

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.2 Geräte

2.1.2.1 PCR und Elektrophorese

- Thermocycler Trio-Thermoblock; Biometra, Göttingen
- Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele, Geldicke 0,75 cm; CBS, Del Mar, USA
- *Easy-Cast-Electrophoresis System*; Owl Separation Systems, Woburn, USA

2.1.2.2 Western Blot und Filmentwicklung

- Mini Protean II-System; Bio-Rad, München
- Entwicklermaschine Optimax Typ TR; MS Laborgeräte, Heidelberg

2.1.2.3 Zentrifugen

- Tischzentrifuge 5417 C; Eppendorf, Hamburg
- Tischzentrifuge 5415 C; Eppendorf, Hamburg
- Tischzentrifuge 5417 R; Eppendorf, Hamburg
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R; Heraeus, Hanau

2.1.2.4 Photometer

- Küvettenphotometer DU 640; Beckmann Coulter, Miami, FL, USA
- Mikroplatten-Photometer Spectra MAX 340 PC; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

2.1.2.5 Zellkultur

- Brutschrank B 6060; Heraeus, Hanau
- Brutschrank Heracell; Heraeus, Hanau
- Sterile Werkbank Herasafe HS12; Heraeus, Hanau

2.1.2.6 Sonstige Geräte

- MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage; Millipore, Molsheim, Frankreich
- Gelrockner 583; Bio-Rad, München
- Sequenzierer ABI Prism 310; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
- Vakuumkonzentrator Centrivac; Heraeus, Hanau
- Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg
- BIACORE X; Biacore AB, Uppsala, Schweden
- Fluoreszenz-Mikroskop; Axioplan, Zeiss, Germany
- Beckman Coulter Epics XL (FACS); Beckman Coulter, Miami, FL, USA
- Nucleofector I; Amaxa, Köln

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen wurden, soweit nicht gesondert aufgeführt, bei Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Sterile Einwegmaterialien wie Schraubdeckel-Röhrchen oder Schalen für die Bakterien- und Zellkultur wurden von BD Biosciences (Heidelberg), Greiner (Nürtingen) oder Nunc (Wiesbaden) gekauft. Allgemeine Plastikware für den Laborbedarf wurden bei Eppendorf (Hamburg), BD Biosciences (Heidelberg), Brand (Wertheim) oder Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen. Folgende Verbrauchsmaterialien wurden außerdem eingesetzt:

- *PolyScreen PVDF Hybridization Transfer Membrane*; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
- Röntgenfilme Biomax MR-1; Kodak, Stuttgart
- Fotofilme Polaroid 667; Polaroid, Dreieich
- Konzentratoren *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices*; Millipore, Molsheim, Frankreich
- DMEM *High Glucose* mit L-Glutamin; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- RPMI 1640 mit L-Glutamin; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Dulbecco's PBS; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

- ExGen 500 *in vitro* Transfection Reagent; Fermentas, St. Leon-Roth
- jetPEI; BIOMOL GmbH, Hamburg
- ProFection Mammalian Transfection Systems; Promega, Mannheim
- Penicillin / Streptomycin (10 000 U / 10 000 µg/ml); GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein
- G418 *Sulphate* (Geneticin); PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Trypsin-EDTA (0,25% (v/v) Trypsin, 1 mM EDTA); GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein
- *Fetal Calf Serum* (FCS); Biochrom AG, Berlin, Germany
- *Ultra Low IgG FCS*; GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein
- HEPES *buffer solution* (1 M) pH 7,3; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Sigma-Aldrich, München
- Cremophor EL; Fluka/Sigma-Aldrich, München

Alle anderen hier nicht aufgeführten Materialien werden innerhalb der nachfolgend aufgeführten Methodenabschnitte genannt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Vektoren

pCR3.1- FL (C. Fieger, Berlin, 1997; Anhang 8.1.1)

pCR3.1 ist ein Vektor sowohl für die transiente als auch stabile Expression von Genen in eukaryontischen Zellen. Das zu exprimierende Gen wird unter die Kontrolle des Cytomegalo-Virus (CMV) Promotors gebracht, was ein hohes Expressionsniveau ermöglicht. Dieser Promotor reagiert nach Aktivierung der Zellen auf zelluläre Signale. Diese Signale können durch Phorbolster wie PMA in ihrer Funktion ersetzt werden, wodurch seine Aktivität um ein sieben- bis achtfaches gesteigert wird. Der Vektor trägt außerdem sowohl ein Neomycin-/Kanamycin- als auch Ampicillinresistenzgen. Der verwendete Vektor enthielt aus Vorarbeiten den gesamten kodierenden Bereich der L-Selektin cDNA (FL für „*full length L-selectin*“).

pcDNA3, pcDNA6/V5-His B (Invitrogen, Karlsruhe; Anhang 8.1.2 + 8.1.3)

Die pcDNA Vektorserie ist eine Sammlung von Vektoren für die Expression von rekombinantem Protein in Säugerzellen. Die Vektoren dieser Serie sind für die

Expression mit unterschiedlichen Promotoren ausgestattet, verfügen über mehrere Resistenzgene als Selektionsmarker und enthalten verschiedene „*Fusion Tags*“.

pcDNA3 enthält einen CMV-Promotor und besitzt Resistenzgene gegen die Antibiotika Neomycin/Kanamycin und Ampicillin. pcDNA6/V5-His B ist ebenfalls mit einem CMV-Promotor ausgestattet, besitzt aber statt eines Resistenzgens gegen Neomycin/Kanamycin eines gegen Blasticidin. Zusätzlich ist dieser Vektor mit dem „*Fusion Tag*“ V5 und einem Polyhistidin-*Tag* ausgestattet.

pBluescript II KS(+) (Stratagene, Amsterdam; Anhang 8.1.4)

Beim Vektor pBluescript II KS (+) handelt es sich um einen Klonierungsvektor mit Ampicillinresistenzgen. Zudem ermöglicht das lacZ-Gen ein Blau-Weiß-Kolonie-Screening von positiven Klonen.

pCMV5-IgG (S. Rosen, San Francisco; Anhang 8.1.5)

Bei pCMV5 handelt es sich um einen eukaryontischen, mit CMV-Promotor ausgestatteten Expressionsvektor. Er trägt ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin und verfügt als Leihgabe aus dem Labor von Dr. Steven Rosen über die *ighg1*-Basensequenz des humanen *Fcy* (fortlaufend als *IgG* bezeichnet). Diese wurde für die Experimente der vorliegenden Arbeit genutzt.

2.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma metabion (München) synthetisiert. Primer für Sequenzierungs- und PCR-Anwendungen wurden mittels Gelfiltration entsalzt und gereinigt.

Tabelle 2: Klonierte PCR-Fragmente von *psgl-1* und *hsc70*

Insert	Sequenz
<i>psgl-1</i>	5'-GGATCCGCCATGGCTCTGCAACTCCTCCTGTTGCTGATCCTACTGGGCC TGGCAACAGCTTGCAGCTGTGGGACACCTGGGCAGATGAAGCCGAGAAAGC CTTGGGTCCCCTGCTTGCCCGGGACCGGAGACAGGCCACCGAATATGAGTA CCTAGATTATGATTTCCCTGCCAGAAACGGAGCCTCCACGCCCCATGATGGAC GACGATGACAAGGCAGGTAAGTAAGCTT-3'
<i>hsc70</i>	5'-GGATCCGCCATGGCTCTGCAACTCCTCCTGTTGCTGATCCTACTGGGCC TGGCAACAGCTTGCAGCTGTGGGACACCTGGGCAGATGAAGCCGAGAAAGC CTTGGGTCCCCTGCTTGCCCGGGACCGGAGACAGGCCAGTATTGAGATCGAT TCTCTCTATGAAGGAATCGACTTCTATACCTCCATTACCCGCCCCATGATGGA CGACGATGACAAGGCAGGTAAGTAAGCTT-3'

Material und Methoden

Tabelle 3: Vektorprimer (für PCR und Sequenzierung)

Primer	Größe	Sequenz
T7 primer	17-mer	5'-AATACGACTCACTATAG-3'

Tabelle 4: Insertprimer (für PCR und Sequenzierung)

Primer	Größe	Sequenz
<i>psgl-1</i> Kozak	32-mer	5'-TTGGATCCGCCATGGCTCTGCAACTCCTCCTG-3'
<i>CH3 his rev</i>	32-mer	5'-TGTCACCTCGAGTTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'
<i>psgl-1 rev</i>	27-mer	5'-TGGAGGCTCCGTTTCTGGCAGGAAATC-3'
<i>hsc70 rev</i>	27-mer	5'-GGTAATGGAGGTATAGAAGTCGATTCC-3'

Tabelle 5: *E. coli* Stämme

Stamm	Eigenschaften	Firma
DH5 α	Genereller Klonierungsstamm	Promega, Mannheim
XL-1 blue	Genereller Klonierungsstamm, geeignet für Blau-Weiss- Screening	Stratagene, Amsterdam

Tabelle 6: Kits

Kit	Firma
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
Oligotex mRNA Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel, Düren
One-Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
BD Advantage 2 PCR Kit	BD Biosciences, Heidelberg
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und Template Suppression Reagent	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 7: Enzyme

Enzym	Firma
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt a.M. und Fermentas, St. Leon-Roth
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Roth

Tabelle 8: Marker und Standards

Marker	Firma
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 9: Puffer

TAE	
40 mM	Tris
1 mM	EDTA
eingestellt auf pH 8,3	
TE	
10 mM	Tris pH 8,0
0,1 mM	EDTA

2.2.3 Bakterienkultur

Tabelle 10: Verwendete Nährmedien und Antibiotika

LB Medium	
10 g	Trypton/Pepton
5 g	Yeast extract
5 g	NaCl
1 ml	1N NaOH
Ad 1 l	ddH ₂ O
autoklaviert und vor Zugabe von Antibiotikum auf 55°C abkühlen lassen.	
LB Agarplatten	
15 g	Agar
1 l	LB-Medium
autoklaviert und vor Zugabe von Antibiotikum auf 55°C abkühlen lassen.	
Antibiotikum	
Ampicillin:	100 µg/ml Endkonzentration

Anzuchten unter heterotrophen Bedingungen wurden im 75-100 ml Maßstab in LB Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben durchgeführt. Das Animpfen erfolgte mit 1/1000 Volumen einer entsprechenden Übernachtskultur. Die Übernachtskulturen wurden in sterilen Reagenzgefäßen mit 2 ml LB Flüssigmedium durch Beimpfung mit einer Einzelkolonie angesetzt. Die Kulturen wurden bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 160-180 rpm inkubiert. Die Anzucht auf LB Agarplatten erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus, Osterode) bei 37°C. Zellen aus Kulturmedien bis 2 ml Volumen wurden mit einer Laborzentrifuge (5415 C, Eppendorf, Hamburg) sedimentiert (15800 x g, 1 min). Bei größeren Volumina erfolgte die Ernte mit Hilfe einer Kühlzentrifuge (Megafuge 2.0R, Heraeus, Osterode) bei 3362 x g und 4 °C für 15 min.

