

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines SPR-Bindungsassays – Ermittlung des Assayaufbaus

L-Selektin ist ein auf Leukocyten lokalisierter Adhäsionsrezeptor, der in der physiologischen Situation seine Bindungsfunktion unter dynamischen Flussbedingungen ausübt. Um die rheologischen Blutstrombedingungen *in vitro* ausreichend nachahmen zu können, waren bei entsprechender Eignung Untersuchungen mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie vorgesehen. Erste Untersuchungen zielten auf die Etablierung und Standardisierung eines neuen SPR-Bindungsassays (SPR: *surface plasmon resonance*) ab. Als modellhafte Interaktionspartner wurden rekombinant hergestelltes L-Selektin-IgG und der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) verwendet. Bei L-Selektin-IgG handelt es sich um das humane sL-Selektin fusioniert mit humanem F_{cy}. Das sL-Selektin steht für „soluble“ L-Selektin, entsprechend der löslichen Form des Moleküls. Dieser Form fehlen die cytoplasmatische und transmembranäre Sequenz. Es erfolgte zuerst die Immobilisierung des biotinylierten Liganden SiaLe^x-PAA-sTyr auf einem mit Streptavidin vorbeschichteten Sensor Chip SA. Anschließend wurde L-Selektin-IgG in Lösung über den Chip gegeben. Während der ersten Messungen wurde die gerätinterne Temperatur auf 25°C eingestellt und eine Fließgeschwindigkeit von 20 µl/min festgelegt.

3.1.1 Erhöhung der Bindungswerten von L-Selektin

Aus Vorversuchen war bekannt, dass SPR-Bindungsexperimente mit der monovalenten Form von L-Selektin zu keinen ausreichenden Bindungssignalen führen. Aus anderen Bindungsassays (z. B. Bindungs-ELISA) war ebenfalls bekannt, dass für die Bindung an immobilisierte Liganden eine Erhöhung der Bindungswerten von L-Selektin in der löslichen Phase erforderlich ist. Für eine Erhöhung der Bindungswerten von L-Selektin-IgG im SPR-Bindungsassay wurden zwei Strategien verfolgt:

1. Antikörper-Crosslinking am IgG-Abschnitt des Proteins.
2. Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel (Ø 20 nm bzw. 15 nm).

Die Oberfläche des Sensor Chip SA besteht aus einer carboxymethylierten Dextranmatrix, auf der Streptavidin immobilisiert wurde. In der Nomenklatur wird ein auf dem Sensor Chip immobilisiertes Molekül als „Ligand“ definiert, der in Lösung befindliche Interaktionspartner als „Analyt“. Die Immobilisierung von „Liganden“ kann im BIACORE X auf zwei voneinander getrennten Chipspuren erfolgen und parallel gemessen werden. Neben der Immobilisierung von SiaLe^x-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) auf einer der insgesamt zwei Spuren, erfolgte auf der zweiten Spur die Immobilisierung von *N*-Acetyllactosamin (LacNAc-PAA) als Negativkontrolle. L-Selektin-IgG bindet nicht an LacNAc-PAA. Das Beschichtungssignal erreichte jeweils ein Sättigungsniveau von ca. 800-900 *Resonance Units* (RU).

3.1.1.1 Polyvalenz mittels Antikörper-Crosslinking

Ziel dieser Untersuchung war es zu testen, ob durch die Verwendung von *Fcγ*-spezifischen Antikörpern eine stabile Erhöhung der Bindungswerten von L-Selektin erreicht werden kann. L-Selektin-IgG Fusionsprotein wurde hierfür mit verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher *Fcγ*-spezifischer Antikörper inkubiert und anschließend unter Flussbedingungen über den Sensor Chip gegeben.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Stärke des Bindungssignals abhängig vom verwendeten Antikörper ist (Abb. 5). Während mit Antikörper A bis zu einer Konzentration von 0,26 µg/µl das stärkste Bindungssignal zu detektieren war, konnte mit Antikörper C bei vergleichbarer Konzentration nur ein ¼ so starkes Bindungssignal erreicht werden. Mit Antikörper B wurden Bindungssignale erzielt, die sich zwischen denen der Antikörper A und C bewegten (Abb. 5).

Zudem konnte beobachtet werden, dass in Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper mit steigender Antikörperkonzentration ein Maximalwert der Bindungsaktivität erreicht wird, die mit fortlaufender Zunahme der Antikörperkonzentration bei gleichbleibender L-Selektin-IgG-Menge auch wieder abnehmen kann. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaktivität der Komplexe vom Antikörper-Antigenverhältnis abhängig ist. Gleichzeitig hängt die Bindungsaktivität der Komplexe auch von Eigenschaften des jeweiligen Antikörpers ab.

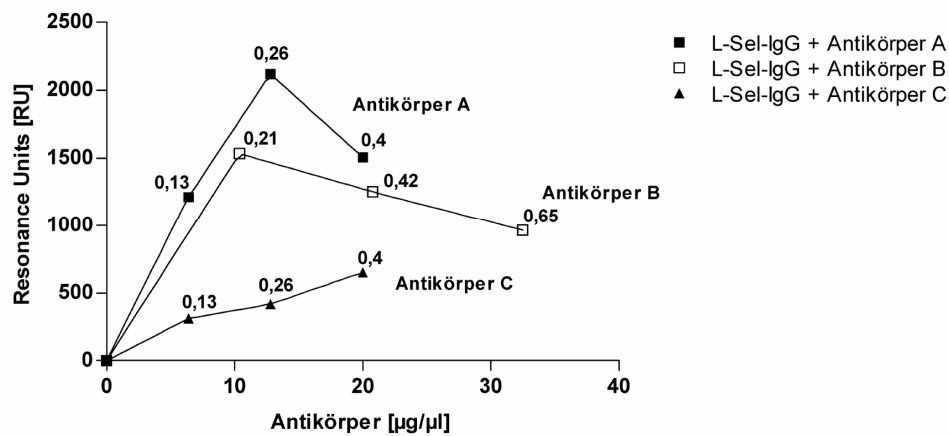


Abb. 5: Bindungsaktivität von L-Selektin-IgG nach Inkubation mit verschiedenen Antikörpern.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (12 µg pro 60 µl Ansatz) nach Vorinkubation mit folgenden Antikörpern analysiert: Antikörper A: α-h IgG (Fcγ)-POD, c = 0,8 µg/µl; Antikörper B: F(ab')₂, Goat α-h IgG, c = 1,3 µg/µl; Antikörper C: F(ab')₂, Goat α-h IgG (Fcγ)-POD, c = 0,8 µg/µl. Das Probenvolumen pro Messung betrug 35 µl.

3.1.1.2 Multivalenz durch Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel

Eine weitere Möglichkeit, die Bindungswerten von bivalentem L-Selektin-IgG zu erhöhen, bot die Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel (Ø 20 nm oder 15 nm). Durch solch eine Kopplung wurde eine deutliche Verstärkung der Bindungsaktivität erwartet, was durch erste Testmessungen auch bestätigt werden konnte. Mit dem Einsatz von nur 0,007 µg/µl L-Selektin-IgG konnte nach einer Kopplung auf Goldnanopartikel ein Bindungssignal detektiert werden wie mit 0,2 µg/µl L-Selektin-IgG nach Inkubation mit Antikörper A (Abb. 6). Eine Überprüfung der Bindungsaktivität von bivalentem L-Selektin-IgG ohne valenzerhöhende Vorbehandlung zeigte, dass sowohl der Einsatz von Antikörpern als auch die Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel eine deutliche Verstärkung des Bindungssignals bewirken. Nach Vorinkubation mit Antikörpern

Ergebnisse

konnte eine 30-72 mal stärkere Bindungsaktivität gemessen werden. Eine Hochrechnung für die Bindungsaktivität von 0,2 µg/µl L-Selektin-IgG nach Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel ergibt eine $2,14 \times 10^3$ -malige Verstärkung des Bindungssignals.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass über die Erhöhung von Bindungsalenzen eine Steigerung der Bindungsaktivität erreicht wird. Durch eine Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel konnte die vergleichsweise größte Bindungsaktivität gemessen werden.

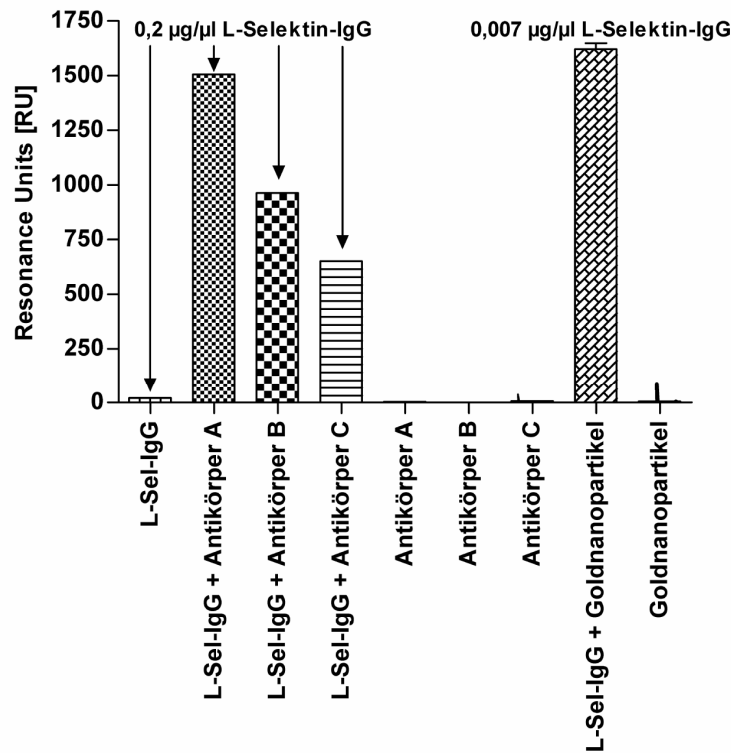


Abb. 6: Bindungsaktivität von L-Selektin-IgG nach Antikörperinkubation bzw. nach Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von L-Selektin-IgG gemessen. Gezeigt ist exemplarisch die Bindungsaktivität von L-Selektin-IgG (0,2 µg/µl) nach Inkubation mit den Antikörpern A, B und C (je 0,4 µg/µl, siehe Abb. 5) bzw. von L-Selektin-IgG (0,007 µg/µl) nach Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel. Das Probenvolumen pro Messung betrug 35 µl.

3.2 Etablierung eines SPR-Bindungsassays – Bestimmung der Assaybedingungen

Nach Untersuchungen zum Einfluss der Multimerisierung von L-Selektin auf die Bindung, erfolgten weitere Analysen zum Assayaufbau. Diese zielten auf die Bestimmung geeigneter Parameter für einen standardisierten und reproduzierbaren Bindungsassay ab. Eine Fließgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ und eine Temperatur von 25°C wurden bei allen Messungen konstant beibehalten.

3.2.1 Ermittlung einer geeigneten L-Selektin-IgG-Charge

Zunächst wurde die Bindung verschiedener L-Selektin-IgG-Chargen nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel untersucht. Der L-Selektin-IgG-Gehalt der verschiedenen Chargen wurde in einem ELISA ermittelt, so dass gleiche L-Selektin-IgG-Konzentrationen in einem standardisierten Probenvolumen von 35 μl untersucht werden konnten. Die Gewinnung von rekombinantem L-Selektin-IgG erfolgte durch Expression in der Zelllinie K-562, affinitätschromatographischer Reinigung über DREG-200 Antikörper-Sepharose (Charge 07/2001 und 06/2003) oder Protein A-Sepharose (Charge 03/2003 und 04/2003), Elution mit Glyzin-HCl, pH 2,8 - 3,2 (Charge 07/2001 und 06/2003) oder MgCl_2 (Charge 03/2003 und 04/2003).

Der Vergleich der Bindungsaktivität unterschiedlicher Chargen ist in Abbildung 7A dargestellt. Es zeigte sich, dass die Charge 07/2001 eine 4-fach stärkere Bindungsaktivität als Charge 06/2003 aufwies. Die Charge 07/2001 wurde daraufhin, wenn nicht anders erwähnt, in den Folgeexperimenten im SPR-Bindungsassay als Standardprotein eingesetzt. SDS-PAGE-Analysen mit anschließender Silberfärbung gaben einen Hinweis für den Grund der unterschiedlichen Bindungsaktivität. In Abbildung 7B ist gezeigt, dass die verschiedenen Chargen ein unterschiedliches Bandenmuster aufweisen. Die Veränderung der Intensität einzelner Banden lässt einen vermeintlichen proteolytischen Abbau der L-Selektin-IgG-Chimäre vermuten. Dies korreliert zugleich mit der unterschiedlichen Bindungsaktivität der L-Selektin-IgG-Chimäre in den verschiedenen Chargen. Die Charge mit der intensivsten L-Selektin-IgG Bande (Charge 07/2001) repräsentierte die Charge mit der stärksten Bindungsaktivität, während die Chargen mit nur wenig intaktem L-Selektin-IgG (Charge 04/2003 und 06/2003) die geringste Bindungsaktivität aufwiesen.

