

Hemmung des Adhäsionsrezeptors L-Selektin – Charakterisierung inhibitorischer Oligosaccharide und Glykomimetika

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

Dipl.-Biol. Sven Enders

Berlin, Oktober 2007

Die praktischen Arbeiten wurden am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Tauber angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Tauber
Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
Institut für Biologie
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Freie Universität Berlin

Disputation am 20.12.2007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof Dr. Rudolf Tauber für die Möglichkeit die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, für seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft und dafür, dass er die Finanzierung der Arbeit jederzeit sichergestellt hat.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel.

Ganz besonders herzlichen Dank gebührt Dr. Gesche Bernhard, die mir in der ganzen Zeit mit wissenschaftlichem Rat zur Seite stand und ein stets aktiver Diskussionspartner war. Ohne ihre Unterstützung wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit und den zahlreichen Diskussionsbeiträgen möchte ich mich herzlich bei Dr. Jens Dervedde, Dr. Karin Kilian, Stefanie Wedepohl, Sebastian Riese, Susanne Thamm und Figen Beceren-Braun bedanken. Sie standen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Allen namentlich nicht aufgeführten Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die rege Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima danken, was dazu beigetragen hat, dass mir die Arbeit viel Spass gemacht hat.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, allen voran meiner Frau Marinca. Ich glaube, sie hat unter manch langen Abenden im Institut stärker gelitten als ich. Für ihr jederzeit vorhandenes Verständnis bin ich sehr dankbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Biologie und Bedeutung von Zellkontakten.....	1
1.2	Zelladhäsion im Immunsystem	2
1.3	Die Adhäsionskaskade der Leukocyten	2
1.3.1	Die Adhäsionsmoleküle der leukocytären Adhäsionskaskade	4
1.3.1.1	Immunglobulin-Superfamilie.....	5
1.3.1.2	Integrine.....	5
1.3.1.3	Sialomuzine	6
1.4	Selektine.....	7
1.4.1	Expression der Selektine.....	7
1.4.2	Die Funktion der Selektinmodule	8
1.4.3	Struktur der Selektine	9
1.4.4	Glykosylierung der Selektine	10
1.4.5	Die homotypische Leukocytenadhäsion	11
1.4.6	Liganden der Selektine.....	12
1.4.6.1	Der Minimalligand Sialyl Lewis x	12
1.4.6.2	Proteinliganden.....	13
1.4.6.2.1	Glykosyl- und Sulfotransferasen.....	15
1.5	An der Entzündungsreaktion beteiligte Leukocyten	16
1.6	Die Entwicklung therapeutischer Selektinantagonisten	18
1.7	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material.....	22
2.1.2	Geräte	22
2.1.2.1	PCR und Elektrophorese	22
2.1.2.2	Western Blot und Filmentwicklung	22
2.1.2.3	Zentrifugen.....	22
2.1.2.4	Photometer	22
2.1.2.5	Zellkultur	22
2.1.2.6	Sonstige Geräte.....	23
2.1.3	Chemikalien und Lösungen	23
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	23

2.2	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1	Vektoren.....	24
2.2.2	Oligonukleotide	25
2.2.3	Bakterienkultur	27
2.2.4	Nukleinsäure-Grundtechniken	28
2.2.4.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.2.4.2	PCR.....	28
2.2.4.3	RNA-Isolierung	29
2.2.4.4	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	30
2.2.4.5	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	31
2.2.4.6	Reinigung, Umpufferung und Konzentrierung von DNA	31
2.2.4.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	32
2.2.4.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen.....	32
2.2.4.9	Dephosphorylierung von DNA.....	32
2.2.4.10	Ligation von DNA.....	33
2.2.5	Transformation in <i>E. coli</i>	33
2.2.5.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	33
2.2.5.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen	34
2.2.6	Plasmidisolierung	34
2.2.6.1	<i>Small Scale</i> -Isolation	34
2.2.6.2	<i>Large Scale</i> -Isolation	35
2.2.7	DNA-Sequenzierung	35
2.2.8	Lagerung von <i>E. coli</i> in Glycerin	36
2.3	Proteinbiochemische Methoden	36
2.3.1	Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein A	36
2.3.2	Proteinaufreinigung mittels Protein A-Sepharose-Affinitätschromatographie.....	37
2.3.3	Proteinaufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie.....	37
2.3.4	Proteinaufreinigung mittels Ligandenaffinitätschromatographie.....	38
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
2.3.5.1	BCA-Test.....	39
2.3.5.2	ELISA	39