2.2.4 Nukleinsäure-Grundtechniken

2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung einer Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch das Messen der Absorption einer Lösung bei 260 nm ($A_{260\text{nm}}$). In der vorliegenden Arbeit wurden Nukleinsäure-Lösungen vor einer Messung 1:100 verdünnt (Gesamtvolumen 500 μl). Die Konzentration wurde über die nachfolgend angegebene Relation für doppelsträngige DNA und einzelsträngige RNA [Sambrook *et al.*, 2001] berechnet.

$$A_{260\text{nm}}=1 \quad \sim 50 \mu\text{g doppelsträngige DNA}$$

$$A_{260\text{nm}}=1 \quad \sim 38 \mu\text{g einzelsträngige RNA}$$

Eventuelle Proteinverunreinigungen konnten durch die gleichzeitige Vermessung der Absorption bei 280 nm ($A_{280\text{nm}}$) festgestellt und durch Bildung des Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen) abgeschätzt werden. Alternativ wurde die Konzentration durch Vergleich der Fluoreszenzintensität mit DNA-Fragmenten bekannter Konzentration (z. B. Low DNA Mass Ladder) nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid [Sambrook *et al.*, 2001] abgeschätzt.

2.2.4.2 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Mullis *et al.* (1992) dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Anhand verschiedener Primerkombinationen und der Auswahl bestimmter zu amplifizierender DNA-Sequenzen kann das Produkt der PCR bestimmt werden. Für die Amplifikation der cDNA des PSGL-1-Peptids wurden die Primer *psgl-1* Kozak und *psgl-1 rev.* eingesetzt. Die cDNA des Hsc70-Peptids wurde mit den Primern *psgl-1* Kozak und *hsc70 rev.* amplifiziert (Tab. 4). Die Reaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die PCR

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA-Lösung (ca. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1 μl
10x BD Advantage 2 PCR Puffer	5 μl
dNTP (10 mM)	5 μl
<i>forward primer</i> (10 pmol/ μl)	1 μl
<i>reverse primer</i> (10 pmol/ μl)	1 μl
50x BD Advantage 2 Polymerase Mix	1 μl
ddH ₂ O	ad 50 μl

Im Thermocycler Trio-Thermoblock (Biometra) wurde das folgende Programm durchlaufen:

- 94°C, 1 min
- 35 Zyklen: 94°C, 30 s
62°C, 30 s
68°C, 1 min
- 68°C, 1 min
- 4°C, ∞

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen analysiert.

2.2.4.3 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA-Isolierung

Für die Isolierung der cytoplasmatischen Gesamt-RNA aus KG1a-Zellen wurde das *RNeasy Midi Kit* von Qiagen (Tab. 6) verwendet. Die aufgearbeitete Zellzahl pro Ansatz betrug $3,5 \times 10^7$. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C), das Pellet in 500 µl RLN Puffer resuspendiert (im Kit enthalten) und 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde anschließend zentrifugiert (5 min, 500 x g, 4°C) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dem Überstand wurden 2 ml RLT Puffer zugesetzt (im Kit enthalten) und gevortext, bevor weitere 1,4 ml Ethanol (100%ig) zugegeben wurden. Das Lysat wurde dann auf eine RNeasy Midi Säule (im Kit enthalten) pipettiert, zentrifugiert (5 min, 3000 x g), mit 4 ml RW1 Puffer (im Kit enthalten) gewaschen und rezentrifugiert (5 min, 3000 x g). Anschließend wurde zweimal mit 2,5 ml RPE Puffer (im Kit enthalten) gewaschen und rezentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurden 165 µl RNase freies Wasser (im Kit enthalten) auf die Säule gegeben und durch Zentrifugation (3 min, 3000 x g) in ein neues Mikroreaktionsgefäß eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Poly A⁺ mRNA-Isolierung

Für die Isolierung der Poly A⁺ mRNA wurde das *Oligotex mRNA Kit* von Qiagen (Tab. 6) verwendet. Die aufgearbeitete Gesamt-RNA aus KG1a Zellen wurde zunächst mit RNase freiem Wasser aus dem RNeasy Midi Kit auf 250 µl Gesamtvolumen eingestellt. Es folgte die Zugabe von 250 µl Puffer OBB und 15 µl Oligotex Suspension (im Kit enthalten). Die Proben wurden für 3 min bei 70°C, dann für 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Oligotex:mRNA Komplexe wurden daraufhin abzentrifugiert (2 min, 14000 x g) und der Überstand vorsichtig entfernt. Es folgten Resuspension des Pellets mit 400 µl Puffer OW2 (im Kit enthalten), das Pipettieren auf eine Oligotex mRNA Säule (im Kit enthalten) und die erneute Rezentrifugation (1 min, 14000 x g). Die Säule wurde nochmals mit 400 µl Puffer OW2 (im Kit enthalten) gewaschen und rezentrifugiert. Zum Eluieren der mRNA wurden zweimal 20 µl Puffer OEB (im Kit enthalten) auf die Säule gegeben und durch Zentrifugation (1 min, 14000 x g) in ein neues Mikroreaktionsgefäß eluiert. Das Eluat wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4.4 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um aus der in 2.2.4.3 gewonnenen mRNA die cDNA von *psgl-1-IgG* und *hsc70-IgG* zu generieren, wurde das *OneStep RT-PCR Kit* von Qiagen (Tab. 6) eingesetzt. Es wurde folgender Ansatz gewählt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die RT-PCR

Reagenz	Menge
mRNA-Präparation	100 ng
5x OneStep RT-PCR Puffer	10 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
<i>forward primer</i> (10 pmol/µl)	1 µl
<i>reverse primer</i> (10 pmol/µl)	1 µl
OneStep RT-PCR <i>Enzyme Mix</i>	2 µl
ddH ₂ O	Ad 50 µl

Für die Amplifikation von *psgl-1-IgG* und *hsc70-IgG* wurden die Primer *psgl-1* Kozak und *CH3 his rev.* eingesetzt (Tab. 4). Im Thermocycler Trio-Thermoblock (Biometra) wurde das folgende Programm durchlaufen:

- 50°C, 30 min
- 95°C, 15 min
- 40 Zyklen: 94°C, 30 s
60°C, 30 s
72°C, 1 min
- 72°C, 10 min
- 4°C, ∞

Die erhaltenen RT-PCR-Produkte wurden durch elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen analysiert.

2.2.4.5 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch spezifische Endonukleasen erfolgte in Ansätzen von 10 µl Gesamtvolumen unter den von der jeweiligen Bezugsfirma empfohlenen Bedingungen. Die eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach der DNA-Konzentration im jeweiligen Restriktionsansatz. Das Volumen der zugesetzten Enzymlösung betrug dabei nicht mehr als ein Zehntel des Gesamtvolumens. Bei Doppelrestriktionen wurden beide Enzyme dem Ansatz gleichzeitig hinzugefügt, sofern sie die gleichen Reaktionsanforderungen besaßen. Unterschieden sich diese nur in der Salzkonzentration, wurde zunächst die Restriktion, die die niedrigere Salzkonzentration erforderte, durchgeführt. Anschließend wurde die Salzkonzentration für die Restriktion durch die zweite Endonuklease, wie benötigt, erhöht. Erforderten beide Enzyme sehr unterschiedliche Puffer, wurde nach der ersten Restriktion die DNA gefällt und anschließend die zweite Restriktion im optimalen Puffersystem durchgeführt. Die Inkubationsdauer für Restriktionen lag in der Regel bei einer Stunde. Zur Spaltung von 1 µg DNA wurden 1-5 Units Endonuklease eingesetzt.

2.2.4.6 Reinigung, Umpufferung und Konzentrierung von DNA

Zumeist erfolgte erst eine elektrophoretische Auftrennung der DNA (PCR- und Restriktionsfragmente) im Agarosegel, gefolgt von einer Reinigung der gewünschten DNA-Fragmente mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden; Tab. 6). Zur Fällung von DNA aus einer Lösung wurde der Ansatz mit 2,5 Volumina absolutem Ethanol vermischt und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Enthielt die zu fällende DNA-Lösung weniger als 100 mM Salz, wurde ihr vor der Ethanolfällung 1/10 Volumen Natriumacetatlösung (3 M, pH 6,5) zugesetzt. Nach Sedimentation der gefällten DNA (20800 x g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet mit 0,5 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und für 15 min im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde anschließend in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen. Um Proteinverunreinigungen aus DNA-Proben zu entfernen, wurden die Ansätze mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform (1:1, v/v) extrahiert. Durch Zentrifugation (12000 x g, 5 min) wurde die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Gegebenenfalls wurde die Extraktion wiederholt und nach der letzten Phasentrennung die DNA nach Einstellung der

Salzkonzentration gefällt, gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen.

2.2.4.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Tabelle 13: DNA-Probenpuffer (6x)

60% (w/v)	Saccharose
20 mM	EDTA
0,025% (w/v)	Bromphenolblau

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen (Agarose der Firma GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein) in horizontalen Flachbett-Apparaturen elektrophoretisch aufgetrennt. Unter Berücksichtigung der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8%ige bis 1,5%ige Agarosegele in TAE-Puffer hergestellt. Die Restriktionsansätze wurden vor dem Gelauftrag mit 3 µl DNA-Probenpuffer versetzt und die Taschen des Gels mit jeweils 6-10 µl der Restriktionsansätze beladen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei konstanter Spannung von 80-100 V. Die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden in wässriger Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) angefärbt, im UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und auf Polaroid 667-SW-Film dokumentiert. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe eines mitaufgetrennten DNA-Standards (100 bp DNA Ladder und/oder 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

2.2.4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen

Nach der Elektrophorese wurden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente kurz mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht detektiert, mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt, dessen Gewicht vorher bestimmt worden war. Nach Ermittlung des Gewichtes des Agaroseblöckchens erfolgte die Elution der DNA gemäß den Herstellerangaben mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden).

2.2.4.9 Dephosphorylierung von DNA

Um inter- und intramolekulare Reaktionen von Vektorfragmenten in Ligationsansätzen zu verringern, wurden deren endständige Phosphatgruppen durch spezifische Dephosphorylierung entfernt. Für 1 µg vollständig geschnittener Vektor-DNA wurden

0,5 U einer hitzeinstabilen alkalischen Phosphatase (CIAP) eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1,5 h inkubiert und anschließend die Phosphatase durch Inkubation bei 65 °C für 15 min inaktiviert.

2.2.4.10 Ligation von DNA

Die Ligation dient der Synthese einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Strängen. Für die Ligation wurde die T4 DNA Ligase (Tab. 7) zusammen mit dem T4 DNA Ligasepuffer eingesetzt. Die Ligationen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 14: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes

Reagenz	Menge
geschnittener Vektor (ca. 0,2 µg/ml)	1 µl
<i>Insert</i>	3-9 µl
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	0,5 µl
10x T4 DNA Ligasepuffer	2 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Für die Ligation der überhängenden Enden wurden die Ligationsansätze bei 16 °C über Nacht inkubiert. Nachfolgend wurde der Ligationsansatz bei 70 °C für 10 min inaktiviert und zur Transformation kompetenter *E.coli* Zellen eingesetzt.