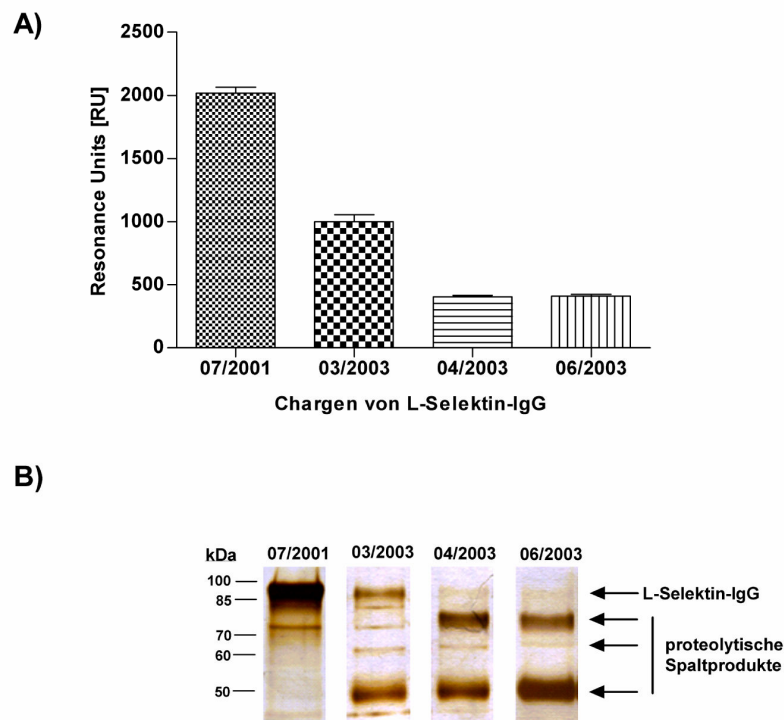


Abb. 7: Vergleich der Bindungsaktivität verschiedener L-Selektin-IgG-Chargen.

A) Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung verschiedener Chargen von rekombinantem L-Selektin-IgG nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Der L-Selektin-IgG-Gehalt der verschiedenen Chargen wurde vorher in einem ELISA zur L-Selektin-Konzentrationsbestimmung ermittelt. Gleiche L-Selektin-IgG-Konzentrationen wurden in einem standardisierten Probenvolumen von 35 µl eingesetzt. Ergebnis: Mit L-Selektin-IgG der Charge 07/2001 konnten die höchsten Bindungssignale gemessen werden. B) Analyse der L-Selektin-IgG-Chargen mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (7,5%iges Polyacrylamidgel, reduzierende Bedingungen). In den verschiedenen Chargen waren mehrere Proteinbanden zu erkennen. Intaktes L-Selektin-IgG wurde durch eine ca. 95 kDa große Proteinbande repräsentiert. Andere Fragmentbanden repräsentierten proteolytische Spaltprodukte. Ergebnis: Die Charge 07/2001 enthielt die wenigsten Nebenbanden.

3.2.2 Rekombinantes L-Selektin-IgG – Analyse der Lagerungsstabilität

Die Ermittlung einer geeigneten L-Selektin-IgG-Charge zeigte sowohl auf Ebene der proteinchemischen Analysen als auch auf Ebene der Bindungsanalysen erhebliche Qualitätsunterschiede zwischen den einzelnen Chargen. Um mehr über die Stabilität des rekombinanten L-Selektin-IgG zu erfahren, wurde ein Lagerungsexperiment durchgeführt. Im Experiment wurden Aliquots von L-Selektin-IgG mit Proteasehemmer oder potentiellen Stabilisatoren, sog. chemischen Chaperonen, versetzt und über mehrere Wochen bei 4°C gelagert. Als Proteasehemmer wurde sog.

„complete, EDTA-free“ der Firma Roche (Mannheim) getestet. Nach Produktinformationen handelt es sich um ein Proteaseinhibitorgemisch aus einem breiten Spektrum an Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren. Als mögliche Stabilisatoren wurden zudem sog. Biostab, Ectoin, Hydroxy-Ectoin und *N*-Acetyl-L-Lysin der Firma Biomol (Hamburg) jeweils in 1 M Endkonzentration getestet. Die Analyse der Stabilität erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (Abb. 8).

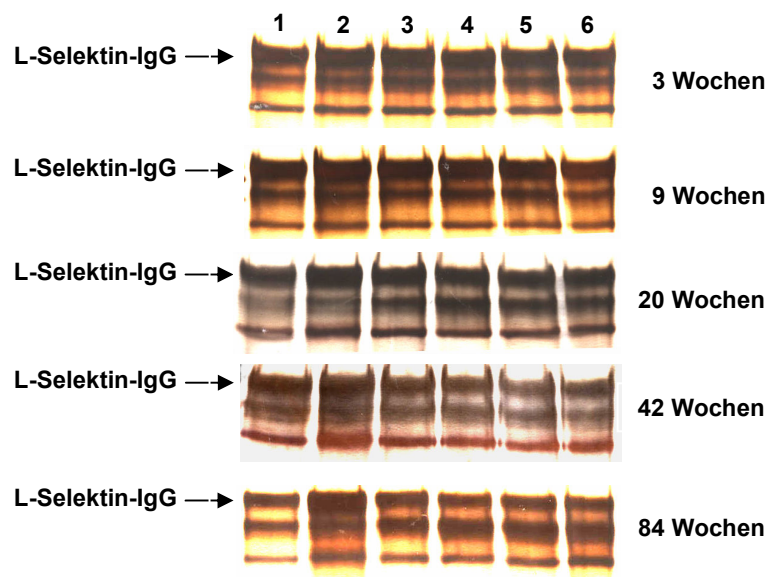


Abb. 8: Analyse der Stabilität von rekombinantem L-Selektin-IgG über insgesamt 84 Wochen.

L-Selektin-IgG wurde aus Zellkulturüberstand der stabil transfizierten Zelllinie K-562 mittels Immunoaffinitätschromatographie unter Verwendung des L-Selektin-spezifischen monoklonalen Antikörpers DREG-200 aufgereinigt. L-Selektin-IgG wurde mit 4 M $MgCl_2$ eluiert, umgepuffert und aufkonzentriert. Aliquots wurden daraufhin mit folgenden Proteasehemmern und Stabilisatoren versetzt: 1: L-Selektin-IgG ohne Zusätze; 2: L-Selektin-IgG + Proteaseinhibitorgemisch „complete, EDTA-free“; 3: L-Selektin-IgG + Biostab; 4: L-Selektin-IgG + Ectoin; 5: L-Selektin-IgG + Hydroxy-Ectoin; 6: L-Selektin-IgG + *N*-Acetyl-L-Lysin. Die L-Selektin-IgG-Konzentration pro Ansatz betrug 32 $\mu g/ml$. Die Analyse der Stabilität erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (7,5%ige Polyacrylamidgele, reduzierende Bedingungen). Pro Gelauftrag wurden 480 ng L-Selektin-IgG aufgetrennt.

Wie Abbildung 8 zeigt, veränderte sich nach mehrwöchiger Lagerung die Intensität der L-Selektin-IgG repräsentierenden Proteinbande (95 kDa) in fast allen Ansätzen mit gleicher Geschwindigkeit. Die Stabilisatoren hatten kaum Einfluss. Nur das Proteaseinhibitorgemisch „complete, EDTA-free“ erhöhte die Stabilität des Proteins. Damit konnte eine verschieden starke proteolytische Degradation der Chargen aus 3.2.1 als Ursache für den verringerten Gehalt an bindungsaktivem L-Selektin-IgG als wahrscheinlich angesehen werden.

3.2.3 Charakterisierung des Sialinsäureanteils von L-Selektin durch Neuraminidaseverdau

Neben rekombinantem L-Selektin-IgG aus K-562-Zellen bestand die Möglichkeit rekombinantes L-Selektin-IgG zu verwenden, das in anderen eukaryontischen Zellen exprimiert worden war. Da jedes Zellsystem L-Selektin zellspezifisch glykosyliert [Gohlke *et al.*, 1999, 2000; Fieger *et al.*, 2001], wurde ein unterschiedlicher Einbau von Sialinsäuren erwartet. Die Sialylierung eines Proteins beeinflusst die Gesamtladung, so dass auch unterschiedliche Bindungseigenschaften angenommen werden mußten. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ein Vergleich der Bindung von L-Selektin-IgG aus der humanen Zelllinie K-562 mit L-Selektin-IgG aus der Hamsterzelllinie CHO und L-Selektin-IgG aus der murinen Zelllinie NS0.

Der Nachweis der Sialylierung wurde durch den Einsatz des Enzyms Neuraminidase vorgenommen. Neuraminidase spaltet endständige Sialinsäuren von *N*- oder *O*-Glykanen ab, was nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Silberfärbung durch einen *Shift* im apparenten Molekulargewicht des Proteins sichtbar gemacht werden kann. Eine mögliche Korrelation zwischen dem Gehalt an Sialinsäuren und den Bindungseigenschaften wurde im SPR-Assay überprüft.

Wie Abbildung 9A zeigt, führte Neuraminidaseverdau bei L-Selektin-IgG aus der Zelllinie K-562 und L-Selektin-IgG aus CHO-Zellen zu einer Verringerung des apparenten Molekulargewichts. Dagegen war für L-Selektin-IgG aus der murinen Zelllinie NS0 keine Veränderung des apparenten Molekulargewichts feststellbar.

In Korrelation zum *Shift* des apparenten Molekulargewichts ergab die Überprüfung der Bindungseigenschaften des L-Selektin-IgG Fusionsproteins aus K-562-Zellen nach Neuraminidaseverdau eine über 25%ige Steigerung der Bindungsaktivität. Eine leichte Steigerung der Bindungsaktivität konnte auch für L-Selektin-IgG aus CHO-Zellen gemessen werden. Die Bindungsaktivität von L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen nahm hingegen nach Neuraminidaseverdau deutlich ab.

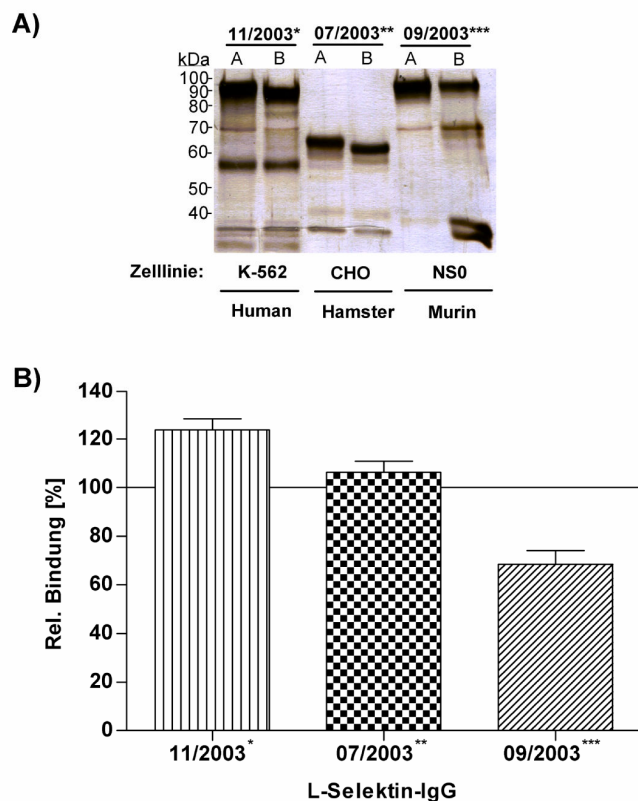


Abb. 9: Neuraminidaseverdau von L-Selektin-IgG aus verschiedenen zellulären Expressionssystemen.

A) SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung verschiedener L-Selektin-IgG-Proben vor und nach Verdau mit α 2-3,6,8 Neuraminidase. Aliquots verschiedener L-Selektin-IgG-Chargen (je 400-600 ng) wurden mit α 2-3,6,8 Neuraminidase (*Vibrio cholerae*, Agarose-Konjugat) 12 h bei 37°C inkubiert. Mittels Zentrifugation erfolgte die Trennung des L-Selektin-IgG vom Agarose-Konjugat und anschließend mittels eines ELISAs die Bestimmung der L-Selektin-Konzentration. Zur visuellen Überprüfung wurden die Proben mittels SDS-PAGE (jeweils 7,5%iges Polyacrylamidgel) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (40 ng pro Gelauftrag) und über Silberfärbung detektiert. Eingesetzte Chargen: Charge 11/2003: L-E-SCR1-SCR2-Fc γ der AG Tauber v. 13.11.2003 (* Affinitätschromatographie über Protein A-Sepharose, Elution mit 4 M MgCl $_2$, Molekulargewicht als Dimer: 190 kDa); Charge 07/2003: L-E-Fc γ der AG Tauber v. 24.07.2003 (**Affinitätschromatographie über SiaLe x -PAA-sTyr-Säule, Elution mit 50 mM EDTA, Molekulargewicht als Dimer: 130 kDa); Charge 09/2003: L-E-SCR1-SCR2-Fc γ (***) R&D Systems, Molekulargewicht als Dimer: 190 kDa); L = Lektindomäne, E = EGF-Domäne, SCR = *Short Consensus Repeat*. B) Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe x -PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen (30 ng/Ansatz). Die Messung der Bindungsaktivität der L-Selektin-IgG-Chargen vor und nach Inkubation mit α 2-3,6,8 Neuraminidase erfolgte mittels SPR (Fließgeschwindigkeit 20 μ l/min). Das Bindungssignal der verschiedenen Chargen vor Neuraminidaseverdau wurde entspricht 100% Bindung. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Messpunkt ist einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens sechs Messwerten.

3.2.4 Der Einfluss von Sialinsäuren auf die Bindung von L-Selektin

Um den Einfluss von Sialinsäuren auf die Bindungsaktivität von L-Selektin am Beispiel hypersialylierter Glykane zu prüfen, wurde L-Selektin-IgG in Gegenwart eines Überschusses des Sialinsäurevorläufers *N*-Acetyl-beta-D-Mannosaminhydrat (ManNAc) exprimiert. Durch diesen ManNAc-Überschuss wurde ein verstärkter Einbau von Sialinsäuren erwartet. Die Einbauraten der Sialinsäuren wurden nach DMB-Markierung (s. 2.4.1) mittels HPLC ermittelt und die Bindungsaktivität des L-Selektin-IgG Fusionsproteins im SPR-Assay überprüft.

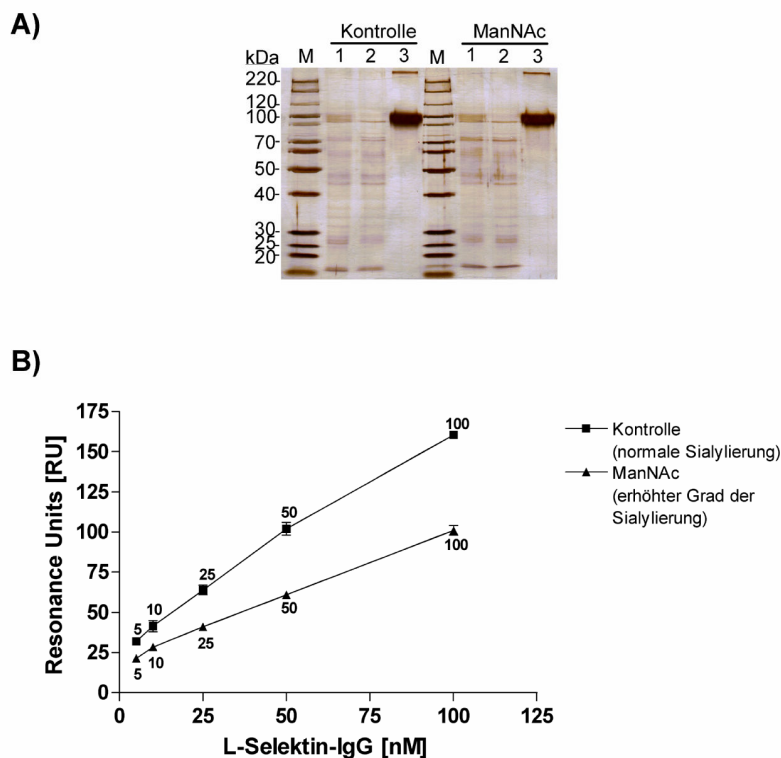


Abb. 10: Vergleich der Bindungsaktivität unterschiedlich stark sialylierter L-Selektin-IgG-Proben.

A) CHO-Zellen wurden transient mit L-Selektin-IgG transfiziert und für 72 h ohne (Kontrolle) bzw. in Gegenwart von 5 mM ManNAc kultiviert. L-Selektin-IgG wurde aus dem Zellkulturüberstand durch Bindung an Protein A-Sepharose isoliert und durch SDS-PAGE (10%iges Polyacrylamidgel) unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung analysiert. 1. Zellkulturüberstand (5 μ l), pro Spur); 2. Durchlauf der Protein A-Sepharose-Säule (5 μ l); 3. Eluat der Protein A-Sepharose-Säule (1 μ g Protein pro Spur). B) Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG ohne Kopplung an Protein A-beschichtete Goldnanopartikel gemessen. Die Bindung von L-Selektin-IgG an immobilisiertes SiaLe^x-PAA-sTyr wurde mittels SPR bei 30 μ l/min analysiert. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Messpunkt ist einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) bestehend aus 3 Messwerten.

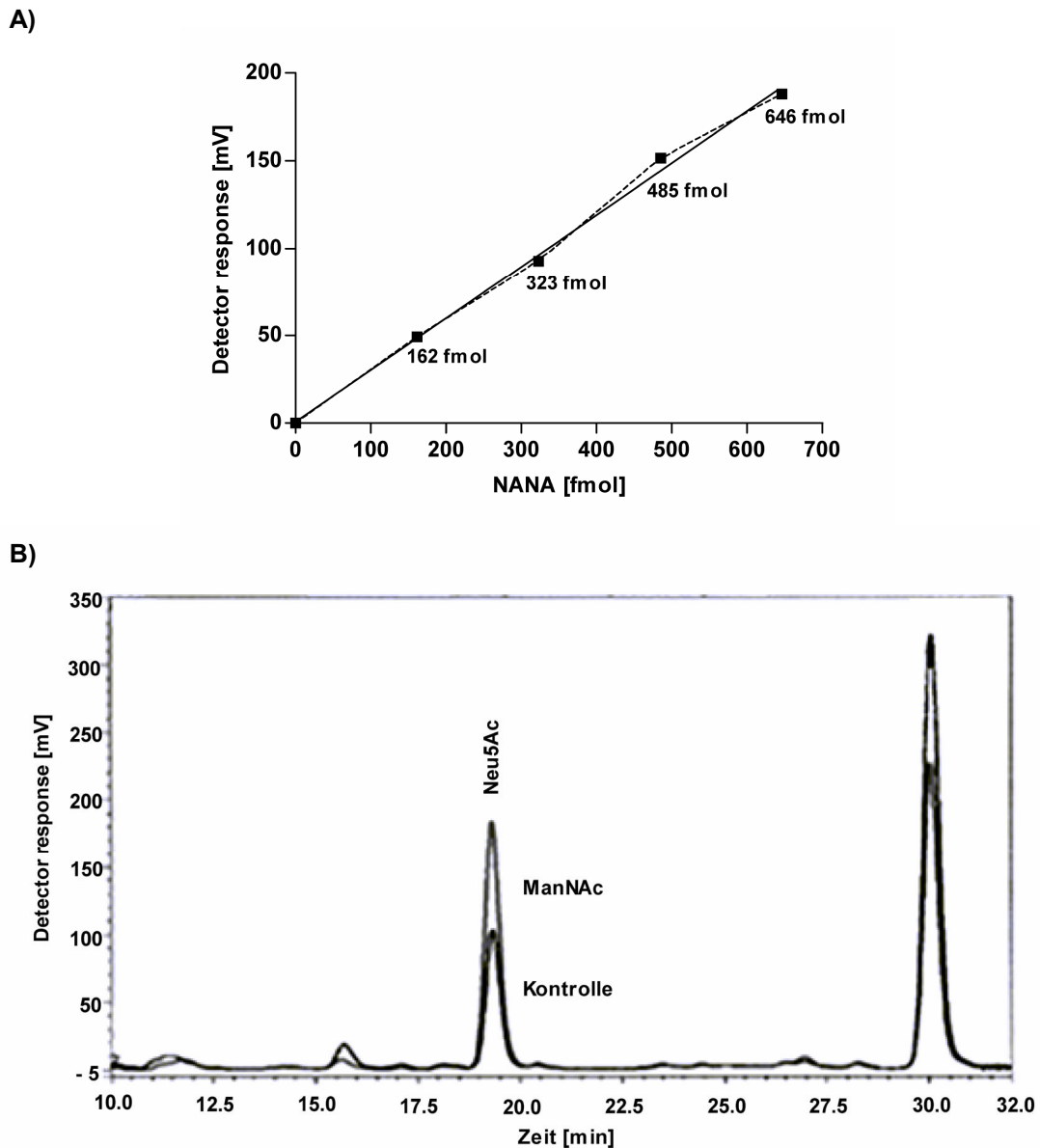


Abb. 11: Bestimmung des Sialinsäuregehalts von rekombinantem L-Selektin-IgG.

A) Eichkurve. Vier Proben von *N*-Acetylneuraminsäure (NANA) mit zunehmender Konzentration wurden mit 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB) derivatisiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die Menge der aufgetrennten NANA wurde über einen Fluoreszenzdetektor erfasst und in eine Eichkurve eingesetzt. (B) Bestimmung des NANA-Gehalts von L-Selektin-IgG. Sialinsäuren wurden durch Hydrolyse in 3 M Essigsäure aus 93 ng (Kontrolle) bzw. 96 ng (Expression in Gegenwart von ManNAc) gereinigtem L-Selektin-IgG freigesetzt. Danach wurden die Proben mit DMB derivatisiert und mittels HPLC aufgetrennt. Die Menge aufgetrennter NANA wurde der Eichkurve entnommen.

Abbildung 10A zeigt gereinigtes L-Selektin-IgG nach Expression in Gegenwart von ManNAc im Vergleich zur Expression unter normalen Bedingungen. Unterschiede im apparenten Molekulargewicht waren nach SDS-PAGE und Silberfärbung nicht zu erkennen. Die Analyse zur Einbaurrate von Sialinsäuren ergab, dass L-Selektin-IgG,

welches in Gegenwart von 5 mM ManNAc exprimiert wurde, einen Sialinsäureanteil von 6,4 nmol/ μ g Protein aufwies. Im Gegensatz dazu besaß L-Selektin-IgG, welches unter Standardbedingungen exprimiert wurde, einen Sialinsäureanteil von 3,6 nmol/ μ g Protein (Abb. 11). Eine Überprüfung der Bindungsaktivität ergab, dass L-Selektin-IgG aus Zellkulturüberstand mit ManNAc schlechter bindet als die L-Selektin-IgG-Kontrolle aus Zellkulturüberstand ohne ManNAc (Abb. 10B). Dies bestätigte die Annahme, dass die Bindungsaktivität eines Proteins auch von dessen Sialylierung abhängig ist.

3.2.5 Ermittlung der beim Assay einzusetzenden L-Selektin-IgG-Konzentrationen

Ein großer Vorteil der SPR-Technologie ist der vergleichsweise geringe Verbrauch an Protein. Um bei den Interaktionsanalysen eine L-Selektin-IgG-Konzentration einzusetzen, die ein ausreichendes Bindungssignal erzeugt bei gleichzeitig möglichst geringem Materialverbrauch, wurde die Höhe des Bindungssignals in Abhängigkeit von der eingesetzten L-Selektin-IgG-Menge analysiert.

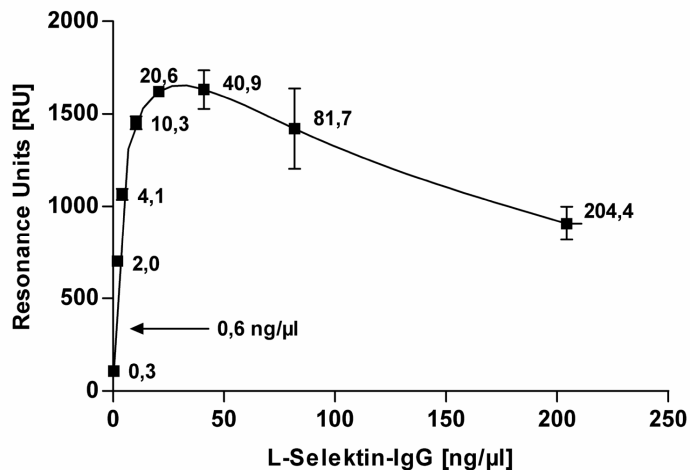


Abb. 12: Abhängigkeit des Bindungssignals von der eingesetzten L-Selektin-IgG-Konzentration.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung verschiedener Konzentration von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Das Probenvolumen betrug 35 μ l pro Ansatz.