2.3.6	Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen	40
2.3.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.3.8	Silberfärbung von SDS-Gelen	41
2.3.9	Western Blot und Immunodetektion	42
2.3.10	Größenausschlusschromatographie	43
2.3.11	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	44
2.4	Glykananalytische Methoden	48
2.4.1	Nachweis von gebundenen Sialinsäuren	48
2.5	Zellbiologische Methoden	50
2.5.1	Zellkultur	50
2.5.1.1	CHO-Zellen	50
2.5.1.2	K-562- und NALM-6-Zellen	50
2.5.1.3	KG1a-Zellen	51
2.5.2	Einfrieren und Auftauen von Kryokulturen	52
2.5.3	Anreicherung L-Selektin-transfizierter NALM-6-Zellen	52
2.5.4	Transfektion und Proteinexpression in eukaryontischen Zelllinien	53
2.5.4.1	CHO-Zellen	53
2.5.4.2	KG1a-Zellen	54
2.5.5	<i>Fluorescent activated cell sorter</i> (FACS)	58
2.5.6	Flusskammer	59
3	Ergebnisse	61
3.1	Etablierung eines SPR-Bindungsassays – Ermittlung des Assayaufbaus	61
3.1.1	Erhöhung der Bindungswerten von L-Selektin	61
3.1.1.1	Polyvalenz mittels Antikörper- <i>Crosslinking</i>	62
3.1.1.2	Multivalenz durch Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel	63
3.2	Etablierung eines SPR-Bindungsassays – Bestimmung der Assaybedingungen	65
3.2.1	Ermittlung einer geeigneten L-Selektin-IgG-Charge	65
3.2.2	Rekombinantes L-Selektin-IgG – Analyse der Lagerungsstabilität....	66
3.2.3	Charakterisierung des Sialinsäureanteils von L-Selektin durch Neuraminidaseverdau	68

3.2.4	Der Einfluss von Sialinsäuren auf die Bindung von L-Selektin.....	70
3.2.5	Ermittlung der beim Assay einzusetzenden L-Selektin-IgG-Konzentration	72
3.2.6	Ermittlung eines geeigneten Probenvolumens.....	73
3.2.7	Ermittlung des optimalen pH-Wertes des Bindungspuffers	74
3.2.8	Ermittlung der optimalen Ca ²⁺ -Konzentration.....	74
3.2.9	Zusammenfassung.....	75
3.3	Untersuchungen zur Hemmung der Bindung von L-Selektin-IgG – Messungen mittels SPR.....	76
3.3.1	Vorversuche	76
3.3.1.1	Untersuchung zum Einfluss von Lösungsmittel	76
3.3.1.2	Eigenschaften des standardisierten SPR-Bindungsassays für die Charakterisierung von Inhibitoren der L-Selektin-Bindung.....	77
3.3.2	Untersuchungen zur Hemmwirkung von PAA-basierten Ligandenkonjugaten	79
3.3.2.1	SiaLe ^x und SiaLe ^a : Vergleich von Monomer zu multivalenten Formen	79
3.3.2.2	Vergleich Monoligand- zu Biligandpolymer	81
3.3.2.3	Multivalente Tyrosinsulfate auf PAA.....	82
3.3.2.4	Synergistische Effekte der inhibitorischen Wirkung.....	83
3.3.2.5	Zusammenfassung	85
3.3.3	Hemmung von Selektinen durch Efomycin M.....	85
3.3.3.1	Hemmung von L-Selektin.....	85
3.3.3.2	Hemmung von P- und E-Selektin.....	87
3.3.3.3	Lösungsmiteleinfluss auf die Aktivität von Efomycin M.....	88
3.3.3.4	Zusammenfassung	89
3.3.4	Untersuchungen zur Hemmwirkung von Diadenosinpolyphosphaten.....	89
3.3.5	Untersuchungen zur Hemmwirkung von dendritischen Polyglycerolsulfaten (dPGS).....	92
3.3.5.1	Hemmwirkung von dPGS.....	92