2.2.5 Transformation in *E. coli*

2.2.5.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Tabelle 15: TSS-Puffer

TSS-Puffer	
85% (w/v)	Tris
10% (w/v)	EDTA
5% (v/v)	DMSO
50 mM	MgCl ₂
87%	Glyzerin
	sterilfiltriert

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach der von Chung *et al.* (1989) beschriebenen Methode. *E. coli* Zellen einer eingefrorenen Kultur wurden auf LB Agarplatten ausplattiert und gewachsene Einzelkolonien anschließend über Nacht in 5 ml LB Medium bei 37°C inkubiert. Nach einer 1:100 Verdünnung in

Material und Methoden

LB Medium wurden die Zellen bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Nachdem die Kulturen eine OD₅₇₈ von 0,5 erreicht hatten, wurden die Zellen für 20 min auf Eis gekühlt, anschließend in Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Die Pellets einer 500 ml Suspension wurden in 10 ml TSS-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 2 ml Glycerin (87%ig) aliquotiert (100 - 200 µl) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.5.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit der DNA des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Für die Aufnahme der DNA folgte dann ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend erneut 15 min auf Eis inkubiert, gefolgt von der Zugabe 500 µl raumtemperaturwarmen LB Mediums. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde ein Teil des Transformationsansatzes, je nach erwarteter Transformationseffizienz, auf LB Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Plasmidisolierung

2.2.6.1 Small Scale-Isolation

Tabelle 16: Puffer für die Small Scale-Isolation von Plasmiden

Puffer 1	
TE Puffer mit 10 µg/ml RNase	
Puffer 2	
0,2 M	NaOH
1% (w/v)	SDS
Puffer 3	
3 M	Kaliumacetat pH 5,5

Die Bakterien wurden in der Regel über Nacht in LB Flüssigmedium mit geeignetem Antibiotikum inkubiert. Die Verwendung des Antibiotikums erfolgte, um den Selektionsdruck auf das Plasmid aufrecht zu erhalten. Zur Isolierung des Plasmid wurde eine 2 ml Übernachtskultur sedimentiert und in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Es folgte die Zelllyse durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 mit einer maximalen Inkubationszeit von 5 min. Die anschließende Neutralisation durch Zugabe von 300 µl Puffer 3 für 10 min führte zur Präzipitation der Proteine und denaturierter genomischer

DNA, welche durch 15 min Zentrifugation bei 20000 x g bei 4°C entfernt wurden. Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA, welcher in ein neues Gefäß mit 700 µl Isopropanol überführt wurde. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde durch 15 min Zentrifugation bei 20000 x g sedimentiert. Nach einem Waschdurchgang mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 10-20 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.6.2 Large Scale-Isolation

Größere DNA-Mengen wurden mit Hilfe des *Plasmid Midi Prep Kits* (Qiagen, Hilden) oder *NucleoBond PC 500 Maxi Prep Kits* (Macherey-Nagel, Düren) (Tab. 6) isoliert. Die alkalische Lyse und Reinigung mit Anionenaustauschsäulchen erfolgte gemäß den Herstellerangaben für 100 ml Übernachtskulturen.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Um die erhaltenen Produkte zu sequenzieren, wurde das *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Tab. 6) verwendet. Die Sequenzierung der DNA erfolgte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977), bei der eine PCR mit nur einem Primer durchgeführt wird. Zum Abbruch der synthetisierten DNA kommt es durch 3',5'-Didesoxynukleotide im Reaktionsgemisch, die von der Polymerase erkannt und in den neuen DNA-Strang eingebaut werden. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe verhindern die Didesoxynukleotide jedoch Verlängerungen des Stranges und bewirken einen Abbruch der Synthese, statistisch zufällig, an irgendeiner Stelle der wachsende Kette. Sie tragen unterschiedliche Fluorophore, aufgrund deren Emissionseigenschaften nach Auftrennung der Kettenabbruchprodukte im Sequenziergerät die Sequenz bestimmt werden kann.

Für die Sequenzierungsreaktion wurde der Primer T7 (Tab. 3) eingesetzt. Die Reaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 17: Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA (ca. 2 µg/µl)	0,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
BDT v1.1 (aus dem Kit)	2 µl
5x Puffer	1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Im Thermocycler Trio-Thermoblock (Biometra) wurde folgendes Programm durchlaufen:

- 96°C, 1 min
- 25 Zyklen: 96°C, 10 s
50°C, 5 s
60°C, 4 min
- 10°C, ∞

Das erhaltene Kettenabbruchprodukt wurde auf das Gelbett einer *DyeEx 2.0 Spin* Säule gegeben und zentrifugiert (3 min, 800 x g). Das Eluat enthielt das gereinigte DNA-Produkt. Anschließend wurde die Einzelstrang-DNA-Lösung 10 min im Vakuumkonzentrator eingengt. Das Pellet wurde in 20 µl *Template Suppression Reagent* (Tab. 6) aufgenommen, 3 min auf 96 °C erhitzt und im Sequenzierer ABI Prism 310 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) analysiert.

2.2.8 Lagerung von *E. coli* in Glycerin

Zur Aufbewahrung von gentechnisch veränderten *E. coli* Zellen wurden 900 µl einer Bakterienkultur mit 100 µl 100%igem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein A

Die Immunpräzipitation (IP) isoliert ein bestimmtes Antigen aus der Vielzahl von Antigenen einer Lösung. Der Vorteil einer IP liegt darin, dass viele Ansätze gleichzeitig gefahren werden können und stellt somit ein analytisches Werkzeug dar. Es ist bekannt, dass IgG mit seinem Fc-Anteil (C_H2-Domäne) an die globulären Bereiche von Protein A, einem Oberflächenprotein aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus*, bindet [Endresen *et al.*, 1974]. Daher wird auf einer Matrix immobilisiertes Protein A oft für IP-Versuche eingesetzt. Im Präzipitat kann das Antigen dann zumeist mittels SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Vorgehen für den Nachweis von rekombinantem PSGL-1-IgG bzw. Hsc70-IgG eingesetzt. Pro Ansatz wurden über Nacht 50 ml Zellkulturüberstand mit 600 µl Protein A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Protein A-Sepharose zentrifugiert (2 min, 3362 x g), mit PBS gewaschen und rezentrifugiert (insgesamt dreimal). Es folgte die Elution von

gebundenem Protein durch Zugabe von 1 ml Glyzin-HCl, pH 2,5, mit anschließender Umpufferung des Eluats in PBS (mittels *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices*, MWCO 30000). Präzipitiertes PSGL-1-IgG bzw. Hsc70-IgG wurden anschließend mittels SDS-PAGE mit Western Blot und Silberfärbung nachgewiesen.

2.3.2 Proteinaufreinigung mittels Protein A-Sepharose-Affinitätschromatographie

Für die Isolierung größerer Proteinmengen wurden mit Protein A-Sepharose gefüllte Säulen eingesetzt. Hierfür wurden 20 ml Säulen der Firma Bio-Rad (München) mit 2 ml Protein A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare) beladen. Vor einem Durchlauf wurde eine Säule durch dreimaliges Waschen mit PBS equilibriert. Anschließend wurde Zellkulturüberstand über die Säule gegeben und unspezifisch gebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit 20 ml PBS entfernt. Es folgte entweder eine saure Elution durch Zugabe von 14 ml Glyzin-HCl, pH 2,5, oder eine Elution mit Hochsalzlösung durch Zugabe von 14 ml 4 M MgCl₂. Die Eluate wurden anschließend in PBS umgepuffert (mittels *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices*, MWCO 10000 oder 30000).

2.3.3 Proteinaufreinigung mittels Immunoaffinitätschromatographie

Die Immunoaffinitätschromatographie ist eine Methode zur Aufreinigung von Antigenen, wenn spezifische monoklonale oder polyklonale Antikörper zur Verfügung stehen. Antikörper lassen sich vergleichsweise leicht und häufig ohne Verlust der Bindungsaktivität an die gängigen Matrices koppeln. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Kopplung des polyklonalen Antikörpers *Goat Anti-Bovine IgG, F(ab')₂ Fragment Specific* (Dianova, Hamburg) an eine *CarboLink*-Matrix der Firma Pierce (Rockford, IL, USA). Die Kopplungsprozedur erfolgte gemäß der Herstellerangaben des *CarboLink* Kits der Firma Pierce (Pierce, Rockford, IL, USA).

Eine mit Antikörper präparierte *CarboLink*-Säule wurde vor einem Durchlauf durch dreimaliges Waschen mit PBS equilibriert. Es folgte die Überführung einer Proteinlösung (PSGL-1-IgG- oder Hsc70-IgG-Eluat aus 2.3.4) auf die Säule. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch einmaliges Waschen mit 12 ml PBS entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 8 ml Glyzin-HCl, pH 2,5. Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Geeignete Fraktionen wurden anschließend vereinigt und durch Zugabe von PBS in Konzentratoren der Firma Millipore (*Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices*, MWCO 10000) umgepuffert.

2.3.4 Proteinaufreinigung mittels Ligandenaffinitätschromatographie

Die Ligandenaffinitätschromatographie ist eine weitere Methode der Proteinbiochemie. Wenn ein spezifischer Ligand des gesuchten oder zu reinigenden Proteins über eine reaktive Gruppe verfügt, kann dieser über einen Abstandshalter (*Spacer*) an eine Matrix (Agarose oder Polyacrylamid) gekoppelt werden. Bleiben dabei die Bindungseigenschaften des Liganden erhalten, bindet die derivatisierte Matrix selektiv das gesuchte Protein. Die Matrix wird auf einer Säule ausgiebig gewaschen und das gesuchte Protein anschließend eluiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde rekombinantes L-Selektin-IgG (Monomer: 95 kDa) über seinen IgG-Fusionsanteil an eine *CarboLink*-Gelmatrix der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) gekoppelt. Die Kopplungsprozedur erfolgte gemäß der Herstellerangaben des *CarboLink* Kits der Firma Pierce (Pierce, Rockford, IL, USA). Eine mit L-Selektin-IgG präparierte *CarboLink*-Säule wurde vor einem Reinigungsdurchlauf durch dreimaliges Waschen mit PBS equilibriert und anschließend mit Proteinlösung (hier: PSGL-1-IgG- oder Hsc70-IgG-Eluat aus 2.3.2) beladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch einmaliges Waschen mit 12 ml PBS entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 8 ml Glyzin-HCl, pH 2,5. Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE mit Western Blot und Silberfärbung analysiert. Die mit erwünschtem Protein versehenen Fraktionen wurden vereinigt und in PBS umgepuffert (mittels *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices*, MWCO 10000).

Neben der L-Selektin-Säule wurde eine 10 ml SiaLe^x-Sephrose-Säule (ca. 500 µl Bettvolumen, Bindungskapazität ca. 100 µg Protein) der Firma Lectinity (Moskau, Russland) für affinitätschromatographische Aufreinigungen eingesetzt. Zusätzlich zum SiaLe^x war die Sepharose mit Tyrosinsulfaten ausgestattet, was eine Nachahmung des PSGL-1 Bindungsmotivs für L- und P-Selektin bedeutete. Diese Säule wurde für die Aufreinigung von L-Selektin-IgG (biotinyliert, s. 2.3.11) eingesetzt, was sich gleichzeitig zur Überprüfung der Funktionalität eignete. Vor einem Durchlauf wurde die Säule durch dreimaliges Waschen mit 8 ml TBS-C (20 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) equilibriert. Anschließend folgte die

Beladung mit biotinyliertem L-Selektin-IgG. Unspezifisch gebundenes Protein wurde durch einmaliges Waschen mit 10 ml TBS-C entfernt und funktionelles L-Selektin mit 2 x 2 ml EDTA-Lösung (50 mM) eluiert. Das Eluat wurde anschließend in PBS umgepuffert (mittels *Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices*, MWCO 10000).