Wie Abbildung 12 zeigt, ist die Höhe des Bindungssignals abhängig von der eingesetzten L-Selektin-Menge. Je mehr Protein eingesetzt wurde, ein desto höheres Bindungssignal konnte detektiert werden. Diese Abhängigkeit war bis zu einer L-Selektin-IgG-Konzentration von 28,6 ng/μl messbar. Mit weiter steigenden L-Selektin-IgG-Konzentrationen sank die Höhe des Bindungssignals wieder. Ursache war vermutlich die kompetitive Wirkung von vermehrt nicht-gekoppeltem L-Selektin-IgG. In den Folgeexperimenten wurde eine L-Selektin-IgG-Konzentration von 0,6 ng/μl eingesetzt.

3.2.6 Ermittlung eines geeigneten Probenvolumens

Neben der Konzentration von eingesetztem L-Selektin-IgG galt es im Rahmen der Assay-Standardisierung auch das Probenvolumen zu ermitteln, welches ein ausreichendes Bindungssignal ermöglicht und gleichzeitig den Proteinverbrauch gering hält (Abb. 13).

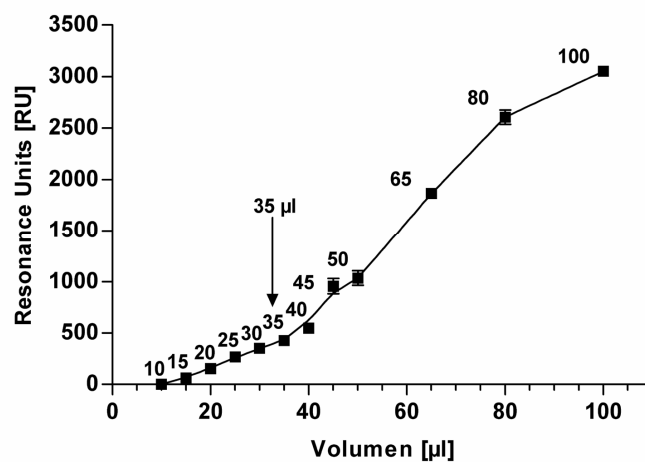


Abb. 13: Analyse der einzusetzenden Probevolumina.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/μl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel bei zunehmenden Probevolumina gemessen.

In Abbildung 13 ist gezeigt, dass das Bindungssignal mit zunehmenden Probenvolumen anstieg. Je größer das eingesetzte Probenvolumen, desto höhere Bindungssignale konnten gemessen werden. Bei Volumina über 65 μl ging die Kurve in eine Sättigungskurve über, was vermutlich eine Sättigung der Bindungsstellen auf dem Chip widerspiegelt. Für Folgeexperimente wurde ein Probenvolumen von 35 μl pro Ansatz festgelegt.

3.2.7 Ermittlung des optimalen pH-Wertes des Bindungspuffers

Rezeptor-Ligand-Interaktionen sind in der Regel abhängig vom pH-Wert des sie umgebenden Milieus. Im Rahmen der Standardisierung wurde deshalb auch die pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung von L-Selektin-IgG an den artifiziellen Liganden SiaLe^x-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) überprüft. Die Überprüfung erfolgte in einem pH-Bereich von pH 3,0 bis pH 10,0.

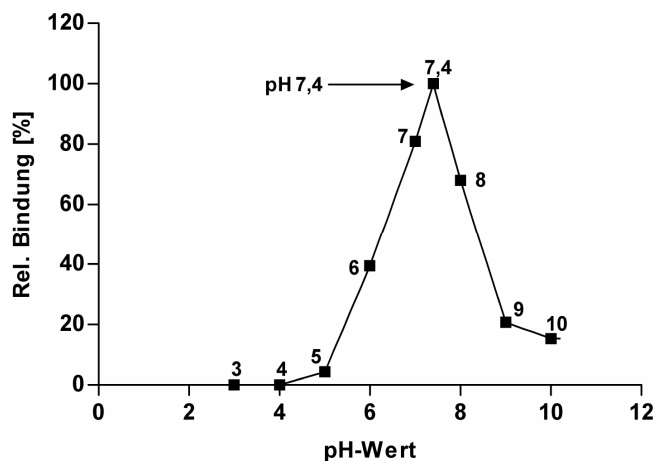


Abb. 14: Bestimmung des optimalen pH-Wertes des Bindungspuffers.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/μl) gekoppelt auf Protein A-Goldnanopartikel bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen.

Wie Abbildung 14 zeigt, erfolgte bei pH-Werten von 3,0, 4,0 und 5,0 keine Bindung von L-Selektin-IgG. Bei einem pH-Wert von 7,4 wurde das maximale Bindungssignal detektiert, während bei höheren pH-Werten das Bindungssignal wieder abnahm. In den folgenden Experimenten wurde daher ein Bindungspuffer mit einem pH-Wert von 7,4 eingesetzt.

3.2.8 Ermittlung der optimalen Ca²⁺-Konzentration

Die Bindung von L-Selektin an seine Liganden erfolgt Ca²⁺-abhängig. Die Interaktion mit Liganden erfolgt vermutlich, ähnlich wie bei E- und P-Selektin, über die Komplexbildung eines Calciumions. So ergab die Kokristallisation von E- und P-Selektin mit dem Kohlenhydratliganden SiaLe^x, dass dessen Bindung bei beiden Selektinen über Interaktionen mit einem Calciumion in der Lektindomäne und weiteren Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäureresten mit negativem bis elektroneutralem Oberflächenpotential erfolgt [Somers *et al.*, 2000]. Die Gegenwart von

Calcium musste entsprechend auch im SPR-Bindungsassay gewährleistet sein. Um die für eine optimale Bindung des L-Selektin-IgG Fusionsproteins im Puffer notwendige Calciumkonzentration zu ermitteln, wurde die Bindung von L-Selektin-IgG in Gegenwart verschiedener Calciumkonzentrationen gemessen.

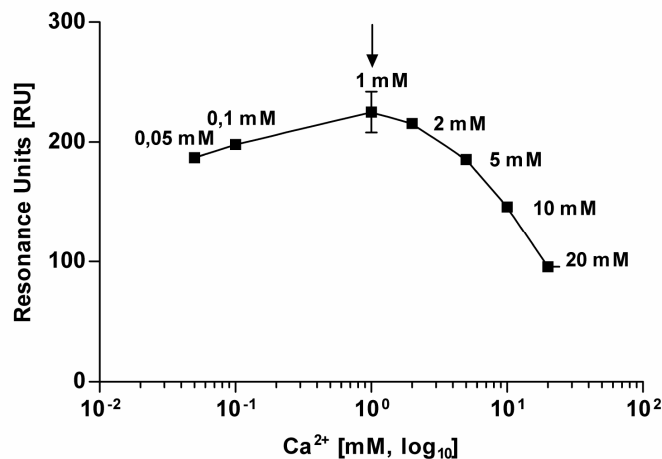


Abb. 15: Calciumabhängigkeit der Bindung von L-Selektin-IgG.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der künstliche Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/μl) nach Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel bei zunehmenden Calciumkonzentrationen im Bindungspuffer gemessen.

Wie Abbildung 15 zeigt, ist die Bindung von L-Selektin-IgG an SiaLe^x-PAA-sTyr abhängig von der Calciumkonzentration im Puffer. So konnte ein maximales Bindungssignal in Gegenwart von 1-2 mM Ca²⁺ detektiert werden. Sowohl unterhalb als auch oberhalb von 1-2 mM Ca²⁺ wurden schwächere Bindungssignale gemessen. In den Folgeexperimenten wurde eine Calciumkonzentration von 1 mM verwendet.

3.2.9 Zusammenfassung

Mit den Ergebnissen der Parameterbestimmungen konnte ein standardisiertes Vorgehen für den SPR-Bindungsassay festgesetzt werden. Das Standardprotokoll beinhaltet zusammenfassend:

- Erhöhung der Bindungswerten von L-Selektin-IgG durch Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel,
- Verwendung der L-Selektin-IgG-Charge 07/2001,
- L-Selektin-IgG-Konzentration pro Ansatz 0,6 ng/μl,
- 35 μl Probenvolumen pro Messung,

- Verwendung eines Puffers bei pH 7,4,
- Verwendung eines Puffers mit 1 mM Ca^{2+} ,
- Temperatureinstellung bei 25°C,
- Fließgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Dieses SPR-Standardprotokoll wurde durchgehend für alle nachfolgenden Untersuchungen angewendet.

3.3 Untersuchungen zur Hemmung der Bindung von L-Selektin-IgG – Messungen mittels SPR

3.3.1 Vorversuche

3.3.1.1 Untersuchung zum Einfluss von Lösungsmittel

Da potentiell inhibitorische Glykomimetika oftmals in nicht-wässrigen Lösungsmitteln vorliegen und das Lösungsmittel Einfluss auf eine Bindung haben kann, wurde zunächst exemplarisch der Einfluss von DMSO und Isopropanol untersucht.

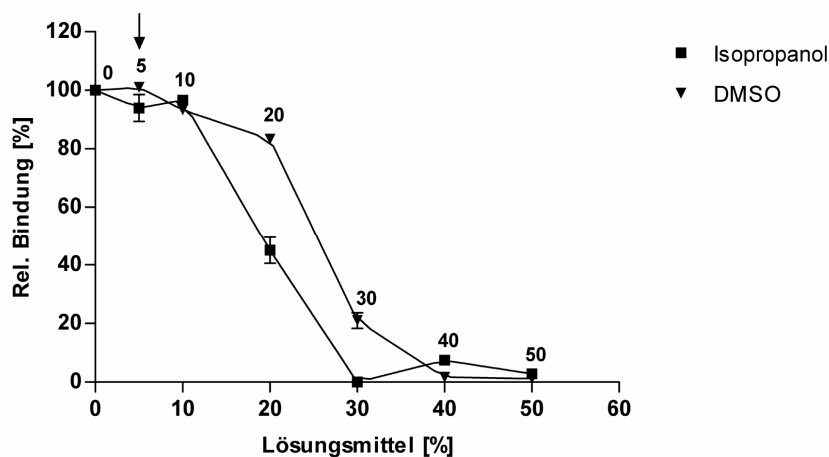


Abb. 16: Einfluss von Isopropanol und DMSO auf die Bindung von L-Selektin.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/ μl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel bei zunehmenden Isopropanol- und DMSO-Konzentrationen gemessen.

Diese Messungen zeigten, dass ab einer Konzentration von 10% (v/v) DMSO bzw. Isopropanol in Wasser die Bindung von L-Selektin-IgG an SiaLe^x-PAA-sTyr deutlich abnahm. Ein Anteil von 5% (v/v) der Lösungsmittel hatte hingegen nur vernachlässigbaren Einfluss auf die Bindung (Abb. 16). Ab 30% (v/v) Lösungsmittel

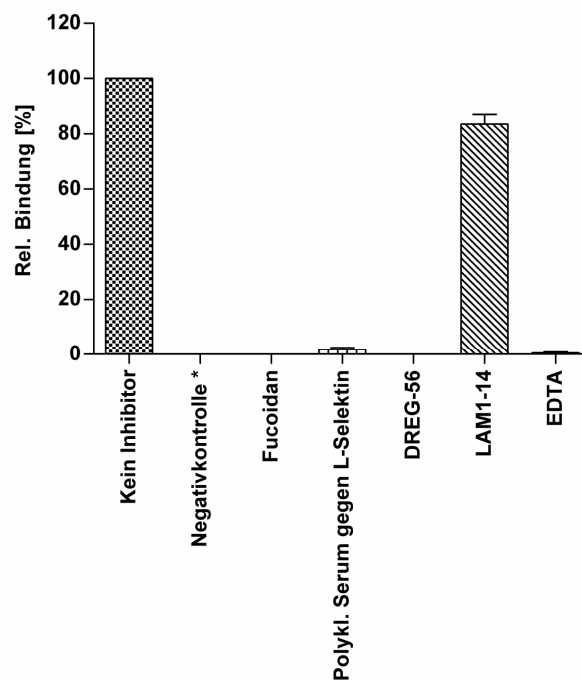
war nur noch schwache bis keine Bindung detektierbar. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde der Anteil von Isopropanol oder DMSO auf eine Konzentration von maximal 5% (v/v) begrenzt.

