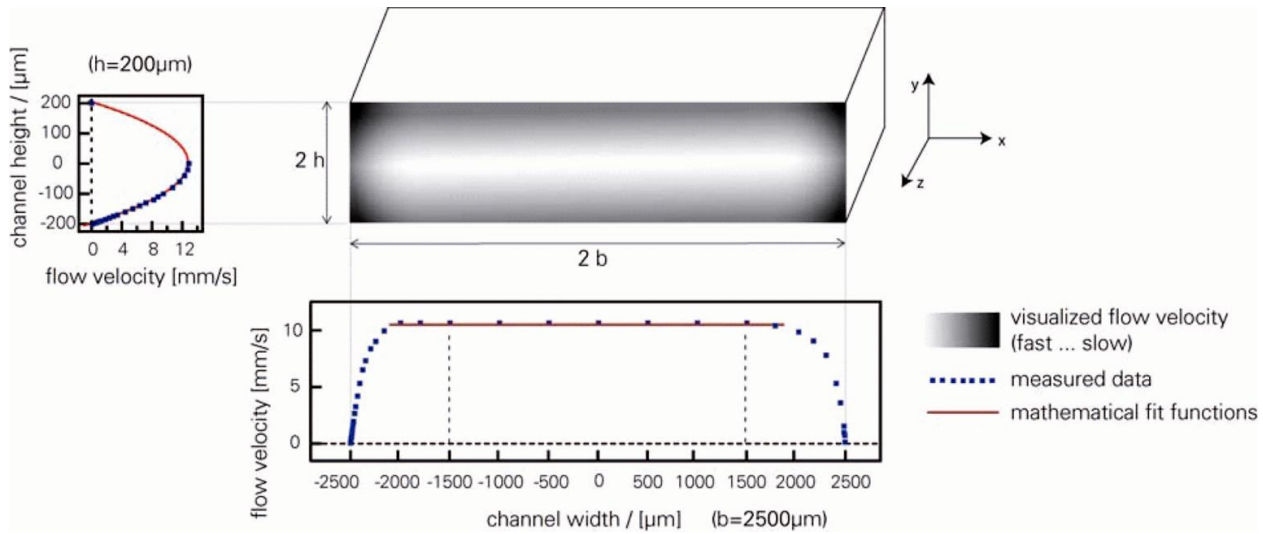


Abb. 42: Strömungsprofil in der Flusskammer. Dargestellt ist ein vertikaler Schnitt durch die Flusskammer, wobei h die Höhe und b die Breite der Kammer widerspiegelt. Schwarz steht für Bereiche mit der geringsten Geschwindigkeit und weiß für die maximale. Grau spiegelt die Abstufungen dazwischen wider (Abbildung von ibidi).

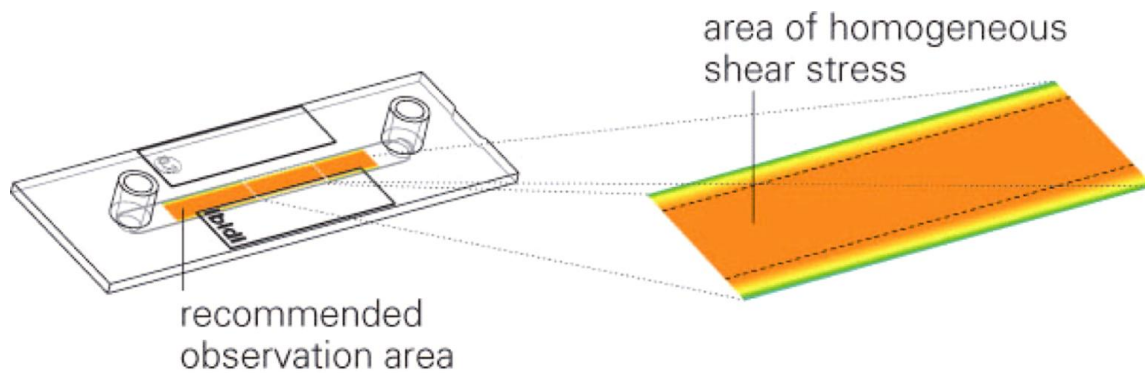


Abb. 43: Homogener *shear stress*. In orange ist der Bereich dargestellt, in dem ein homogener *shear stress* vorhanden ist. Dies ist auch der Bereich, in dem man mikroskopische Aufnahmen durchführen sollte (Abbildung von ibidi).