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.3.5.1 BCA-Test

Protein bildet mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinkonzentrationsbestimmungen vorwiegend mit dem *BCA Protein Assay Kit* der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) in Mikrotiterplatteneinsätzen (Maxi Sorb U16 Module) der Firma Nunc (Wiesbaden) durchgeführt. Hierzu wurden 10 μl einer Proteinlösung mit 200 μl Färbelösung vermengt. Nach Vermischen der Lösungen erfolgte eine 30 min Inkubation bei 37°C , bevor dann die Absorption bei 562 nm in einem Mehrkanalphotometer (Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) gemessen wurde. Anhand eines mitgemessenen BSA-Standards konnte somit die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.3.5.2 ELISA

Mittels einer Peroxidase-katalysierten Farbreaktion können Protein-Antikörperkomplexe in Mikrotiterplatten nachgewiesen und bei Vorliegen entsprechender Referenzproben quantifiziert werden. Diese Methode eines „Enzyme-Linked Immunosorbent Assays“ (ELISA) ist hochsensitiv und hochspezifisch durch die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen das zu bestimmende Protein.

Für die Konzentrationsbestimmung von L-Selektin [Spertini *et al.*, 1992] wurden zunächst die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Maxi Sorb U16 Module; Nunc, Wiesbaden) mit jeweils 200 ng DREG-200 in 100 μl Carbonatpuffer (50 mM Carbonatpuffer, pH 9,65) bei 4°C über Nacht beschichtet. Ungebundene Antikörper wurden durch gründliches Waschen mit TBS-T (0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl)) entfernt. Alle weiteren Waschschritte und sämtliche Verdünnungen wurden ebenfalls mit TBS-T durchgeführt. In die DREG-200-beschichteten Vertiefungen wurden jeweils 100 μl verschiedener

Verdünnungen der zu untersuchenden Proteinprobe gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler. Nach gründlichem Waschen der Mikrotiterplatte erfolgte ein zweiter Inkubationsschritt mit je 100 ng biotinyliertem DREG-55 [Kishimoto *et al.*, 1990] in 100 µl TBS-T. Dieser zweite L-Selektin-spezifische Antikörper konnte an die vom immobilisierten DREG-200 gebundenen L-Selektin-Moleküle binden und über einen dritten Inkubationsschritt mit je 15 ng Extravidin-Peroxidase in 100 µl TBS-T und einer nachgeschalteten Farbreaktion quantifiziert werden. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von je 100 µl Färbelösung (40 mM Citratpuffer, pH 3,95, 0,02 % (w/v) Tetramethylbenzidin, 9‰ (w/v) H₂O₂) und wurde nach etwa 5 min durch Zugabe von je 50 µl 4 N H₂SO₄ gestoppt. Die Intensität der Färbung wurde in einem Mehrkanalphotometer (Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) bei 450 nm abzüglich des Messwertes bei 495 nm bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde als Standard eine Verdünnungsreihe einer humanen Serumprobe bekannter L-Selektin-Konzentration (8-180 nM L-Selektin) eingesetzt.

2.3.6 Aufkonzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen

Um die Konzentration von Proteinen zu erhöhen, wurden die Lösungen auf *Amicon*-Säulen der Firma Millipore (Molsheim, Frankreich) pipettiert und mehrmals einige Minuten zentrifugiert (3362 x g), bis das Volumen auf etwa 0,2-0,5 ml eingengt war. Dabei passieren nur kleine Moleküle bis zu einer bestimmten Ausschlussgröße die Poren eines Filters, wodurch sich die zu konzentrierenden Proteine über dem Filter ansammelten. Abhängig von der molekularen Masse der zu konzentrierenden Proteine wurden *Amicon*-Säulen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa oder 30 kDa verwendet. In der Regel wurden aufkonzentrierte Proteine bei -80°C gelagert.

2.3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) im CBS-Gelkammersystem durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurden 7,5%ige oder 10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet.

Tabelle 18: Trenn- und Sammelgelpuffer

Trenngelpuffer	
1,5 M	Tris, pH 8,8
0,4%	SDS (w/v)
Sammelgelpuffer	
0,5 M	Tris, pH 6,8
0,4%	SDS (w/v)
Acrylamidmix	
30%	Acrylamid (w/v)
0,8%	Bisacrylamid (w/v)

Die aufzutragenden Proben wurden mit einem fünftel Volumen *Loading Buffer (5x)* und einem zehntel Volumen *Reducing Agent (20x)* der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) vermischt und 5 min bei 80°C inkubiert. Das Gesamtvolumen der Proben (25 µl - 40 µl) wurde vollständig auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 80 -150 V const. für 120 min in SDS-PAGE-Laufpuffer (192 mM Glyzin, 20 mM Tris, 0,1% SDS) durchgeführt.

Tabelle 19: Ansätze für Trenn- und Sammelgele

Reagenz	7,5% Trenngel	10% Trenngel	5% Sammelgel
Trenngelpuffer	1000 µl	1000 µl	-
Sammelgelpuffer	-	-	500 µl
Acrylamidmix	1017 µl	1356 µl	340 µl
10% SDS	40 µl	40 µl	20 µl
ddH ₂ O	1983 µl	1644 µl	1163 µl
10% APS ^a	40 µl	40 µl	10 µl
TEMED ^b	15 µl	15 µl	4 µl

^a Ammoniumperoxodisulfat

^b Tetramethylethylendiamin

2.3.8 Silberfärbung von SDS-Gelen

Silbernitrat kann unter sauren Bedingungen an Proteine binden. Dabei ist der Gehalt an basischen und schwefelhaltigen Aminosäuren für die Anfärbbarkeit der Proteine sehr wichtig. Die gebundenen Silberionen können bei alkalischem pH durch Formaldehyd zu metallischem Silber reduziert und sichtbar gemacht werden [Sammons *et al.*, 1981]. Die Färbung der Proteine kann sich unterscheiden, so zeigen einige Lipoproteine eine bläuliche und Glykoproteine eine gelbliche Färbung [Merril *et al.*, 1984].

Vor der eigentlichen Silberfärbung wurden die Proteine zunächst für insgesamt 45 min im Gel fixiert (20 min in 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig;

25 min in 30 % (v/v) Ethanol, 0,5 M NaAc, 0,5 % (v/v) Glutardialdehyd, 0,2 % (w/w) Natriumthiosulfat). Nach dreimaligem Waschen des Gels für je 10 min in ddH₂O erfolgte für 40 min die Inkubation in Silberlösung (0,1 % (w/v) Silbernitrat, 0,01 % (v/v) Formaldehyd). Anschließend wurde das Gel zweimal kurz mit ddH₂O gespült und mit Entwicklerlösung inkubiert (2,5 % (w/w) Natriumcarbonat, 0,01 % (v/v) Formaldehyd). Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität der Proteinbanden wurde die Reaktion durch Wechsel in Stopplösung (0,05 M EDTA) beendet.

2.3.9 Western Blot und Immunodetektion

Western Blot bezeichnet eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter, z. B. Nitrozellulose oder Polyvinylidendifluorid (PVDF), übertragen werden. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf den Filtern immobilisiert werden. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der Protein-Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass man ein exaktes Abbild des ursprünglichen Gels erhält. Unter geeigneten Bedingungen bleibt sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine, z.B. deren enzymatische Aktivität, erhalten.

An die Membran gebundene Proteine lassen sich durch spezifische immunologische Methoden nachweisen. Beim direkten Nachweis der Proteine werden Antikörper eingesetzt, die mit Enzymen konjugiert (Peroxidase, alkalische Phosphatase oder Beta-Galactosidase), oder in anderer Weise markiert sind (Biotin, Gold-Markierung, Lumineszenz-Systeme). Bei der indirekten Nachweismethode wird ein bereits gebundener, spezifischer Antikörper durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen, der seinerseits in geeigneter Weise markiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden zu analysierende Proteinproben zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit dem *Mini Protean II-System* der Firma Biorad (München) auf eine PVDF-Membran (*PolyScreen PVDF Hybridization Transfer Membrane*; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) übertragen. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 200 A und 4°C in Tris-Glyzin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin). Nach Färbung der Membran mit Ponceau-Rot (0,2 % (w/v) PonceauS in 3 % (v/v) Essigsäure) wurde die Lage der Standardproteine auf der PVDF-Membran markiert. Durch mehrfaches Spülen mit ddH₂O erfolgte die reversible Entfärbung der Membran, die nach Trocknung bis zur Immunodetektion der Polypeptide bei -20 °C gelagert werden konnte.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die PVDF-Membran vor dem immunologischen Nachweis für eine Stunde in TBS-B (0,05% (v/v) Brij 58 in TBS (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl)), vermengt mit 5% (v/v) Ziegen Serum (=Blockpuffer), unter vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für mindestens eine Stunde in Blockpuffer mit 1-10 µg/ml eines spezifischen Antikörpers inkubiert und 3x mit TBS-B-Puffer für je 10 min gewaschen. Hieran schloss sich eine einstündige Inkubation mit geeignetem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper (1:3000 bis 1:10000 verdünnt in Blockpuffer) an. Nach erneutem gründlichen Waschen der Membran mit TBS-B konnte die einminütige peroxidaseabhängige Chemilumineszenz-Reaktion mit ECL-Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgen. Durch Exposition eines Röntgenfilmes (Kodak BioMax MR Film) für die Dauer von 5 s bis 3 h mit anschließender Entwicklung des Films (Film-Entwicklereinheit Optimax TR; MS Laborgeräte, Heidelberg) konnten die antigenspezifischen Chemilumineszenz-Signale detektiert und analysiert werden.

Die aufeinanderfolgende Detektion verschiedener Antigene auf einem Blot war möglich, wenn für die Detektionen Primärantikörper aus unterschiedlichen Organismen verwendet wurden. In diesen Fällen konnte durch Zugabe von 0,05% (v/v) Natriumazid zur Lösung des Primärantikörpers der zweiten Detektion die Peroxidaseaktivität der ersten Detektion inhibiert werden. Die gebundenen Antikörper können aber auch durch Inkubation der Blots in stringentem Puffer (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7, 2% (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol) für 30 min bei 60°C abgelöst werden. Nach gründlichem Waschen mit TBS-B waren sie damit für neuerliche Immunodetektionen vorbereitet.

2.3.10 Größenausschlusschromatographie

Affinitätschromatographisch gereinigte PSGL-1-IgG- bzw. Hsc70-IgG-Proben enthielten für Folgeuntersuchungen mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zu viele störende Proteinanteile unterschiedlicher Größe. Eine geeignete Methode der Chromatographie zur Isolierung von Proteinen unterschiedlicher Größe ist die Gelfiltration. Sie wird zur Reinigung und Trennung eingesetzt, bei der die stationäre Phase aus gequollenen Gelkörnern besteht und die Trennung nach Molekülgröße erfolgt. Große Moleküle wandern mit der Flüssigkeit zwischen den Gelkörnern hindurch, kleine werden in den Poren zurückgehalten und erscheinen zuletzt im Eluat. Mittels Gelfiltration wurde daher am Beispiel des PSGL-1-IgG-Eluats eine Trennung von zusätzlich aufgereinigtem Protein versucht.

Für die Durchführung der Gelfiltration wurde eine Superdex 75 FPLC-Säule (Durchmesser: 10 mm, Höhe: 30 cm; Pharmacia Biotech, Freiburg) an eine ÄKTAexplorer-Anlage der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) angeschlossen und über Nacht mit PBS equilibriert. Am Folgetag wurden 160 µl PSGL-1-IgG-Eluat aus 2.3.4 ($C_{BCA} = 5,6$ mg/ml) mit einer Flussrate von 0,3 ml/min bei Raumtemperatur über die Säule geschickt. Pro Fraktion betrug das Endvolumen 500 µl. Bis zur Analyse mittels SDS-PAGE (s. 2.3.7 + 2.3.8 + 2.3.9) wurden die Fraktionen bei -80°C gelagert.