3.3.1.2 Eigenschaften des standardisierten SPR-Bindungsassays für die Charakterisierung von Inhibitoren der L-Selektin-Bindung

Am Beispiel bekannter Inhibitoren der L-Selektin-Bindung wurde die Eignung des standardisierten Bindungsassays untersucht, die Hemmwirkung auf die Bindungsfunktion von L-Selektin zu detektieren. Die Hemmung dieser Bindung wurde am Beispiel verschiedener Inhibitoren untersucht. Hierbei wurde das auf Goldnanopartikel immobilisierte L-Selektin mit diesen Inhibitoren vorinkubiert, bevor die Bindung mittels SPR gemessen wurde (Abb. 17). Als bekannte Inhibitoren wurden eingesetzt:

- Fucoidan, ein aus Algen isoliertes Polysaccharid aus sulfatierten Fucoseresten [Berteau und Mulloy, 2003]. Fucoidan bindet L- und P-Selektin, die beide an sulfatierte Oligosaccharide binden. Fucoidan konnte bereits in einigen vorklinischen Untersuchungen erfolgreich als antiinflammatorischer Wirkstoff eingesetzt werden [z. B. Omata *et al.*, 1997; Ritter *et al.*, 1998].
- Polyklonales Antiserum gegen L-Selektin (R&D Systems, Kat.-Nr. AF728), das von der anbietenden Firma als inhibitorisch wirkend beschrieben wurde.
- DREG-56, ein monoklonaler, L-Selektin-spezifischer Antikörper, dessen Bindungsepitop sich in der Lektindomäne befindet und der die Bindungsfunktion von L-Selektin hemmt [Kishimoto *et al.*, 1990].
- Als Negativkontrolle wurde der monoklonale Antikörper LAM1-14 eingesetzt, ein L-Selektin-spezifischer Antikörper, dessen Bindungsepitop sich im EGF-SCR-Domänenbereich befindet und der daher keine inhibitorische Funktion besitzt [Spertini *et al.*, 1991b].

Neben diesen kompetitiven Inhibitoren wurde die Funktion von L-Selektin mit EDTA blockiert.



* Bindung von humanem IgG, Fc-Anteil

Abb. 17: Überprüfung der Bindung von L-Selektin in Gegenwart verschiedener Substanzen.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/μl) bzw. humanem Fcγ nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Der Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf die Bindung von L-Selektin-IgG an SiaLe^x-PAA-sTyr wurde mittels SPR überprüft. Zur Messung der Inhibitorwirkung wurde L-Selektin-IgG gekoppelt auf Goldnanopartikel vorinkubiert mit Fucoidan (10 μg/ml), polyklonales Antiserum (Poly Schaf αh L-Selektin, 10 μg/ml), DREG-56 (10 μg/ml), LAM1-14 (10 μg/ml) oder EDTA (50 mM).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 gezeigt. Die Bindung von L-Selektin-IgG wurde sowohl durch das polyklonale Antiserum gegen L-Selektin als auch durch den monoklonalen Antikörper DREG-56 nahezu vollständig inhibiert. Ähnliches konnte bei der Verwendung des bekannten Selektininhibitors Fucoidan und von EDTA beobachtet werden. Die L-Selektin-IgG Bindung wurde nach Vorinkubation mit dem nichtinhibitorischen Antikörper LAM1-14 [Spertini *et al.*, 1991b] dagegen nur unwesentlich vermindert. Das Fc-Fragment von humanem IgG (Fcγ), das als Negativkontrolle eingesetzt wurde, wurde erwartungsgemäß nicht durch SiaLe^x-PAA-sTyr gebunden.

3.3.2 Untersuchungen zur Hemmwirkung von PAA-basierten Ligandenkonjugaten

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass L-Selektin die beiden Tetrasaccharide Sialyl Lewis x (SiaLe^x) und Sialyl Lewis a (SiaLe^a) bindet [z. B. Paavonen *et al.*, 1992; Turunen *et al.*, 1995]. Nachdem sich der standardisierte SPR-Bindungsassay in den Voruntersuchungen für Bindungsanalysen als prinzipiell geeignet erwiesen hatte, folgten zunächst Inhibitionsuntersuchungen mit einer Gruppe von synthetischen SiaLe^x bzw. SiaLe^a Derivaten. Poly [N-(Hydroxyethyl)acrylamid] (PAA) fungiert bei diesen Derivaten als lineares Trägermolekül, an welches die Tetrasaccharide SiaLe^x bzw. SiaLe^a kovalent gekoppelt wurden. Außer diesen wurden Konjugatformen getestet, die am PAA-Grundgerüst zusätzlich Tyrosinsulfate tragen [Game *et al.*, 1998; Pochechueva *et al.*, 2002; Pochechueva *et al.*, 2003; Ushakova *et al.*, 2005]. Die PAA-Konjugate sind ein Modell der physiologischen Liganden, bei denen auf einem Polypeptidgerüst Oligosaccharide, die von der Lektindomäne von L-Selektin gebunden werden, in *geclusteter* Form vorliegen [Lasky *et al.*, 1992; Norgard *et al.*, 1993; Baumhater *et al.*, 1993; Berg *et al.*, 1993].

Die Ligandenanordnung auf dem PAA-Konjugat SiaLe^x-PAA-sTyr entspricht beispielsweise dem Bindungsepitop des physiologischen Liganden PSGL-1, welches aus dem Oligosaccharidepitop SiaLe^x gebunden an Thr-57 und den drei sulfatierten Tyrosinresten Tyr-46, Tyr-48 und Tyr-51 besteht [Liu *et al.*, 1998]. Während eine inhibitorische Wirkung der PAA-Konjugate auf die Bindungsfunktion von L-Selektin unter statischen Bedingungen für E- und P-Selektin gezeigt worden war [Weitz-Schmidt *et al.*, 1996; Game *et al.*, 1998; Pochechueva *et al.*, 2002; Pochechueva *et al.*, 2003; Ushakova *et al.*, 2005], war die Wirkung der PAA-Konjugate unter dynamischen Messbedingungen bis zum Beginn dieser Arbeit für keines der drei Selektine untersucht worden. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die mögliche inhibitorische Wirkung von PAA-Konjugaten auf die Bindungsfunktion von L-Selektin unter dynamischen Messbedingungen zu untersuchen.

3.3.2.1 SiaLe^x und SiaLe^a: Vergleich von Monomer zu multivalenten Formen

Die Interaktion zwischen Selektinen und den Tetrasacchariden SiaLe^x oder SiaLe^a erfolgt mit vergleichsweise geringer Affinität im millimolaren Bereich [Pope *et al.*, 1997]. Durch eine *geclusterte* Anordnung der physiologischen Liganden wird die Bindungsavidität der Interaktionspartner deutlich erhöht [Picker *et al.*, 1991b;

Erlandsen *et al.*, 1993; Hasslen *et al.*, 1995; Lasky *et al.*, 1992; Norgard *et al.*, 1993; Baumhater *et al.*, 1993; Berg *et al.*, 1993]. Auf Grundlage bekannter Selektinliganden sollte für die Entwicklung von Selektininhibitoren daher der Einfluss der Multivalenz auf die inhibitorische Aktivität untersucht werden. Das Ziel dieser ersten Analysereihe war, das inhibitorische Potential von PAA-Konstrukten, auf denen alleinig die Tetrasaccharide SiaLe^x oder SiaLe^a gekoppelt wurden (Monoligandpolymere), mit monovalentem SiaLe^x und SiaLe^a zu vergleichen.

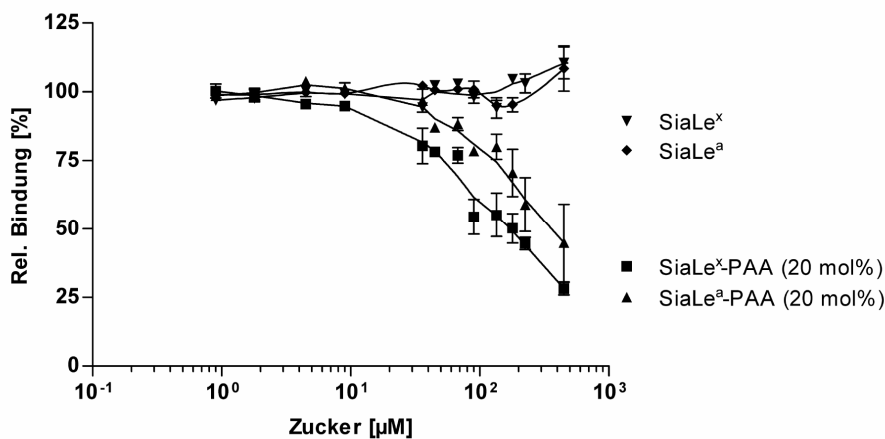


Abb. 18: Hemmung der L-Selektin-Bindung durch SiaLe^x, SiaLe^a und deren PAA-Konjugate.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/µl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Vor jeder Messung wurde L-Selektin-IgG mit folgenden Konzentrationen von monovalentem SiaLe^x, SiaLe^a oder deren PAA-basierten Derivaten inkubiert: 0,9 µM; 1,8 µM; 4,5 µM; 9,0 µM; 36 µM; 45 µM; 67,5 µM; 90 µM; 135 µM; 180 µM; 225 µM und 450 µM (basierend auf dem Molekulargewicht der Tetrasaccharide SiaLe^x und SiaLe^a von MW 820 g mol⁻¹). Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt ist ein Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens drei Messwerten.

In Abbildung 18 ist gezeigt, dass sowohl SiaLe^x-PAA (20 mol%) als auch SiaLe^a-PAA (20 mol%) die L-Selektin-IgG Bindung deutlich stärker inhibierten als ihre monovalenten Formen. Im gewählten Messbereich war für die monovalenten Formen der Tetrasaccharide kein IC₅₀-Wert zu ermitteln (> 450 µM). Dagegen konnte für SiaLe^x-PAA (20 mol%) ein IC₅₀-Wert von 190 µM ermittelt werden, für SiaLe^a-PAA (20 mol%) ein IC₅₀-Wert von etwa 260 µM, jeweils bezogen auf die monovalente Form der Tetrasaccharide SiaLe^x und SiaLe^a (MW 820 g mol⁻¹).

Bezogen auf die PAA-Konjugate als Gesamtmolekül (MW 30000-40000 g mol⁻¹) bewegten sich die IC₅₀-Werte im niedrigen mikromolaren Bereich. SiaLe^x-PAA (20 mol%) erreichte einen IC₅₀-Wert von 21 µM und SiaLe^a-PAA (20 mol%) einen IC₅₀-Wert von 29 µM.

3.3.2.2 Vergleich Monoligand- zu Biligandpolymer

Biligandpolymere sind PAA-Konjugate, die auf dem PAA-Trägermolekül in linearer Anordnung eine Kombination aus SiaLe^x oder SiaLe^a und Tyrosinsulfaten tragen, was einer Nachahmung des N-terminalen Bindungsmotivs von PSGL-1 entspricht. Das PSGL-1-Bindungsmotiv besteht aus dem Oligosaccharidepitop SiaLe^x und drei sulfatierten, sich in unmittelbarer Nachbarschaft befindenden Tyrosinresten (Tyr-46, Tyr-48 und Tyr-51).

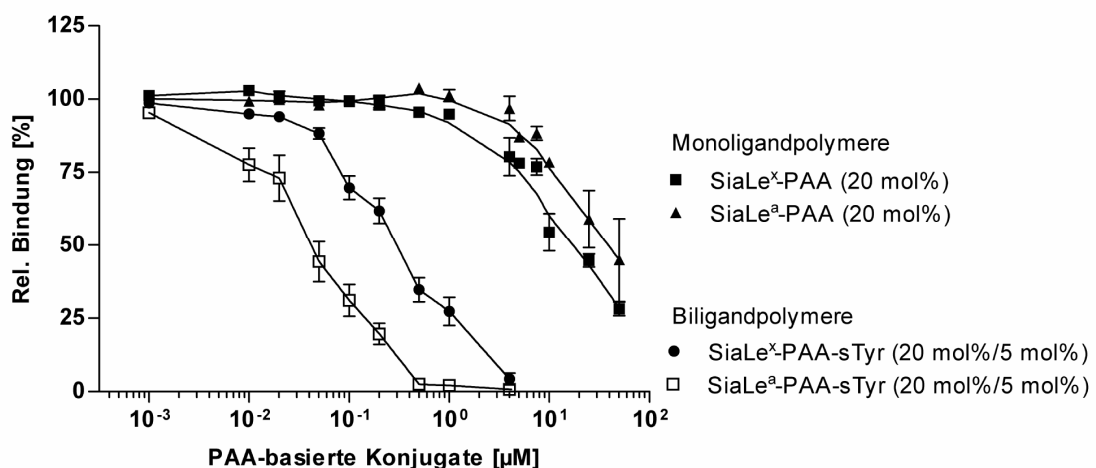


Abb. 19: Hemmung der L-Selektin-Bindung durch PAA-Konjugate – Monoligand- vs. Biligandpolymere.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der künstliche Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/µl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Vor jeder Messung wurde L-Selektin-IgG mit folgenden Konzentrationen der PAA-Konjugate SiaLe^x-PAA (20 mol%), SiaLe^a-PAA (20 mol%), SiaLe^x-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) und SiaLe^a-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) inkubiert: 0,001 µM; 0,01 µM, 0,02 µM; 0,05 µM; 0,1 µM; 0,2 µM; 0,5 µM; 1,0 µM und 4,0 µM. Zusätzlich wurde die Inhibitorwirkung der Monoligandpolymere SiaLe^x-PAA (20 mol%) und SiaLe^a-PAA (20 mol%) in folgenden Konzentrationen gemessen: 5 µM; 7,5 µM; 10 µM; 15 µM; 20 µM; 25 µM und 50 µM. Die Konzentrationen basieren auf einem durchschnittlichen Molekulargewicht der Konjugate von MW 35000 g mol⁻¹. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt ist ein Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens drei Messwerten.