10 Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

11 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten (in Fachzeitschriften)

Scheibe C, Wedepohl S, **Riese SB**, Dervedde J, Seitz O
Carbohydrate-PNA and aptamer-PNA conjugates for the spatial screening of lectins and lectin assemblies

ChemBioChem **14**, 236–250 (2013)

Weng A, Thakur M, Beceren-Braun F, Bachran D, Bachran C, **Riese SB**, Jenett-Siems K, Gilbert-Oriol R, Melzig MF, Fuchs H

The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins

Molecular Oncology **6**, 323–332 (2012)

Wedepohl S, Beceren-Braun F, **Riese SB**, Buscher K, Enders S, Bernhard G, Kilian K, Blanchard V, Dervedde J, Tauber R

L-selectin – a dynamic regulator of leukocyte migration

European Journal of Cell Biology **91**, 257–264 (2012)

Thakur M, Weng A, Bachran D, **Riese SB**, Boettger S, Melzig MF, Fuchs H

Electrophoretic isolation of saponin fractions from Saponinum album and their evaluation in synergistically enhancing the receptor-specific cytotoxicity of targeted toxins

Electrophoresis **32**, 3085–3089 (2011)

Weinhart M, Gröger D, Enders S, **Riese SB**, Dervedde J, Kainthan RK, Brooks DE, Haag R

The Role of Dimension in Multivalent Binding Events: Structure-Activity Relationship of Dendritic Polyglycerol Sulfate Binding to L-selectin in Correlation with Size and Surface Charge Density

Macromolecular Bioscience **11**, 1088–1098 (2011)

Papp I, Dervedde J, Enders S, **Riese SB**, Shiao TC, Roy R, Haag R

Multivalent Presentation of Mannose on Hyperbranched Polyglycerol and their Interaction with Concanavalin A Lectin

ChemBioChem **12**, 1075–1083 (2011)

Bachran C, Schneider S, **Riese SB**, Bachran D, Urban R, Schellmann N, Zahn C, Sutherland M, Fuchs H

A lysine-free mutant of epidermal growth factor as targeting moiety of a targeted toxin

Life Sciences **88**, 226–232 (2011)

Wedepohl S, Kaup M, **Riese SB**, Berger M, Dervedde J, Tauber R, Blanchard V
N-Glycan analysis of recombinant L-selectin reveals sulfated GalNAc and GalNAc-GalNAc motifs
Journal of Proteome Research **9**, 3403–3411 (2010)

Buscher K, **Riese SB**, Shakibaei M, Reich C, Dervedde J, Tauber R, Ley K
The transmembrane domains of L-selectin and CD44 regulate receptor cell surface positioning and leukocyte adhesion under flow
Journal of Biological Chemistry **285**, 13490–13497 (2010)

Enders S, **Riese SB**, Bernhard G, Dervedde J, Reutter W, Tauber R
Binding activity of recombinant human L-selectin Fc is modified by sialylation
Biochemical Engineering Journal **48**, 253–259 (2010)

Bachran C, Weng A, Bachran D, **Riese SB**, Schellmann N, Melzig MF, Fuchs H
The distribution of saponins in vivo affects their synergy with chimeric toxins against tumours expressing human epidermal growth factor receptors in mice
British Journal of Pharmacology **159**, 345–352 (2010)

Publikation in Buchform

Riese S

Entwicklung und Charakterisierung von Inhibitoren der L-Selektin-vermittelten Leukozyten-adhäsion
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität Berlin (2005)

Vorträge (Vortragender unterstrichen)

Riese SB

Modulation of the L-selectin–ligand interaction
Minisymposium FU-Berlin / MESA+, 5. Juni 2012

Buscher K, **Riese SB**, Shakibaei M, Dervedde J, Tauber R, Ley K
Cell surface Positioning of L-selectin and CD44 depends on their Transmembrane Domains
IFCC-WorldLab Berlin 2011, 15–19. Mai 2011
Postervorstellung im Rahmen einer moderierten Posterführung

Abstracts in Fachzeitschriften

Buscher K, **Riese SB**, Shakibaei M, Dervedde J, Tauber R, Ley K
Cell surface Positioning of L-selectin and CD44 depends on their Transmembrane Domains
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **49** (2011)

Wedepohl S, Kaup M, **Riese SB**, Berger M, Dervedde J, Tauber R, Blanchard V
Analysis of N-Glycans of the adhesion receptor L-selectin
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **48** (2010)

Riese SB, Thamm S, Zimmermann-Kordmann M, Dervedde J, Tauber R
Expression of alpha-1-acid glycoprotein as a model protein for biochemical glycoengineering
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **44** (2006)

Abstracts in Tagungsbänden / Konferenzteilnahmen (aktiv) (präsentierender Autor unterstrichen)

Riese SB, Weinhart M, Gröger D, Tauber R, Haag R, Dervedde J
Modulation of the L-selectin–ligand interaction via multivalent inhibitors under flow
Minisymposium FU-Berlin / MESA+, 5. Juni 2012

Riese SB, Weinhart M, Gröger D, Tauber R, Haag R, Dervedde J
Modulation of the L-selectin–ligand interaction via multivalent inhibitors under flow
Münster Symposium on Cooperative Effects in Chemistry (MSCEC 2012), 4. Mai 2012