2.3.11 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die biomolekulare Interaktionsanalyse mittels Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) ist ein wichtiges Werkzeug für die moderne Bioanalytik. Die Messungen erfolgen in Echtzeit und sind gekennzeichnet durch die unmittelbare Wahrnehmung einer Bindung von biomolekularen Komplexen. Zu Beginn wird ein Molekül kovalent auf der Oberfläche eines Sensor Chips gekoppelt (Ligand), ehe dann die Interaktion mit einem anderen Molekül in freier Lösung (Analyt) gemessen wird. Die Messungen erfolgen unter dynamischen Flussbedingungen, wobei die Sensor Chip-Oberfläche eine der Begrenzungen der Flusszelle bildet. Für die Mehrheit der Anwendungen kann die biospezifische Oberfläche regeneriert und für eine Vielzahl von weiteren Analysen wieder verwendet werden. Mit dieser Methode können somit Interaktionen von Proteinen, Proteinkonjugaten, Nukleinsäuren, Lipiden oder auch weit größeren Partikeln wie Viren oder ganze Zellen untersucht werden.

Gerät: Die Experimente wurden mit dem Gerät BIACORE X (Biacore AB, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Temperatur wurde auf permanente 25°C eingestellt.

Puffer: Während der Ligandenimmobilisierung wurde HBS-EP Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (v/v) Surfactant P20) der Firma Biacore eingesetzt. Während der Experimente wurde 20 mM HEPES Puffer, versetzt mit 150 mM NaCl und 1 mM $CaCl_2$ verwendet (= Laufpuffer).

Immobilisierung von SiaLe^x-PAA-sTyr: Das auf Polyacrylamid (PAA)-basierte Konjugat SiaLe^x-PAA-sTyr (30-40 kDa; Lectinity, Moskau, Russland) enthielt Sialyl Lewis x (SiaLe^x) und Tyrosinsulfate (sTyr), welche mit einem Anteil von 20 mol% für SiaLe^x und 5 mol% für sTyr auf einem PAA-Trägermolekül gekoppelt waren. Zusätzlich war auf diesem Konjugat 5 mol% Biotin gekoppelt. Die Immobilisierung von biotinyliertem

SiaLe^x-PAA-sTyr (4,2 µg/ml in HBS-EP) erfolgte auf einem Sensor Chip SA (Biacore AB) auf einer von zwei Spuren. Die Oberfläche eines Sensor Chip SA besteht aus einer Dextranmatrix mit bereits gekoppeltem Streptavidin. Biotinyliertes N-Acetyllactosamin-PAA (LacNAc-PAA; 4,2 µg/ml in HBS-EP) wurde als Referenzsubstanz auf der zweiten Spur des gleichen Chips immobilisiert. Vor Beginn der Immobilisierung wurde der Sensor Chip SA durch drei konsekutive Injektionen (je 1 min) mit 50 mM NaOH in 1 M NaCl aktiviert. Die Beladung des Chips erfolgte mit jedem der beiden Konjugate bis zu einem Grundlinienshift von 900 *Resonance Units* (RU). Der Immobilisierungsprozedur folgten mehrere Waschinjektionen mit Laufpuffer, um die Oberfläche des Chips zu equilibrieren.

Clusterung von E-, P- oder L-Selektin: Für die Erhöhung von Bindungswerten wurden E-, P- oder L-Selektin-IgG (E-Selektin-IgG*: 300 kDa; P-Selektin-IgG*: 310 kDa; L-Selektin-IgG*: 190 kDa; *Homodimer) auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel (Ø 20 nm, Sigma-Aldrich, München; Ø 15 nm, Biotrend Chemikalien GmbH, Köln) immobilisiert. Die Immobilisierungsprozedur erfolgte nach einem festgelegten Schema. Für einen einzelnen Messansatz wurden 30 µl der Goldnanopartikel-Stammlösung (OD₅₂₀=1.0) abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit der Pipette entfernt und das Pellet mit Laufpuffer (ad 12 µl) resuspendiert. Anschließend wurden 6 µl einer 20 nM E-, P- oder L-Selektin-IgG-Lösung zugegeben und mit weiteren 12 µl Laufpuffer aufgefüllt. Es folgten 30 min Schüttelinkubation bei Raumtemperatur, bevor abschließend noch mal 30 µl Laufpuffer zugegeben wurden (Endvolumen 60 µl).

Untersuchungen zur Hemmung der Bindungsfunktion von E-, P- und L-Selektin

Assay Design: Zu einem Ansatz von 60 µl (s. *Clusterung* von E-, P- oder L-Selektin) wurden zu untersuchende Substanzen zugegeben. Das Endvolumen pro Ansatz betrug 70 µl. Für die Durchführung größerer Messreihen wurde das Volumen eines Gesamtansatzes an die Anzahl geplanter Messungen angepasst, d. h. 60 µl mal die Anzahl der geplanten Messungen. Vor einer Messung wurden dem Gesamtansatz 60 µl entnommen und mit der zu testenden Substanz versetzt. Über einen Zeitraum von 18 min erfolgte bei Raumtemperatur die Inkubation mit der Substanz. Aus dem 70 µl Ansatz wurden dann 60 µl entnommen, ins BIACORE X injiziert und bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 µl/min sowohl über die Referenz- wie auch über die SiaLe^x-PAA-sTyr-Spur geleitet. Jeder Messdurchgang beinhaltete

zu Beginn einen 1 min Beobachtungszeitraum, um die Grundlinienstabilität zu beobachten, gefolgt von einer 105 s Injektion der Probe, einer 180 s Dissoziationsphase und der Regeneration des Sensor Chip mit 4 M MgCl_2 . Vor der nächsten Messung folgten zwei Injektionen mit Laufpuffer, um Übertragungseffekte aus der vorherigen Messung zu vermeiden.

Datenauswertung: Während einer Messung wurden Werte der Referenzspur sofort von der SiaLe^x -PAA-sTyr-Spur abgezogen. Die daraus resultierenden Daten ergaben die Messkurve. Für die Auswertung wurden am Start (0 s) und am Ende einer Injektion (285 s) sogenannte *Report Points* gesetzt. Die daraus resultierenden Werte wurden für die Auswertung verwendet. Jeder Punkt repräsentiert einen Mittelwert, wenn nicht anders angegeben, von mindestens drei Messungen.

Gemessene Substanzen:

A) PAA-basierte Ligandenkonjugate: Alle PAA-basierten Konjugate (30-40 kDa) wurden von der Firma Lectinity Holdings (Moskau, Russland) synthetisiert. Die PAA-basierten Konjugate enthielten SiaLe^x oder SiaLe^a , die an ein Poly[N-(2-hydroxyethyl)acrylamid] (PAA)-Gerüst, beide mit einem Anteil von 20 mol% (Monoligandkonjugat), gekoppelt waren. Ein weiterer Konjugattyp hatte zusätzlich Tyrosinsulfate (sTyr) mit einem Anteil von 5 mol% gekoppelt (Biligandkonjugate); sTyr-Monoligandkonjugate mit einem Anteil von 5 mol% oder 20 mol% wurden ebenfalls untersucht. Alle PAA-Konjugate wurden in TBS, pH 7.5, mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml (Stammlösung) gelöst. SiaLe^x (Merck Biosciences, Bad Soden; MW 820 g mol⁻¹), SiaLe^a (Sigma-Aldrich, München; MW 820 g mol⁻¹) und sTyr (Lectinity; MW 261 g mol⁻¹) wurden für Vergleichsmessungen eingesetzt.

B) Efomycin M: In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Schön (Universität Würzburg, Rudolf-Virchow-Zentrum) und Dr. A. von Bonin (Schering AG Berlin) wurden zwei Efomycin M-Chargen untersucht. Efomycin M (MW 722 g mol⁻¹) ist wasserunlöslich und wurde in 100% (v/v) DMSO bzw. für Kontrollexperimente in 100% (v/v) Cremophor EL in Lösung gebracht (Endkonzentration der Stammlösungen jeweils 30 mM).

C) Diadenosinpolyphosphate: In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Schlüter (Charité Berlin, Medizinische Klinik für Nephrologie) wurden mehrere Chargen der Diadenosinpolyphosphate Ap2A (MW 677 g mol⁻¹), Ap3A (MW 757 g mol⁻¹), Ap4A (MW 837 g mol⁻¹), Ap5A (MW 917 g mol⁻¹) und Ap6A (MW 997 g mol⁻¹)

untersucht. Die Diadenosinpolyphosphate sind wasserlöslich und wurden in sterilem ddH₂O in einer Konzentration von ca. 5 µg/µl in Lösung gebracht.

D) Dendritische Polyglycerolsulfate (dPGS): In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Haag (FU Berlin, Institut für Chemie und Biochemie) wurde die Hemmwirkung vier unterschiedlicher Formen von dendritischen Polyglycerolsulfaten untersucht. Das Molekulargewicht der Polyglycerolkerne betrug für dPGS 2a 2500 g/mol, dPGS 2b 3000 g/mol, dPGS 2c 4000 g/mol und dPGS 2d 6000 g/mol. Nach Sulfatierung hatten die Polyglycerolsulfate folgendes Molekulargewicht: dPGS 2a 5500 g/mol, dPGS 2b 6800 g/mol, dPGS 2c 8600 g/mol und dPGS 2d 12300 g/mol. Der prozentuale Anteil der Sulfatierung lag für dPGS 2a bei 85%, für dGS 2b bei 92%, für dPGS 2c bei 84% und für dPGS 2d bei 76%. Die dendritischen Polyglycerolsulfate sind wasserlöslich und wurden in sterilem ddH₂O in Lösung gebracht (Endkonzentration der Stammlösungen jeweils 3 mM). Als Kontrollen wurden nicht-sulfatiertes Polyglycerol (MW 3000 g mol⁻¹), unfraktioniertes Heparin (UHF, mittleres MW 15000 g mol⁻¹) und sulfatierte Triglycerole (MW 650 g mol⁻¹, 83% Sulfatierung) gemessen.

Untersuchung zur Interaktion einer Hsc70-Peptidsequenz mit L-Selektin

Immobilisierung von L-Selektin-IgG: Für die Interaktionsanalyse des Hsc70-Peptids mit L-Selektin erfolgte zunächst die Immobilisierung von biotinyliertem L-Selektin-IgG (Monomer: 95 kDa) auf einem Sensor Chip SA (Biacore). Die Biotinylierung von rekombinantem L-Selektin-IgG wurde zuvor mit Maleimid PEO₂-Biotin der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Funktionalität von biotinyliertem L-Selektin-IgG mittels Ligandenaffinitätschromatographie über SiaLe^x-Sephrose (s. 2.3.4). Die Kopplung von L-Selektin-IgG auf einem der zwei möglichen Spuren wurde bis zu einem Grundlinienshift von ca. 400 RU durchgeführt. Nicht besetzte Bindungsstellen des Sensor Chips wurden anschließend mit biotinyliertem *N*-Acetyllactosamin-PAA (LacNAc-PAA; Lectinity) blockiert. Als Referenz wurde LacNAc-PAA gleichzeitig auch auf der zweiten Spur des Chips immobilisiert. Hier wurde eine Kopplung mit einem Grundlinienshift von 700 RU durchgeführt.