Wie in Abbildung 19 gezeigt, besitzen Biligandpolymere eine stärkere inhibitorische Wirkung als Monoligandpolymere. Mit SiaLe^x-PAA (20 mol%) und SiaLe^a-PAA (20 mol%) wurden, bezogen auf das PAA-Gesamtmolekül, IC₅₀-Werte ermittelt, die sich im niedrigen mikromolaren Bereich bewegen (s. 3.3.2.1). SiaLe^x-PAA (20 mol%) erreichte einen IC₅₀-Wert von 21 µM bzw. SiaLe^a-PAA (20 mol%) einen IC₅₀-Wert von 29 µM. Für die Biligandpolymere konnten hingegen IC₅₀-Werte ermittelt werden, die sich im nanomolaren Bereich bewegen. Mit SiaLe^x-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) wurde ein IC₅₀-Wert von 320 nM ermittelt, während SiaLe^a-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) einen IC₅₀-Wert von 45 nM erzielte.

3.3.2.3 Multivalente Tyrosinsulfate auf PAA

Die hochaffine Bindung der Lektindomäne von P- und L-Selektin an PSGL-1 erfolgt über Wechselwirkungen zwei voneinander unabhängiger Bereiche. Zum einen interagieren SiaLe^x-Strukturen auf PSGL-1 mit P- bzw. L-Selektin, während ein zweiter Interaktionsbereich Wechselwirkungen zwischen einem „Cluster“ von Tyrosinsulfaten auf PSGL-1 und einer anionischen Bindungsstelle auf P- bzw. L-Selektin umfasst [Leppänen *et al.*, 2000; Leppänen *et al.*, 2003]. Synthetische PAA-Polymere mit einem dichten Besatz an Tyrosinsulfaten sind als starke Inhibitoren der P-Selektin-vermittelten Adhäsion *in vitro* bekannt und können die neutrophile Extravasation auch *in vivo* inhibieren [Pochechueva *et al.*, 2003]. In ähnlicher Weise scheint der physiologische L-Selektin-Ligand Nucleolin über ein „Cluster“ von negativen Ladungen an L-Selektin zu binden [Harms *et al.*, 2001]. Weiterhin binden zahlreiche Liganden über sulfatierte Zucker an P- und L-Selektin, so Fucoidan, Polyphosphomannanester (PPME), sulfatierte Galactosylceramide (Sulfatide), Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Heparin [Varki *et al.*, 1994]. Es ist daher wahrscheinlich, dass negative Ladungen starken Einfluss auf die inhibitorische Wirkung haben. In der nachfolgenden Analyse wurde daher die inhibitorische Wirkung von Tyrosinsulfaten sowohl in monovalenter als auch in multivalenter Form (5 mol% und 20 mol%) untersucht.

Es wurden zwei unterschiedlich stark mit Tyrosinsulfaten (sTyr) besetzte PAA-Konjugate untersucht. Während sTyr-PAA (5 mol%) die L-Selektin-Bindung in ähnlicher Weise wie SiaLe^x-/SiaLe^a-Monoligandpolymere hemmte (IC₅₀ > 4µM), wurde für sTyr-PAA (20 mol%) ein IC₅₀-Wert von 170 nM ermittelt, der somit dem der Biligandpolymere entsprach (Abb. 20). Monovalente Tyrosinsulfate zeigten keine inhibitorische Wirkung (nicht gezeigt).

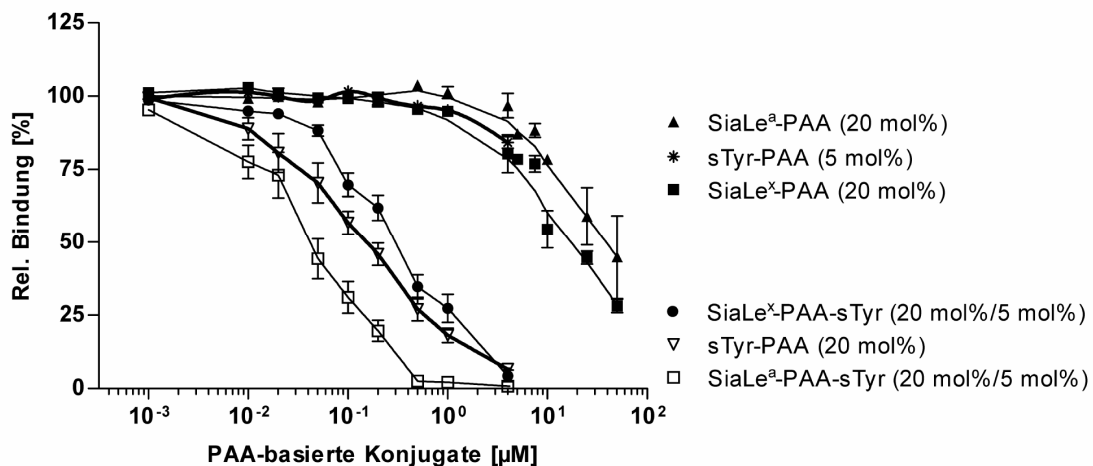


Abb. 20: Hemmung der L-Selektin-Bindung durch PAA-Konjugate – Wirkung multivalenter Tyrosinsulfate.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/μl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Vor jeder Messung wurde L-Selektin-IgG mit folgenden Konzentrationen der PAA-Konjugate SiaLe^x-PAA (20 mol%), SiaLe^a-PAA (20 mol%), SiaLe^x-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%), SiaLe^a-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%), sTyr-PAA (5 mol%) und sTyr-PAA (20 mol%) inkubiert: 0,001 μM; 0,01 μM, 0,02 μM; 0,05 μM; 0,1 μM; 0,2 μM; 0,5 μM; 1,0 μM und 4,0 μM. Zusätzlich wurden die Inhibitorwirkung der Monoligandpolymere SiaLe^x-PAA (20 mol%) und SiaLe^a-PAA (20 mol%) in folgenden Konzentrationen gemessen: 5 μM; 7,5 μM; 10 μM; 15 μM; 20 μM; 25 μM und 50 μM. Die Konzentrationen basieren auf einem durchschnittlichen Molekulargewicht der Konjugate von MW 35000 g mol⁻¹. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt ist ein Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens drei Messwerten.

3.3.2.4 Synergistische Effekte der inhibitorischen Wirkung

Wie in 3.3.2.3 beschrieben sind an der Ligandenbindung von L-Selektin zwei Bindungsstellen auf dem extrazellulären Abschnitt des Rezeptors beteiligt. Von diesen bindet die eine an den Oligosaccharidteil der Liganden, die zweite an negativ geladene Epitope der Liganden, z. B. Tyrosinsulfate von PSGL-1. Wie in 3.3.2.2 beschrieben erhöht die multivalente Kombination von SiaLe^x bzw. SiaLe^a mit Tyrosinsulfaten auf Polyacrylamid die inhibitorische Aktivität. In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob auch die gleichzeitige Wirkung der beiden Inhibitorformen, d. h. von SiaLe^x-PAA und sTyr-PAA bzw. SiaLe^a-PAA und sTyr-PAA zu einem synergistischen Effekt führen. Hierzu wurde L-Selektin nach Immobilisierung auf Goldnanopartikel mit SiaLe^x-PAA und sTyr-PAA bzw. SiaLe^a-PAA und sTyr-PAA gleichzeitig vorinkubiert. Hierdurch konnte gegenüber den Versuchen, bei denen jeder dieser Inhibitoren einzeln

eingesetzt wurde, keine Steigerung der Hemmwirkung erzielt werden (Abb. 21). Abbildung 21 zeigt die Hemmwirkung äquimolarer Konzentrationen der verschiedenen Inhibitoren.

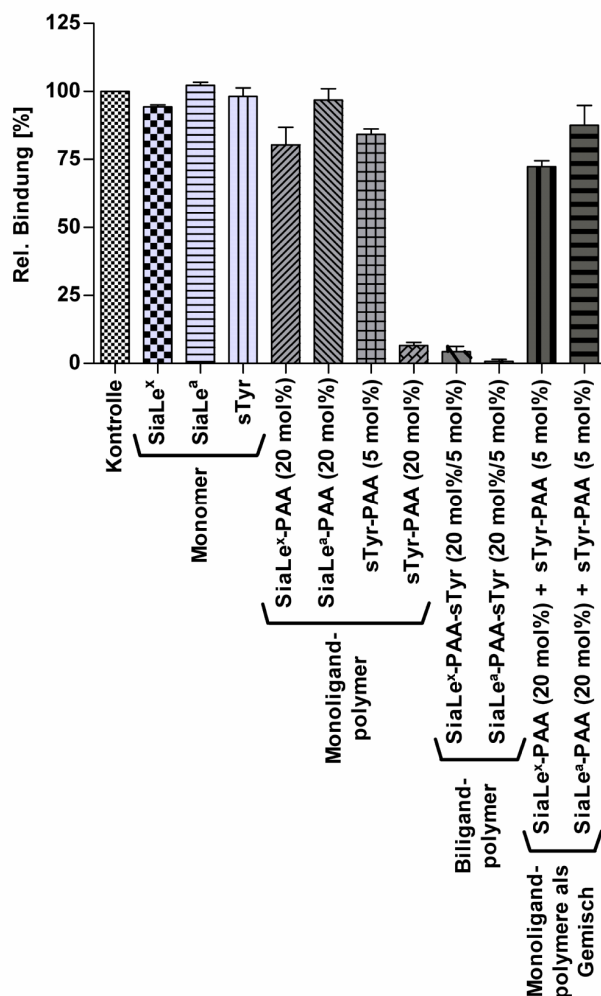


Abb. 21: Zusammenstellung der Ergebnisse zur Inhibition durch PAA-basierte Ligandenkonjugate.

Zum Vergleich der Hemmwirkung äquimolarer Konzentrationen der verschiedenen Inhibitoren wurde L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/ μ l) auf Protein A-Goldnanopartikel immobilisiert und mit jeweils einer der folgenden Inhibitoren in der angegebenen Konzentration vorinkubiert: 36 μ M der monovalenten Liganden SiaLe^x, SiaLe^a oder sTyr, 4 μ M der PAA-basierten Monoligandpolymere SiaLe^x-PAA (20 mol%), SiaLe^a-PAA (20 mol%), sTyr-PAA (5 mol%) oder sTyr-PAA (20 mol%) und 4 μ M der PAA-basierten Biligandpolymere SiaLe^x-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) oder SiaLe^a-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%). Zur Überprüfung möglicher synergistischer Effekte der Monoligandpolymere wurde L-Selektin-IgG gleichzeitig vorinkubiert mit 4 μ M SiaLe^x-PAA (20 mol%) + 4 μ M sTyr-PAA (5 mol%) bzw. 4 μ M SiaLe^a-PAA (20 mol%) + 4 μ M sTyr-PAA (5 mol%). Die Molaritäten der Konjugate beziehen sich auf ein mittleres Molekulargewicht von MW 35000 g mol⁻¹. Die Molaritäten der monovalenten Liganden sind analog zu deren Anteil am Molekulargewicht der PAA-Konjugaten gewählt. Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt ist ein Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens drei Messwerten.

3.3.2.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen klar, dass multivalente SiaLe^x-, SiaLe^a- und sTyr-Konjugate unter Flussbedingungen die Bindung von L-Selektin an Liganden hemmen. Hierbei steigert Multivalenz – erzielt durch kovalente Kopplung auf PAA – die inhibitorische Aktivität. Weiterhin zeigen SiaLe^x bzw. SiaLe^a zusammen mit sTyr synergistische Effekte ihrer Inhibitorwirkung, wenn sie L-Selektin auf demselben PAA-Molekül präsentiert werden. Dagegen wird kein synergistischer Effekt bei zwar gleichzeitiger Präsentation jedoch auf getrennten PAA-Molekülen erzielt. Auf PAA in hoher Dichte immobilisiertes sTyr zeigt vergleichbare Hemmwirkung wie Biligand-PAA-Konjugate von SiaLe^x/sTyr bzw. SiaLe^a/sTyr.