Buscher K, Riese SB, Shakibaei M, Dervedde J, Tauber R, Ley K
The Transmembrane Domain of L-selectin is responsible for Microvillus Positioning
5th Amsterdam Zoo Meeting, 11–14. Mai 2011

Wedepohl S, Kaup M, **Riese SB**, Berger M, Dervedde J, Tauber R, Blanchard V
N-Glycans of L-selectin are protein specific and contain sulfated GalNAc
The 5th Glycan Forum in Berlin, 10–12. März 2011

Buscher K, Riese SB, Shakibaei M, Dervedde J, Ley K, Tauber R
Receptor Topology of L-selectin and CD44 is determined by the Transmembrane Domains
From Protein Structure to Membrane Dynamics, 2–3. Dezember 2010

Enders S, **Riese SB**, Tauber R, Dervedde J
Selectin-Ligand Interaction
1st Internationale Symposium of the SFB 765, 14–15. Oktober 2010

Enders S, Riese SB, Tauber R, Dervedde J
Selectin-Ligand Interactions
2. SFB 765 Workshop, 9. Februar 2010

Wedepohl S, Beceren-Braun E, Buscher K, **Riese SB**, Dervedde J, Tauber R
Structure and function of the adhesion receptor L-selectin
Membrane and Modules, 10–13. Dezember 2009

Buscher K, Riese SB, Shakibaei M, Dervedde J, Tauber R

The Adhesion Receptor L-selectin: Microvillus positioning and Leukocyte Adhesion under Flow is Regulated by the Transmembrane Domain

European Congress of Immunology (ECI), 13–16. September 2009

Riese SB, Buscher K, Enders S, Tauber R, Dervedde J

Expression of multimeric selectins for binding studies and characterization of selectin-ligand interactions in a flow chamber system

1st Doctoral Students Workshop Dahlem Research School "Molecular Science", 17. Februar 2009

Enders S, Riese SB, Tauber R, Dervedde J

Selectin-Ligand Interactions

1. SFB 765 Workshop, 27. Januar 2009

Riese SB, Thamm S, Gröbe D, Repschläger I, Dervedde J, Tauber R

Expression of alpha-1-acid glycoprotein as a model protein for biochemical glycoengineering

The 3rd Glycan Forum in Berlin, 22–23. Februar 2007

Konferenzteilnahmen (passiv)

Migration and Regulation: Managing immune-mediated diseases, 03/12

8th Fabisch Symposium: 3rd International Symposium on Targeted Tumor Therapies, 03/12

4th Fabisch Symposium: 2nd International Symposium on Targeted Tumor Therapies, 04/09

The 4th Glycan Forum in Berlin, 05/08

Targets, Drugs and Carriers, 05/07

International Symposium on Polymer Therapeutics ISPT-07, 02/07

Understanding Structure–Function Relationships in Membrane Proteins, 10/06

2nd Fabisch Symposium: 1st International Symposium on Targeted Tumor Therapies, 03/06

The 2nd Glycan Forum in Berlin, 11/05

9th International Dahlem Symposium on Cellular Signal Recognition and Transduction, 10/05

Innovationsforum: Glykane – neuartige Basisstrukturen in Therapie und Diagnose, 12/04

12 Danksagung

Prof. Dr. Rudolf Tauber danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut diese Arbeit durchzuführen. Prof. Dr. Rainer Haag danke ich für die sehr freundliche und schnelle Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jens Dervedde für seine außerordentliche Hilfe, mit der er erheblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat. Mit deiner wertvollen Unterstützung sowohl in praktischen als auch in theoretischen Belangen, konntest du mir stets weiterhelfen.

Den Selektinen, den Proxinen, den ehemaligen Cadherinen, den Glykos und den 765ern danke ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit.

Bei Luise und Christel möchte ich mich für ihre Arbeiten aus dem Hintergrund heraus bedanken. Euer beider Wirken trug zu einem sehr reibungslosen Arbeitsalltag bei. Außerdem sind frühmorgendliche Kaffeerunden unerlässlich für einen guten Start in den Tag.

Stefanie, dein kritisches Wesen ist unerlässlich für ein gutes Forscherleben, danke.

Jörg, danke für das Pizzaessen spätabends im *lab*. Damit relativiert sich so mancher Arbeitstag.

Kai, Max und Sonni, danke, dass ihr immer so bemüht wart, mir zu zeigen, dass es auch ein Leben außerhalb des Labors gibt.

Ronny, ohne es zu Wissen hast du mit viel Witz für so manche Entspannung gesorgt, danke.

Konrad und Tobi, meine beiden Lieblings-Medis. Ich hab unheimlich viel von euch gelernt. Danke für eure unbezahlbare Unterstützung!

Christopher, Silke, Diana und Christian, dankeschön! Danke für eure Hilfe und eure unendliche Geduld mit mir...

Schlussendlich möchte ich mich natürlich bei meiner Familie bedanken, die mir das alles ermöglicht hat.

...DANKE