Assay Design: Für eine Erhöhung von Bindungswerten wurden Hsc70-IgG (40 kDa), PSGL-1-IgG (40 kDa) und humanes Fcγ (36 kDa; Dianova, Hamburg) auf

Protein A-beschichtete Goldnanopartikel (\varnothing 15 nm, Biotrend) immobilisiert. Für einen einzelnen Messansatz wurden 30 μ l einer Goldnanopartikel-Stammlösung ($OD_{520}=1,0$) abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit der Pipette entfernt und das Pellet mit Laufpuffer (ad 12 μ l) resuspendiert. Anschließend wurden 6 μ l einer 50 nM Hsc70-IgG-, PSGL-1-IgG- oder Fc γ -Lösung zugegeben und mit 12 μ l Laufpuffer aufgefüllt. Es folgten 30 min Schüttelinkubation bei Raumtemperatur, bevor weitere 30 μ l Laufpuffer zugegeben wurden. Das Gesamtvolumen von 60 μ l wurde in das BIACORE X injiziert und bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 μ l/min über die Referenz- und SiaLe^x-PAA-sTyr-Spur geschickt. Jeder Messdurchgang beinhaltete zu Beginn einen einminütigen Beobachtungszeitraum, um die Grundlinienstabilität zu überprüfen, gefolgt von einer 105 s Injektion der Probe, einer 180 s Dissoziationsphase und der Regeneration des Sensor Chips mit 4 M MgCl₂. Vor der nächsten Messung folgten zwei Injektionen mit Laufpuffer, um Übertragungseffekte aus der vorherigen Messung zu vermeiden.

Datenauswertung: Während einer Messung wurden Werte der Referenzspur sofort von der SiaLe^x-PAA-sTyr-Spur abgezogen. Die daraus resultierenden Daten ergaben die Messkurve. Für die Auswertung wurden am Start (0 s) und am Ende einer Injektion (285 s) sogenannte *Report Points* gesetzt. Die daraus resultierenden Werte wurden für die Auswertung verwendet. In der Ergebnisdarstellung repräsentiert eine Säule des Diagramms einen Mittelwert von vier unabhängigen Messungen.

2.4 Glykananalytische Methoden

2.4.1 Nachweis von gebundenen Sialinsäuren

Nachweis mittels Neuraminidasebehandlung

Neuraminidasen sind eine Familie von Enzymen, die terminale Sialinsäuren von Glykoproteinen abspalten. Die Abspaltung sorgt hierbei für eine Veränderung des apparenten Molekulargewichts des Glykoproteins, die man über SDS-PAGE nachweisen kann. Die Ausstattung eines Glykoproteins mit Sialinsäuren ist spezies-, gewebe-, zell- und proteinspezifisch und hat starken Einfluss auf die Bindungseigenschaften eines Proteins.

Für den qualitativen Nachweis von Sialinsäuren auf L-Selektin-IgG wurde eine α 2-3,6,8-Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* als Agarosekonjugat eingesetzt (Calbiochem/Merck, Darmstadt). Pro Ansatz wurden 2 μ l L-Selektin-IgG-Lösung

(Stlsg. 0,2-0,3 mg/ml) mit 38 µl des Agarosekonjugats über Nacht bei 37°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Durch Zentrifugation wurde das Agarosekonjugat vom L-Selektin-IgG wieder getrennt und die Proteinkonzentration mittels ELISA überprüft. Anschließend wurde L-Selektin-IgG mittels SDS-PAGE mit Silberfärbung analysiert und die Bindung nach Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel (30 ng/Ansatz) mittels SPR bei 20 µl/min gemessen. Pro Charge wurden mindestens sechs Messungen durchgeführt.

Nachweis mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung des Anteils von Sialinsäuren an der Gesamtglykosylierung von rekombinantem L-Selektin-IgG, welches mit und ohne zusätzlichem Angebot des Sialinsäurevorläufers *N*-Acetyl-beta-D-Mannosaminhydrat (ManNAc) in CHO-Zellen exprimiert wurde. Der Nachweis gründet auf einer Umsetzung von Sialinsäuren zusammen mit 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol (DMB) zu einem fluoreszierenden Derivat, welches über HPLC detektiert werden kann. Von ca. 8 µg rekombinantem L-Selektin-IgG wurden die Sialinsäuren mittels saurer Hydrolyse durch Vermengung mit 200 µl 3 M Essigsäure abgespalten (für 90 min bei 80°C). Es folgten 20 min Abkühlung auf Eis, die Einstellung des pH-Wertes mit 25%iger Ammoniaklösung auf pH 4,0 (Zugabe von 20 - 25 µl) und die Trocknung der Proben in der *SpeedVac*. Die getrockneten Proben wurden anschließend in 10 µl ddH₂O aufgenommen und mit 20 µl sogenanntem DMB-Labelreagenz (7 mM DMB, 750 mM β-Mercaptoethanol, 18 mM NaHSO₃) versetzt. Es folgten 2,5 h Inkubation bei 56°C im Dunkeln. Für die Messung wurden dann je 1,4 µl der gelabelten Ansätze in 200 µl ddH₂O verdünnt, wovon anschließend 50 µl auf eine Gemini C18 HPLC-Säule (Partikelgröße 5 µm, Porengröße 110 Å) der Firma Phenomenex (Aschaffenburg) aufgetragen wurden. Die Trennung über HPLC (Dionex, Germering) erfolgte bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min. Das fluoreszierende Derivat konnte über einen Durchfluss-Fluoreszenz-Spektralphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 343 nm und einer Emissionswellenlänge von 448 nm nachgewiesen werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den Vergleich mit einer *N*-Acetylneuraminsäurereferenz (NANA). Die bekannte Konzentration an NANA und die gemessene Peakhöhe wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, so dass über die Anwendung des Dreisatzes auch der NANA-Anteil der untersuchten Proben bestimmt werden konnte.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellkultur

2.5.1.1 CHO-Zellen

CHO-Zellen (*chinese hamster ovaries*; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig) sind adhärenente Zellen, die in Zellkulturmedium (Tab. 20) als *Monolayer* wachsen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturschalen der Firma BD Biosciences (Heidelberg). Zum Passagieren der Zellen wurde das alte Zellkulturmedium abgenommen und der Zell*monolayer* durch Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein) vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Nach Ablösen der Zellen (ca. 3 - 5 min) wurden 7 ml Zellkulturmedium zugegeben, die Suspension zentrifugiert (5 min, 134 x g), der Überstand entfernt und das Zellpellet in 10 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen pro Schale wurden die Zellen neu ausgesät. Das Volumen pro Schale betrug 10 ml und wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

Tabelle 20: CHO-Zellkulturmedium

	Firma
DMEM High Glucose mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
1% (v/v) HEPES <i>buffer solution</i> (1M)	PAA Laboratories, Pasching
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein
10% (v/v) <u>Fetal Calf Serum</u> (FCS)	Biochrom AG, Berlin

2.5.1.2 K-562- und NALM-6-Zellen

Tabelle 21: K-562- und NALM-6-Zellkulturmedium

	Firma
RPMI1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
1% (v/v) HEPES <i>buffer solution</i> (1M)	PAA Laboratories, Pasching
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein
0,5 mg/ml G418 <i>Sulphate</i> (Genitacin)	PAA Laboratories, Pasching
10% (v/v) <u>Fetal Calf Serum</u> (FCS) <u>oder</u>	Biochrom AG, Berlin
10% (v/v) <i>Ultra Low IgG</i> FCS	GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein

Die Zelllinien K-562 (DSMZ, Braunschweig) und NALM-6 (DSMZ, Braunschweig) waren in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe transfiziert worden. Die Zelllinie K-562 exprimierte ein sL-IgG-Konstrukt (sL steht für *soluble L*-Selektin; dieser Form fehlen die cytoplasmatischen und transmembranären Sequenzen), welches über den

Vektor pcDNA3 in die Zellen gebracht wurde. Die Zelllinie NALM-6 (DSMZ, Braunschweig) wurde mit einem FL-Konstrukt transfiziert (FL steht für *full length*; diese Form beinhaltet den gesamten codierenden Bereich der L-Selektin cDNA), welches mit dem Vektor pCR3.1 in die Zellen transportiert wurde. Bei beiden Zelllinien handelt es sich Suspensionszellen, die zur Langzeitlagerung bei -80°C eingefroren waren. Das Auftauen der Kryokulturen erfolgte nach dem in 2.5.2 beschriebenen Vorgehen. Zum Passagieren der Zellen wurde das Zellkulturmedium alle 2-3 Tage bei einer Zelldichte von 1,0 - 1,5 x 10⁶ Zellen/ml zu $\frac{2}{3}$ abgenommen und mit frischem Zellkulturmedium (Tab. 21) aufgefüllt.

Um die Expressionsstärke der K-562 Zellen zu erhöhen, wurde den Zellen fünf Tage vor beabsichtigter Ernte einmalig PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) zugegeben (Endkonzentration 240 nM). Die Inkubation der K-562 Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂, allerdings ohne weitere Versorgung mit Frischmedium. Rekombinantes L-Selektin-IgG wurde anschließend über eine affinitätschromatographische Aufreinigung mittels Protein A-Sepharose isoliert. Um eine Aufreinigung von zusätzlichem IgG (aus dem FCS) zu vermeiden, wurde die Expression auf *Ultra Low* IgG FCS der Firma GibcoBRL/Invitrogen (Eggenstein) umgestellt (Tab. 21).

Die in Kultur genommenen NALM-6-Zellen wurden nach der in 2.5.3 beschriebenen Prozedur mehrfach angereichert, um sie dann in Flusskammerexperimenten einzusetzen.

2.5.1.3 KG1a-Zellen

Tabelle 22: KG1a-Zellkulturmedium

	Firma
RPMI1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
1% (v/v) HEPES <i>buffer solution</i> (1M)	PAA Laboratories, Pasching
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein
5 µg/ml Blastocidin S HCl	Invitrogen, Karlsruhe
10% (v/v) <u>Fetal Calf Serum</u> (FCS) <u>oder</u>	Biochrom AG, Berlin
10% (v/v) <i>Ultra Low</i> IgG FCS	GibcoBRL/Invitrogen, Eggenstein

Zum Passagieren der Suspensionszelllinie KG1a (DSMZ, Braunschweig) wurde das Zellkulturmedium (Tab. 22, vor einer Transfektion ohne Antibiotikum) alle 2-3 Tage bei einer Zelldichte von 1,0 - 1,5 x 10⁶ Zellen/ml zur Hälfte abgenommen und mit frischem Zellkulturmedium (Tab. 22, ohne Blastocidin) aufgefüllt. Bei Bedarf wurden die Zellen vorher in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

2.5.2 Einfrieren und Auftauen von Kryokulturen

Tabelle 23: Einfriermedium

DMEM bzw. RPMI1640	7 ml
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	2 ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 ml

Zum Einfrieren wurden Zellen einer dichtgewachsenen Zellkultur sedimentiert, in 1 ml Einfriermedium (Tab. 23) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Mit Hilfe des Zelleinfriergeräts Nicool LM10 (Merck Eurolab, Berlin) wurden die Zellen nach definiertem Vorgehen (30 min Stufe 3, 10 min Stufe 10) auf -80°C abgekühlt und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 20 ml Zellkulturmedium überführt, zentrifugiert (10 min, 134 x g) und das Zellpellet in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen.