3.3.3 Hemmung von Selektinen durch Efomycin M

3.3.3.1 Hemmung von L-Selektin

Efomycin M ist ein 2002 erstmals beschriebenes Makrolid, welches die E- und P-Selektin-vermittelte Adhäsion von Leukocyten hemmt [Schön *et al.*, 2002]. Da die mögliche Inhibitorwirkung auf die Bindungsfunktion von L-Selektin nicht untersucht war, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. M. Schön (Universität Würzburg, Rudolf-Virchow-Zentrum) geprüft, ob Efomycin M auch die L-Selektin-Funktion beeinflusst.

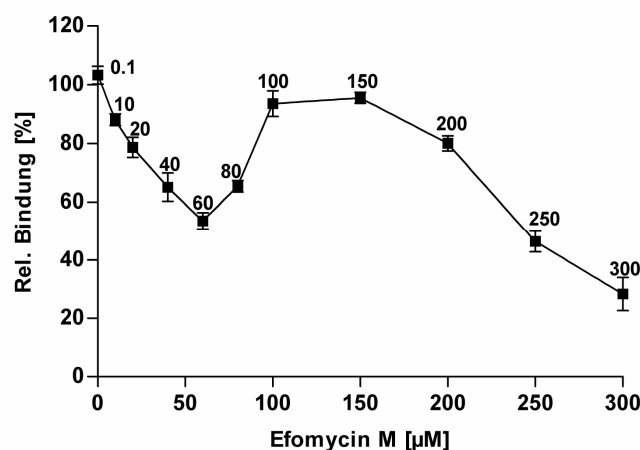


Abb. 22: Hemmung der L-Selektin-Bindung durch Efomycin M.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001, 0,6 ng/µl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Vor jeder Messung wurde L-Selektin-IgG mit einer der angegebenen Konzentrationen des Makrolids Efomycin M vorinkubiert: 0,1 µM; 10 µM; 20 µM; 40 µM; 60 µM; 80 µM; 100 µM; 150 µM; 200 µM; 250 µM und 300 µM (Efomycin M-Charge: Prof. M. Schön). Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt ist ein Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens vier Messwerten.

In Abbildung 22 ist ein deutlich „biphasischer“ Hemmeffekt auf die Bindungsfunktion von L-Selektin gezeigt. Bis zu einer Konzentration von 60 μM war eine dosisabhängige Hemmwirkung messbar, mit zunehmender Konzentration nahm die inhibitorische Wirkung von Efomycin M allerdings wieder ab. Bei 100-150 μM war nahezu kein inhibitorischer Effekt zu beobachten. Zwischen 150-300 μM Efomycin M nahm die inhibitorische Wirkung dann erneut dosisabhängig zu.

Zur Verifizierung des unerwarteten, „biphasischen“ Verlaufs der inhibitorischen Wirkungskurve wurden Messungen mit einer anderen Charge von Efomycin M durchgeführt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. A. von Bonin (Schering AG, Berlin). Zum Vergleich wurde gleichzeitig auch eine andere L-Selektin-IgG-Charge getestet, die kommerziell erhältlich war (R&D Systems) und in der murinen Zelllinie NS0 produziert wurde.

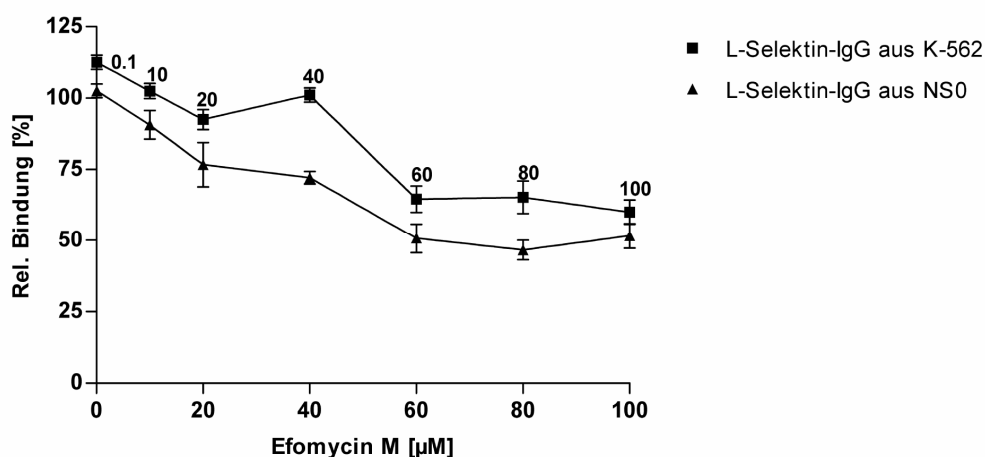


Abb. 23: Testung einer weiteren Efomycin M-Charge.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (0,6 ng/ μl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Verwendete L-Selektin-IgG Chargen: a) Charge 07/2001 aus K-562-Zellen; b) L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen (R&D Systems). Vor jeder Messung wurde L-Selektin-IgG mit den angegebenen Konzentrationen des Makrolids Efomycin M vorinkubiert: 0,1 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM ; 60 μM ; 80 μM und 100 μM (Efomycin M-Charge: Schering AG). Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens vier Messwerten.

Das Ergebnis ist in Abbildung 23 gezeigt. Im Gegensatz zum Efomycin M der ersten Charge (Prof. M. Schön, Würzburg) zeigte sich mit Efomycin M der zweiten Charge (Dr. A. von Bonin, Schering AG) bis zu einer Konzentration von 100 μM eine

dosisabhängige Zunahme. Zwischen 50 μM und 100 μM fand sich keine Abnahme der Hemmwirkung von Efomycin M. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht. Der „biphasische“ Verlauf könnte daher unter anderem auf Effekte der begrenzten Löslichkeit von Efomycin M zurückzuführen sein. Es war zudem zu beobachten, dass L-Selektin-IgG aus K-562-Zellen weniger stark inhibiert wurde als L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen.

3.3.3.2 Hemmung von P- und E-Selektin

Neben Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von Efomycin M auf die Bindungsfunktion von L-Selektin, erfolgte auch eine Überprüfung der Hemmwirkung auf die Bindungsfunktion von E- und P-Selektin. Im standardisierten SPR-Bindungsassay wurde die Bindung von E-, P- und L-Selektin-IgG (R&D Systems) in Gegenwart verschiedener Efomycin M-Konzentrationen (Schering AG) getestet.

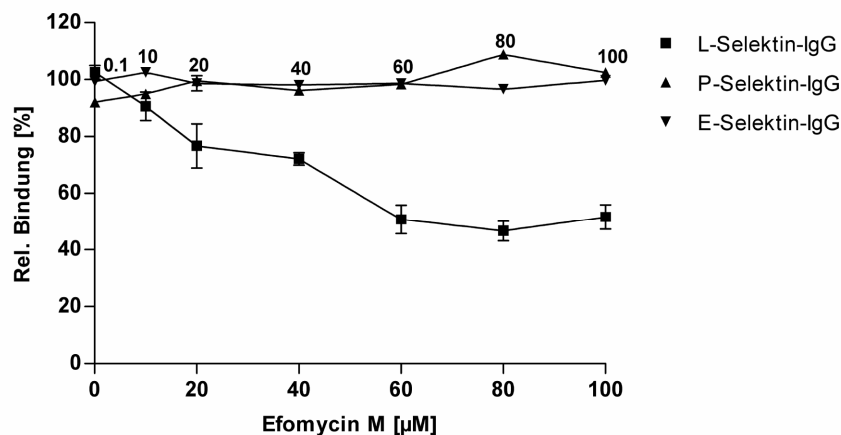


Abb. 24: Hemmung der Bindung von E-, P- und L-Selektin durch Efomycin M.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem E-, P- und L-Selektin-IgG (R&D Systems; 0,6 ng/ μl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Vor jeder Messung wurden E-, P- oder L-Selektin-IgG mit den angegebenen Konzentrationen des Makrolids Efomycin M vorinkubiert: 0,1 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM ; 60 μM ; 80 μM und 100 μM (Efomycin M-Charge: Schering AG). Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens zwei Messwerten.

Abbildung 24 zeigt, dass durch Efomycin M im gewählten Konzentrationsbereich eine dosisabhängige Hemmung der Bindungsfunktion von L-Selektin-IgG, nicht aber von E- und P-Selektin-IgG, nachweisbar war.

3.3.3.3 Lösungsmiteleinfluss auf die Aktivität von Efomycin M

Im Rahmen der Untersuchungen stellte sich heraus, dass Efomycin M von den Kooperationspartnern zum Teil in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst wurde, in DMSO oder Cremophor EL. Um zu prüfen, ob diese Lösungsmittel Einfluss auf die

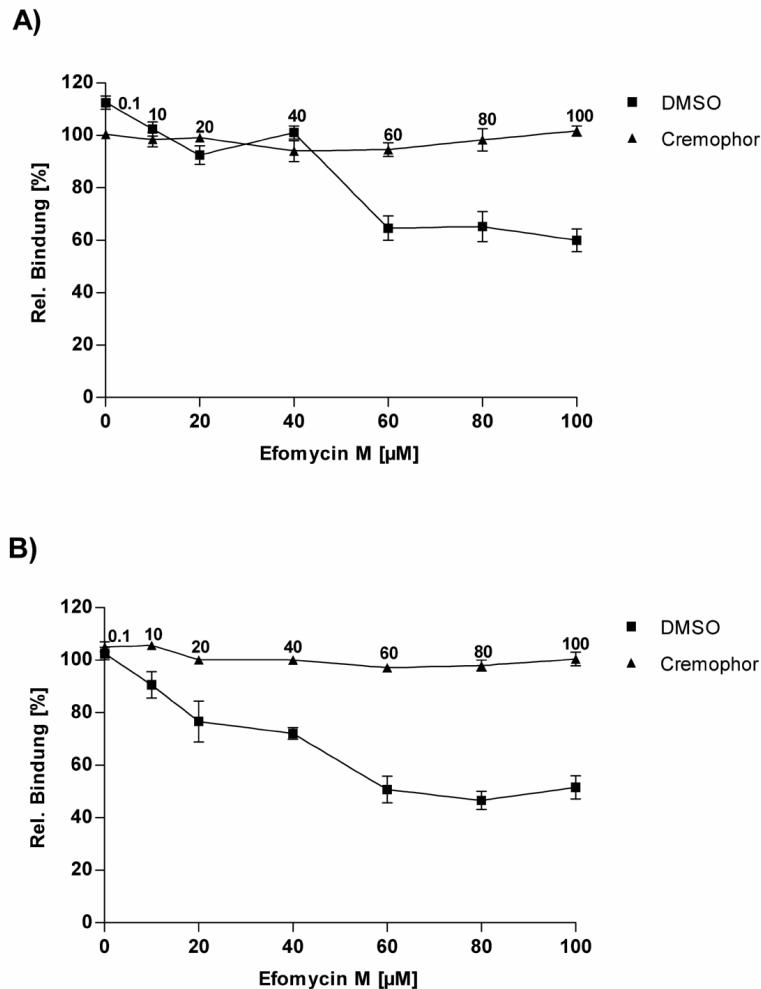


Abb. 25: Hemmwirkung von Efomycin M – Ein Lösungsmittelvergleich.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (0,6 ng/ μl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. L-Selektin-IgG-Chargen: A) Charge 07/2001 aus K-562-Zellen; B) L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen (R&D Systems). Efomycin M wurde vor dessen Einsatz im Bindungsassay zum einen in DMSO und zum anderen in Cremophor EL gelöst. Vor jeder Messung wurde L-Selektin-IgG mit den angegebenen Konzentrationen des Makrolids Efomycin M vorinkubiert: 0,1 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM ; 60 μM ; 80 μM und 100 μM (Efomycin M-Charge: Schering AG). Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens zwei Messwerten.

Aktivität von Efomycin M haben, wurden Stammlösungen von Efomycin M sowohl mit DMSO als auch mit Cremophor EL angesetzt und deren Hemmwirkung im standardisierten SPR-Bindungsassay untersucht. Hierbei wurde die Hemmwirkung auf die Bindungsfunktion sowohl von L-Selektin-IgG aus K-562-Zellen als auch von L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen verglichen.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 25. Efomycin M gelöst in DMSO hemmte die Bindung von L-Selektin-IgG sowohl aus K-562- als auch aus NS0-Zellen dosisabhängig. Efomycin M gelöst in Cremophor EL war hingegen inaktiv. Es konnte weder ein Einfluss auf die Bindung von L-Selektin-IgG aus K-562- noch auf die von L-Selektin-IgG aus NS0-Zellen beobachtet werden.