3.3.5.2	Vergleich der Hemmwirkung von dPGS auf die Bindungsfunktion von L-, P- und E-Selektin.....	93
3.3.5.3	Die Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Sulfatierungsgrad	94
3.4	Untersuchungen zur Hemmung der Bindung von L-Selektin an intakten Zellen – Messungen in der Flusskammer	96
3.4.1	Expression von L-Selektin auf transfizierten NALM-6-Zellen	96
3.4.2	TNF- α induzierte Expression von L-Selektin-Liganden auf HUVECs	98
3.4.3	Eignung der Flusskammer für Inhibitoruntersuchungen	100
3.4.4	Hemmwirkung von PAA-basierten Ligandenkonjugaten	101
3.4.5	Hemmwirkung von dPGS	103
3.4.6	Hemmwirkung des Makrolids Efomycin M	104
3.4.5.1	Untersuchungen zur Hemmwirkung der L-Selektin-abhängigen Zell-Zell-Interaktion	104
3.4.5.2	Untersuchungen zur Hemmwirkung der L-Selektin-abhängigen Zell-Ligand-Interaktion	105
3.5	Herstellung von Referenzglykoproteinen für Inhibitionsuntersuchungen (PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG)	107
3.5.1	Klonierung einer humanen PSGL-1-IgG- und einer Hsc70-IgG-Chimäre	108
3.5.2	Entwicklung eines Transfektionsprotokolls für KG1a-Zellen	110
3.5.3	Nachweis der Transkription nach stabiler Transfektion	111
3.5.4	Nachweis der Proteinexpression nach stabiler Transfektion	113
3.5.5	Reinigung der Eluate	114
3.5.5.1	Gelfiltration	114
3.5.5.2	Affinitätschromatographischer Reinigungsversuch über L-Selektin-IgG	116
3.5.5.3	Affinitätschromatographischer Reinigungsversuch über α -Rind IgG, $F(ab')_2$ -spezifischen Antikörper	117
3.5.6	Proteinexpression mit <i>Ultra Low</i> IgG FCS	119
3.5.7	SPR-Bindungsanalyse	121

4 Diskussion	125
4.1 Etablierung und Standardisierung eines L-Selektin-abhängigen Bindungsassays	126
4.1.1 Aviditätssteigerung von L-Selektin.....	127
4.1.2 Bindungsparameter von L-Selektin.....	128
4.1.3 Biologische Aktivität und Stabilität von rekombinatem L-Selektin	129
4.1.4 Einfluss von Sialinsäuren auf die L-Selektin-Bindung	129
4.2 Untersuchung von Inhibitoren der L-Selektin-Ligand-Bindung.....	131
4.2.1 L-Selektin-Inhibitoren auf Basis kleiner Moleküle	131
4.2.1.1 Efomycin M.....	132
4.2.1.2 Diadenosinpolyphosphate.....	135
4.2.2 L-Selektin-Inhibitoren auf Basis von makromolekularen Polymerstrukturen	137
4.2.2.1 PAA-basierte Ligandenkonjugate.....	138
4.2.2.2 Dendritische Polyglycerolsulfate (dPGS).....	139
4.2.3 L-Selektin-Inhibitoren auf Proteinbasis	142
4.2.3.1 Entwicklung eines Transfektionsprotokolls für KG1a-Zellen	142
4.2.3.2 Die Entwicklung peptidbasierter L-Selektin-Ligand-IgG-Minimalkonstrukte	144
4.2.3.2.1 Die rekombinante Herstellung von Fcy- Fusionsproteinen von L-Selektin-Liganden.....	144
4.2.3.2.2 Untersuchung der L-Selektin-Bindung von PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG.....	145
 5 Zusammenfassung	 148
 6 Summary	 150
 7 Literaturverzeichnis	 152
 8 Anhang	 167