2.5.3 Anreicherung L-Selektin-transfizierter NALM-6-Zellen

Um stark L-Selektin-exprimierende Klone aus einer Zellpopulation neu in Kultur genommener NALM-6-Zellen zu isolieren, wurde eine Anreicherung mit Hilfe von Magnetpartikel durchgeführt. 100 µl *Dynabeads M-450* (Dyna, Hamburg), vom Hersteller mit *sheep anti-mouse* Antikörpern vorbeschichtet, wurden dreimal mit 500 µl Bindungspuffer (PBS/FCS 1:1) gewaschen und zum Absetzen in ein Magnetständer der Firma Serva (Heidelberg) überführt. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Pellets in 200 µl Bindungspuffer aufgenommen, gefolgt von einstündigen Inkubation mit 6 µg DREG-200-Antikörper (auf einem Überkopfschüttler). Während dieser Inkubation wurden 2×10^7 NALM-6-Zellen zentrifugiert (134 x g, 8 min), zweimal mit PBS gewaschen, rezentrifugiert und in 1 ml RPMI1640 aufgenommen (ohne weitere Zusätze). Die Magnetpartikel wurden nach Antikörperinkubation zweimal mit Bindungspuffer gewaschen und die vorbereiteten NALM-6-Zellen zu den Magnetpartikeln überführt. Es folgte die Zugabe von 1 ml RPMI1640 ohne Zusätze. Die Zellen und Magnetpartikel wurden für 10 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert und dreimal mit 1 ml Zellkulturmedium (Tab. 21) gewaschen. Anschließend wurden die Magnetpartikel inklusive gebundener Zellen in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche (50 ml) mit 9 ml Zellkulturmedium überführt und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Magnetpartikel inklusive

gebundener Zellen erneut dreimal gewaschen, in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.5.4 Transfektion und Proteinexpression in eukaryontischen Zelllinien

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in der vorliegenden Arbeit ausschließlich in eukaryontischen Zellsystemen. Hierfür wurden die Zelllinien CHO, K-562, KG1a und NALM-6 eingesetzt. Die Transfektion der Zelllinien K-562 und NALM-6 war bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durchgeführt worden. Die Zellkultur und Proteinexpression erfolgte nach dem in 2.5.1.2 beschriebenen Vorgehen.

Die Transfektion von CHO-Zellen erfolgte mittels der Polyethylenimin-Lösung ExGen 500 (Fermentas, St. Leon-Roth), die Transfektion der Zelllinie KG1a mittels mehrerer unterschiedlicher Methoden. Eine geeignete Transfektionsmethode für KG1a-Zellen war nicht bekannt, so dass eine Reihe von Transfektionsmethoden ausgetestet wurden (s. 2.5.4.2). Es wurden Transfektionsversuche mittels Polyethylenimin-Lösungen (ExGen 500 der Firma Fermentas; jetPEI der Firma Biomol), Ca²⁺-Phosphat (Promega, Mannheim) und unterschiedlicher Elektroporationsmethoden (u. a. Nukleofektion) durchgeführt.

2.5.4.1 CHO-Zellen

ExGen 500 ist ein nicht-virales, nicht-liposomales Transfektionsreagenz, welches aus dem kationischen Polymer Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 22 kDa besteht. Eine Transfektion mittels ExGen 500 erreicht in der Regel eine hohe Effizienz, die zum einen auf der hohen Kapazität für kondensierte DNA und der Interaktion mit anionischen Proteoglykanen auf der Zellmembran und zum anderen auf dem Schutz der DNA vor Degradation beruht. DNA/ExGen 500-Komplexe werden mittels Endocytose in die Zelle aufgenommen.

Für eine Transfektion wurden am Vortag 6×10^6 CHO-Zellen in 30 ml Zellkulturmedium (Tab. 20) aufgenommen und ausgesät (75 cm² Zellkulturflasche). Die Zellen wurden am Folgetag mit PBS gewaschen, mit 27 ml FCS-freiem Zellkulturmedium versetzt und zur Regeneration für 1 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde, wenn beabsichtigt, mit dem Sialinsäurevorläufer *N*-Acetyl-beta-D-Mannosaminhydrat (MW 239,2 g mol⁻¹; 500 mM Stammlösung in PBS; 5 mM Endkonzentration pro Ansatz) versetzt.

Für eine Transfektion wurden 30 µg Plasmid-DNA mit 3 ml NaCl (0,9% (w/v)) gemischt und mit 100 µl ExGen 500 versetzt. Die ExGen-Lösung wurde tropfenweise unter stetigem Vortexen zur DNA zugegeben und nach Abschluss noch weitere 10 s gemischt. Es folgten 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Daran anschließend wurde die DNA/ExGen 500-Lösung zu den 50-70% konfluent gewachsenen CHO-Zellen gegeben und für 72 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Rekombinantes Protein wurde anschließend affinitätschromatographisch isoliert, durch SDS-PAGE mit Silberfärbung analysiert und die direkt Bindung ohne vorherige Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel mittels SPR bei 30 µl/min gemessen. Pro Konzentrationswert wurden drei Messungen durchgeführt.

2.5.4.2 KG1a-Zellen

Die humane hämatopoetische Zelllinie KG1a wurde im Vergleich mit mehreren gängigen humanen, leukocytären Zelllinien als diejenige Zelllinie identifiziert, die am effektivsten die für die L-Selektin-Bindung notwendigen posttranslationalen Modifikationen (Glykosylierung und Sulfatierung) von L-Selektin-Liganden durchzuführen vermag [G. Hams, Dissertationsschrift, 2002]. Daher ist sie die Zelllinie der Wahl, um funktionell hochgradig aktive L-Selektin-Liganden (PSGL-1-IgG- und Hsc70-IgG-Chimären) rekombinant herzustellen. Allerdings existierte bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit kein effizientes Transfektionsprotokoll zur Erzeugung stabiler KG1a-Transfektanten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher eine Reihe gängiger Transfektionsmethoden getestet.

Transfektion mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation werden suspendierte Zellen in einer speziellen Apparatur, dem Elektroporationsgerät, in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Plasmamembran, durch die Makromoleküle wie DNA in die Zelle gelangen können. Diese Methode eignet sich prinzipiell auch für schwierige Zelltypen. Sowohl K-562- als auch NALM-6-Zellen waren bereits über diese Methode erfolgreich transfiziert worden. Für die Transfektion der KG1a-Zellen wurde die Durchführung entsprechend ausgetestet. Voraussetzung war, dass sich die Zellen in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Dafür wurden die Zellen über mehrere Wochen auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Elektroporation wurde mit

0,4 cm-Küvetten (Eppendorf, Hamburg) und dem Elektroporationsgerät *Gene Pulser II* (Biorad, München) bei 950 μ F und 350 V durchgeführt.

Eingesetzt wurden 0,6 ml einer Zellsuspension von 3×10^7 Zellen/ml. Die Zellen wurden vorher mit PBS (w/o Ca^{2+}) gewaschen und in Zellkulturmedium (RPMI1640) aufgenommen, welches zuvor mit 10 mM Glucose und 0,1 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt worden war. Zum Ansatz wurden 20 μ g frisch präzipitierte und in sterilem ddH₂O aufgenommene Plasmid-DNA zugegeben. Es folgte die Überführung der Suspension in die Küvetten und eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4°C. Die Zellen wurden anschließend dem elektrischen Puls ausgesetzt. Nach der Elektroschockbehandlung wurden die Zellsuspensionen für weitere 10 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend in 5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium (Tab. 21, ohne Genitacin) aufgenommen. Das Zellkulturmedium wurde am folgenden Tag erneuert. Die Zentrifugation (210 x g) erfolgte bei Raumtemperatur.

Für die Transfektionsversuche wurden sowohl pEGFP-C1 (BD Biosciences, Heidelberg) als Transfektionskontrolle als auch pcDNA3-*hsc70-IgG* und pcDNA-3-*psgl-1-IgG* eingesetzt. Die Vektoren sollten Genitacinresistenz vermitteln. Das Genitacin wurde dem Zellkulturmedium am ersten Folgetag des Elektroschocks (Endkonzentration 0,5 mg/ml) zugesetzt. Für fünf Tage erfolgte jeden Tag ein Mediumwechsel, wobei das Zellkulturvolumen der jeweiligen Zellzahl angepasst wurde. Nachfolgend wurde das Zellkulturmedium nur noch alle 2-3 Tage gewechselt. Für pEGFP-C1 erfolgte die Überprüfung des Transfektionserfolges unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Transfektion mittels jetPEI

Bei jetPEI handelt es sich, wie bei ExGen 500, um ein kationisches Polymer aus Polyethylenimin, welches in komplexierter Form mit DNA mittels Endocytose in die Zelle gelangt. JetPEI verpackt DNA in positiv geladene Partikel, die somit in die Lage versetzt werden mit anionischen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche zu interagieren und durch Endocytose aufgenommen zu werden.

Für die Evaluation der Transfektionseffizienz wurde das Kontrollplasmid pEGFP-C1 (BD Biosciences, Heidelberg) eingesetzt. 2-4 μ g Plasmid-DNA wurden mit 100 μ l 150 mM NaCl (A) und 4-8 μ l jetPEI-Lösung mit 100 μ l 150 mM NaCl (B) unter vorsichtigem Vortexen gemischt. Es folgte die sofortige Überführung von (B) in (A) und die Durchmischung der Lösung mit anschließender Inkubation für 15-30 min bei

Raumtemperatur. Der Transfektionsversuch erfolgte im 6-Well-Plattenmaßstab. Pro Well wurden 1×10^6 Zellen in 2 ml Zellkulturmedium (Tab. 21, ohne Genitacin) ausgesät und 200 μ l der vorbereiteten Transfektionslösung zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Der Transfektionserfolg wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Transfektion mittels ExGen 500

Wie in 2.5.4.1 beschrieben handelt es sich bei ExGen 500 um ein auf Polyethylenimin basierendes Transfektionsreagenz. Die Transfektion wurde in den Vertiefungen einer 6-Well-Platte durchgeführt. Für die Evaluation der Transfektionseffizienz wurde das Kontrollplasmid pEGFP-C1 (BD Biosciences, Heidelberg) eingesetzt. 2 μ g Plasmid-DNA wurden mit 100 μ l NaCl (0,9% (v/v)) versetzt. Daran anschließend folgte tropfenweise, unter stetigem Vortexen, die Zugabe von 6,6 μ l der ExGen 500-Lösung. Nach Abschluss der Zugabe wurde das Vortexen noch weitere 10 s fortgesetzt. Daraufhin folgten 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Pro Well wurden 5×10^5 Zellen in 2 ml Zellkulturmedium (Tab. 21, ohne Genitacin) ausgesät und 200 μ l der vorbereiteten Transfektionslösung zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Der Transfektionserfolg wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Transfektion mittels Calciumphosphat

Bei der Calciumphosphat-Methode wird die DNA mit Calciumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung gemischt. Dabei bilden sich feine DNA-Calciumphosphat-Kristalle, die sich, wenn sie mit Zellen in Kontakt kommen, auf der Zelloberfläche niederschlagen. Die DNA gelangt anschließend über Endocytose in die Zelle. Für die Transfektion der Zelllinie KG1a wurde das *ProFection Mammalian Transfection System – Calcium Phosphate* der Firma Promega (Mannheim) eingesetzt. Für die Evaluation der Transfektionseffizienz wurde das Kontrollplasmid pEGFP-C1 (BD Biosciences, Heidelberg) eingesetzt. Die Transfektion erfolgte in den Vertiefungen einer 6-Well-Platte. Am Vortag waren $2,8 \times 10^5$ Zellen/Well in 2 ml Zellkulturmedium (Tab. 21, ohne Genitacin) ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert worden. Pro Transfektionsansatz wurden 3,5 μ g der Plasmid-DNA mit 21,7 μ l 2 M CaCl₂ und 149,8 μ l H₂O gemischt (A). In ein zweites Mikroreaktionsgefäß wurden 175 μ l 2x HEPES *buffered saline* (HBS) überführt (B). Unter vorsichtigem Vortexen folgte die Überführung von (A) in (B) und 30 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die

Ansätze wurden gut durchmischt und dann tropfenweise zu den vorbereiteten Zellen gegeben. Es folgten 16 h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂.

Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurden Schockprozeduren mit DMSO und Glycerol ausgetestet. Im Falle des DMSO-Schocks wurde im Vorfeld die Schocklösung (1x PBS, 10% (v/v) DMSO) auf 37°C erwärmt. Für die Anwendung des DMSO-Schocks wurde das Zellkulturmedium vorsichtig entfernt und 1 ml der Schocklösung zu den Zellen zugegeben. Die Zellen wurden für maximal 2,5 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Schocklösung vorsichtig entfernt und 2 ml frisches Zellkulturmedium (Tab. 21, ohne Genitacin) zugegeben.

Im Falle des Glycerol-Schocks wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, 1 ml Schocklösung (1x HBS, 15% (v/v) Glycerol) pro Ansatz zugegeben und für maximal 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schocklösung wurde anschließend vorsichtig entfernt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und 2 ml frisches Zellkulturmedium (Tab. 21, ohne Genitacin) zugegeben. Sowohl nach DMSO- als auch Glycerol-Schock folgten 24 h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂. Der Transfektionserfolg wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Transfektion mittels Nukleofektion

Bei dieser Transfektionsmethode handelt es sich um eine modifizierte Elektroporationsmethode, die laut Herstellerangaben (Amaxa, Köln) die direkte Einschleusung der DNA bis in den Zellkern verspricht. Das unmittelbare Einsetzen der Expressionsmaschinerie kann so bei Verwendung eines geeigneten Vektors bereits 3-4 Stunden nach Transfektionsereignis überprüft werden. Für die Evaluation der Transfektionseffizienz wurde das Kontrollplasmid pEGFP-C1 (BD Biosciences, Heidelberg) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit dem Gerät *Nucleofector 1*. Von der Firma Amaxa wurden zudem verschiedene Lösungen (*Nucleofector Solution R, T, und V*) angeboten. Die *Nucleofector*software besitzt eine Vielzahl von Programmen, die in Abhängigkeit von Zelllinie und gewählter Lösung zum entsprechenden Transfektionserfolg führen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Programme und Lösungen ausgetestet, um die bestmöglichen Voraussetzungen für eine stabile Transfektion der Zelllinie KG1a zu ermitteln. Folgende Bedingungen konnten ermittelt werden: Pro Transfektionsansatz 5 x 10⁶ Zellen und 5 µg Plasmid-DNA in 100 µl Transfektionslösung V; Durchführung der Nukleofektion mit Programm A23; nach jeder Elektroporation sofortige Zugabe von vorgewärmtem (37°C) Zellkulturmedium

(Tab. 22, ohne Blastocidin) mit anschließendem Transfer in eine der Vertiefungen einer 12-Well-Platte; Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ für 24 h. Pro Konstrukt wurden mindestens drei Ansätze (für spätere Vereinigung) transfiziert; nach 24 h Mediumwechsel unter Zugabe von Blastocidin (Endkonzentration 5 µg/ml); nach 14 Tagen Vereinigung der zueinander gehörenden Ansätze zu einem Gesamtansatz unter Zugabe proliferierender, nicht-transfizierter Zellen (1,5 x 10⁷ frische Zellen/Gesamtansatz). Da das Antibiotikum Geneticin für die Generierung stabiler Transfektanten nicht ausreichend schnell Wirkung zeigte, wurde die Selektion auf das Antibiotikum Blastocidin umgestellt.

Rekombinantes Protein (PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG) aus Zellkulturüberstand wurde affinitätschromatographisch isoliert. Um eine Aufreinigung von zusätzlichem IgG (aus dem FCS) zu vermeiden, wurde für die Expression *Ultra Low IgG FCS* der Firma GibcoBRL/Invitrogen (Eggenstein) verwendet (Tab. 22).

2.5.5 *Fluorescent activated cell sorter (FACS)*

Eine Methode, ganze Zellpopulationen in ungetrenntem Zustand analysieren zu können, gelingt mit dem sogenannten FACS. Dieses Gerät besteht u. a. aus einer Messeinheit, die folgende Parameter messen kann: über einen Laserstrahl von 488 nm kann die Vorwärtsstreuung die Größe und die Seitwärtsstreuung (Messung im 90°-Winkel) die Granularität der Zellen feststellen. Oberflächenmarker der Zellen (CD-Marker) werden mittels fluorochrommarkierter Antikörper dargestellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte mittels FACS eine Überprüfung der L-Selektin-Expression auf transfizierten NALM-6-Zellen. Pro Messung wurden 1 x 10⁶ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 134 x g), einmal mit PBS gewaschen (ad 3 ml), rezentrifugiert, einmal mit 3 ml Blocklösung (1x PBS, 5% (v/v) Ziegen Serum) gewaschen und erneut rezentrifugiert. Die Zellen wurden in 50 µl Blocklösung resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Es wurden 10 µl der mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten Antikörper *Anti-human* CD62L FMC 46 (Chemicon, Hampshire, Großbritannien), *Anti-human* CD10 MEM 78 (Chemicon) oder *Mouse* IgG1/IgG2b (1:1, negative Isotypenkontrolle) (Chemicon) zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden durch einmaliges Waschen mit 3 ml Blocklösung entfernt, die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und die Fluoreszenz der markierten Zellen im FACS-Gerät (Beckman Coulter Epics XL, Firma Beckman Coulter, Miami, FL, USA) gemessen. Die Aufzeichnung der Vorwärts-

und Seitwärtsstreuung erfolgte mit der SYSTEM II Software der Firma Beckman Coulter (Miami, FL, USA).

2.5.6 Flusskammer

Die Flusskammer wurde entwickelt, um die physikalischen Bedingungen, wie sie im zirkulierenden Blut vorherrschen, so genau wie möglich nachzustellen. Dieses Modell wurde zuerst von Lawrence und Springer (1991) beschrieben und erlaubt die Untersuchung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung auf Endothel und Leukocyten unter annähernd physiologischen Bedingungen. Die Flusskammermessungen der vorliegenden Arbeit wurden in Kooperation mit Dr. Andreas Zakrzewicz (Charité Berlin, Institut für Physiologie) durchgeführt.

Innerhalb der Flusskammer fungiert ein Hohlraum als Flusskanal. Die seitlichen Begrenzungen des Flusskanals treten entlang der Flussrichtung in einer hyperbolischen Kurve auseinander. Bei einer konstanten und definierten Flussrate ist der Scherstress eine Funktion der Flusskammerbreite. Der Scherstress nimmt mit zunehmender Breite des Flusskanals und mit wachsender Entfernung von der Eintrittsstelle in der Flusskammer ab. Dadurch entsteht bei definierter Flussrate an jeder Stelle der Flusskammer eine definierte Scherstressbedingung. In der eingesetzten Flusskammer liegt der Scherstress bei einer Flussrate von 116 $\mu\text{l}/\text{min}$ zwischen 0,6-2,6 dyn/cm^2 [C. Fieger, Dissertationsschrift, 1997]. Abbildung 32 zeigt den schematischen Aufbau einer Flusskammer.

Für die Untersuchungen zur Hemmung der L-Selektin-abhängigen Adhäsion wurden L-Selektin transfizierte NALM-6-Zellen über TNF- α aktiviertes Endothel geschickt, die in Abhängigkeit von der Scherkraft binden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Endothelzellen waren sogenannte HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*). HUVECs wurden 2-3 Tage vor einer Untersuchung nach einem bereits schon länger beschriebenen Vorgehen isoliert [Jaffe *et al.*, 1973]. Zu Beginn einer Präparation wurden Nabelschnurvenen mit sogenannter *Hank's*-Lösung gespült, um restliches Blut zu entfernen, mit 0,2% Typ II Kollagenase (Biochrom AG, Berlin) gefüllt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Endothelzellen wurden daran anschließend durch zweimaliges Waschen mit *Hank's*-Lösung herausgespült, zentrifugiert, resuspendiert, in fibronectinbeschichteten Zellkulturflaschen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgesäht und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Als Zellkulturmedium wurde *Endothelial Cell Basal Medium MV* der Firma PromoCell (Heidelberg) verwendet, welches vorher mit 5% (v/v) FCS,

0,4% (v/v) *Endothelial Growth Supplement/Heparin*, 0,001% (w/v) hEGF, 0,1% (w/v) Hydrokortison und 5% (w/v) Gentamycinsulfat, alles zusammen als Supplement Pack MV (PromoCell) angeboten, versetzt wurde. Die Reinheit der Endothelzellen wurde durch eine Positivfärbung (von Willebrand Faktor) und eine Negativfärbung (*smooth muscle actin*) überprüft. Die HUVECs wurden in Zellkulturflaschen kultiviert bis sie konfluent gewachsen waren. Anschließend wurden die Zellen geerntet und auf Deckgläschen ausgesät. Diese einmal passagierten HUVECs wurden für die Flusskammerexperimente eingesetzt. Die HUVECS wurden zunächst mit TNF- α (100 U/ml; Alexis, Lausen, Schweiz) aktiviert (5 h Exposition) und in eine von Lawrence und Springer nachempfundene Flusskammer überführt [Lawrence *et al.*, 1991]. Außerdem wurden bei Bedarf die HUVECs vor Überführung in die Flusskammer eine Stunde vor Versuchsbeginn mit Anti-Human E-Selektin- (Endkonzentration 2,4 $\mu\text{g/ml}$, R&D Systems, Wiesbaden) und Anti-Human P-Selektin-spezifischen Antikörpern (Endkonzentration 1,2 $\mu\text{g/ml}$, R&D Systems, Wiesbaden) vorinkubiert. Dieser Fall trat ein, als bei Untersuchungen zur Hemmwirkung von PAA-basierten Ligandenkonjugaten entgegen den Erwartungen eine Verstärkung der Bindung von L-Selektin-transfizierten NALM-6-Zellen zu beobachten war. E- und P-Selektin unterstützten in diesem Zusammenhang die Adhäsion der NALM-6-Zellen nach Inkubation mit PAA-basierten Ligandenkonjugaten. Da die verwendeten Konjugate als Liganden von E- und P-Selektin beschrieben waren [Weitz-Schmidt *et al.*, 1996; Game *et al.*, 1998; Pochechueva *et al.*, 2002; Pochechueva *et al.*, 2003], wurde das Endothel mit entsprechend blockierenden Antikörpern vorbehandelt. Eine Verstärkung der Bindung von NALM-6-Zellen konnte somit blockiert werden. Die HUVECs wurden nach Überführung in die Flusskammer mit einer Schablone abgedeckt und in die Apparatur eingespannt. Die Schablone besitzt einen Hohlraum, der mit seinen Begrenzungen den Flusskanal bildet.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Hemmwirkung verschiedener Substanzen wurden NALM-6-Zellen 10-15 min vor Versuchsbeginn mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen vorinkubiert. Pro Messansatz wurden 100 μl Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) am Eingang des Flusskanals dem Perfusionsmedium (Medium 199 mit *Hank's* Salzen) zugesetzt. 5 min nach Versuchsbeginn und unter Beibehaltung der Flussbedingungen wurden die Zellen gezählt, die an das Endothel gebunden hatten.