3.3.3.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Efomycin M die Bindungsfunktion von L-Selektin-IgG hemmt. Untersuchungen mit Efomycin M aus zwei verschiedenen Chargen zeigten allerdings deutliche Unterschiede. Zudem unterschieden sich verschiedene Formen von L-Selektin-IgG, die in unterschiedlichen Zellsystemen exprimiert wurden, in ihrer Sensitivität gegenüber Efomycin M, ebenso wie die unterschiedlichen Mitglieder der Selektinfamilie E-, P- und L-Selektin-IgG. Das Lösungsmittel hat Einfluss auf die Aktivität von Efomycin M.

3.3.4 Untersuchungen zur Hemmwirkung von Diadenosinpolyphosphaten

Diadenosinpolyphosphate setzen sich aus zwei Adenosinteilen zusammen, die über eine Phosphatgruppe miteinander verbunden sind. Der Riboseanteil des Adenosins ist über eine Esterbindung phosphoryliert. Mehrere Phosphatgruppen bilden eine Phosphatbrücke aus, die die zwei Adenosine miteinander verbindet. Mindestens zwei Phosphatanteile müssen an dieser Phosphatbrücke beteiligt sein. Je nach Anzahl dieser Gruppen teilt man die Diadenosinpolyphosphate in Ap_{2A} bis Ap_{7A} ein. Diadenosinpolyphosphate sind im Blut vorhanden und konnten von der Arbeitsgruppe um Prof. H. Schlüter (Charité, Medizinische Klinik für Nephrologie) aus Filtraten von Dialysepatienten gewonnen werden. Da für organische Verbindungen mit mehreren Phosphoestergruppen wie PPME [Stoolman *et al.*, 1984; Yednock *et al.*, 1987; Stoolman *et al.*, 1987] eine Hemmung von L-Selektin gezeigt worden war, sollte geprüft werden, ob auch Diadenosinpolyphosphate die Bindungsfunktion von L-Selektin hemmen.

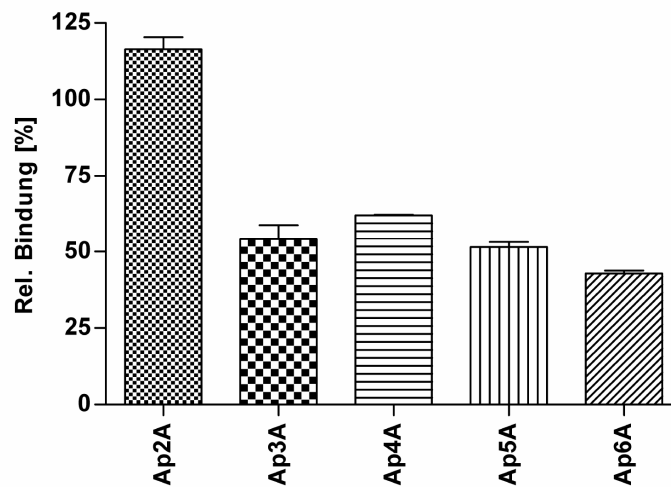


Abb. 26: Hemmung der L-Selektin-Bindung durch Diadenosinpolyphosphate (ApnA's).

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001; 0,6 ng/μl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Vor einer Messung wurde L-Selektin-IgG mit Ap2A, Ap3A, Ap4A, Ap5A oder Ap6A (jeweils 0,34 μg/μl) vorinkubiert. Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens zwei Messwerten.

Abbildung 26 zeigt, dass die Bindung von L-Selektin-IgG durch die Zugabe von Ap3A, Ap4A, Ap5A und Ap6A inhibierbar ist. Je 340 ng/μl eines der Diadenosinpolyphosphate reduzierte die Bindungsaktivität um ca. 50%. Nur Ap2A zeigte in diesem Bindungsassay keine inhibierende Wirkung.

Diese vielversprechenden Ergebnisse konnten allerdings mit den alten Chargen nach Lagerung bzw. mit neuen Chargen der Diadenosinpolyphosphate nur teilweise und nicht einheitlich reproduziert werden. Die Ergebnisse einer experimentellen Wiederholung mit verschiedenen Diadenosinpolyphosphaten der ursprünglichen Charge nach drei Monaten Lagerung bei -20°C zeigt Abbildung 27.

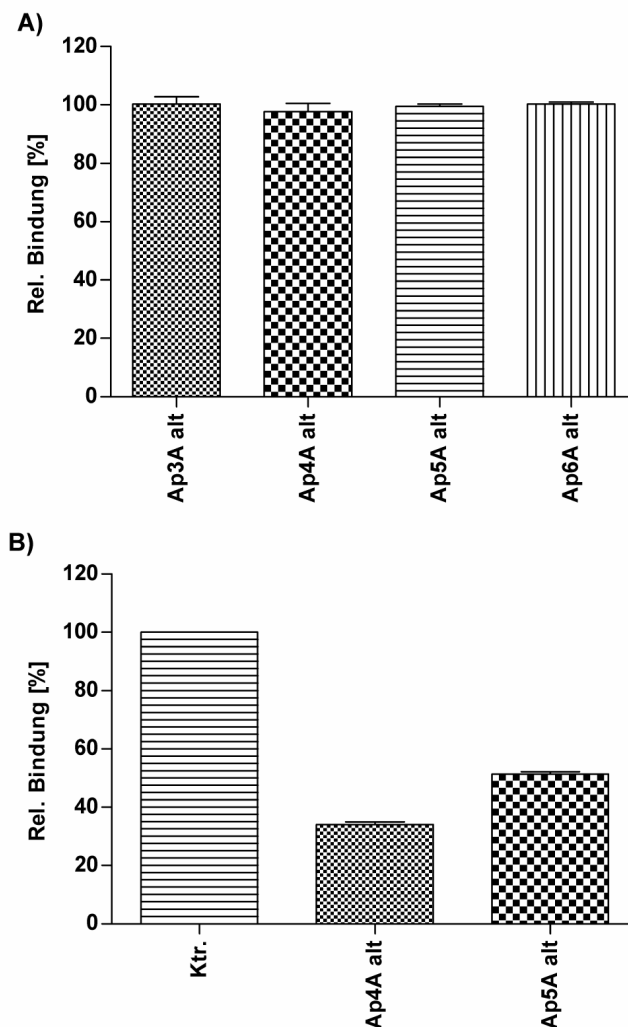


Abb. 27: Wiederholung der Untersuchung nach Lagerung der Diadenosinpolyphosphate. Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinatem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001; 0,6 ng/μl) nach Kopplung auf Protein A-Goldnanopartikel gemessen. Vor einer Messung wurde L-Selektin-IgG mit (A) Ap3A, Ap4A, Ap5A oder Ap6A (jeweils 0,34 μg/μl) bzw. (B) Ap4A oder Ap5A (jeweils 1,43 μg/μl) vorinkubiert. Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens zwei Messwerten.

Diadenosinpolyphosphate der gelagerten Charge hatten in einer Konzentration von 340 ng/μl keinen Einfluss auf die Bindung von L-Selektin-IgG. Durch Erhöhung der Konzentration auf 1,43 μg/μl konnte für Ap4A bzw. Ap5A ein inhibitorischer Effekt auf die Bindungsfunktion von L-Selektin-IgG beobachtet werden. Das deutet auf eine geringe Stabilität der Diadenosinpolyphosphate bei Temperaturen von -20°C und wärmer hin.

Aufgrund dessen, dass die mehrfache Reproduktion der ersten, vielversprechenden Messreihe keine konsistenten Ergebnisse lieferte, und die Fehlersuche keine befriedigende Ursache identifizieren ließ, wurden keine weiteren Untersuchungen mit Diadenosinpolyphosphaten durchgeführt.

3.3.5 Untersuchungen zur Hemmwirkung von dendritischen Polyglycerolsulfaten (dPGS)

Dendritische Polyglycerolsulfate (dPGS) stellen eine neue Art von dendrimerartig verzweigten polysulfatierten Polymeren dar, die aus einem stabilen, biokompatiblen Polyethergerüst aufgebaut sind und globuläre Struktur besitzen. Ursprünglich wurden dendritische Polyglycerolsulfate von der Arbeitsgruppe von Prof. R. Haag (FU-Berlin, Institut für Chemie und Biochemie) mit dem Ziel der Herstellung eines Heparinmimetikums synthetisiert. Aufgrund der hohen Besatzdichte an Sulfatgruppen wurde die Hypothese formuliert, dass dendritische Polyglycerolsulfate, ähnlich wie Fucoidan, ebenfalls inhibitorische Wirkung auf L-Selektin zeigen könnten. Der standardisierte SPR-Assay wurde als kompetitiver Bindungstest genutzt, um in Kooperation mit Prof. R. Haag erstmals die Bindung von dendritischen Polyglycerolsulfaten an E-, P- und L-Selektin zu untersuchen. Zur Verfügung standen vier unterschiedliche Formen von Polyglycerolsulfaten, deren Polyglycerolkerne eine unterschiedliche Molmasse und eine unterschiedlich starke Verzweigung aufwiesen. 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. Die polymeren Grundstrukturen wurden mit Sulfatgruppen funktionalisiert, wobei das Molekulargewicht der Polyglycerolsulfate dPGS 2a 5500 g/mol, dPGS 2b 6800 g/mol, dPGS 2c 8600 g/mol und dPGS 2d 12300 g/mol betrug. 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%. 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.

3.3.5.1 Hemmwirkung von dPGS

Die mögliche Hemmwirkung der dPGS auf Selektine wurde im standardisierten SPR-Bindungsassay zunächst am Beispiel von L-Selektin-IgG untersucht.

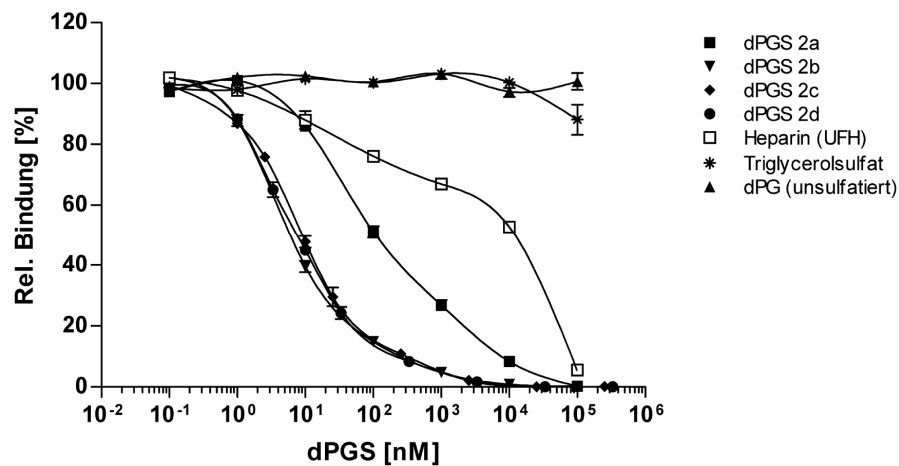


Abb. 28: Hemmung der L-Selektin-Bindung durch dendritische Polyglycerolsulfate.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001; 0,6 ng/μl) nach Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel gemessen. Untersucht wurden die Hemmwirkung der dendritischen Polyglycerolsulfate dPGS 2a, dPGS 2b, dPGS 2c und dPGS 2d sowie als Kontrollen nicht-sulfatiertes dPG, unfraktioniertes Heparin (UHF) und sulfatierte Triglycerole. Vor jeder Messung wurde L-Selektin-IgG mit folgenden Endkonzentrationen der dPGS bzw. Kontrollen vorinkubiert: 0 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM und 100 μM. Die Inhibitorwirkung von dPGS 2c wurde zusätzlich bei 2,53 nM, 25,3 nM, 253 nM, 2,53 μM, 25,3 μM und 253 μM bzw. von dPGS 2d bei 3,34 nM, 33,4 nM, 334 nM, 3,34 μM, 33,4 μM und 334 μM gemessen. Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR untersucht. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens vier Messwerten.

Wie in Abbildung 28 gezeigt, war mit allen vier dPGS-Varianten eine dosisabhängige Hemmung der L-Selektin-IgG-Bindung messbar. Mit dPGS 2a konnte ein IC₅₀-Wert von 100 nM ermittelt werden, während sich die IC₅₀-Werte für dPGS 2b, 2c und 2d im Bereich von 1-10 nM bewegten. Alle dPGS-Varianten hemmten stärker als unfraktioniertes Heparin. Nicht-sulfatiertes dPGS und sulfatiertes Triglycerol zeigten keine inhibitorische Wirkung.

3.3.5.2 Vergleich der Hemmwirkung von dPGS auf die Bindungsfunktion von L-, P- und E-Selektin

Zur weiteren Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung der dPGS wurden Messungen mit E-, P- und L-Selektin-IgG durchgeführt. Exemplarisch wurde hierfür dPGS 2c eingesetzt.

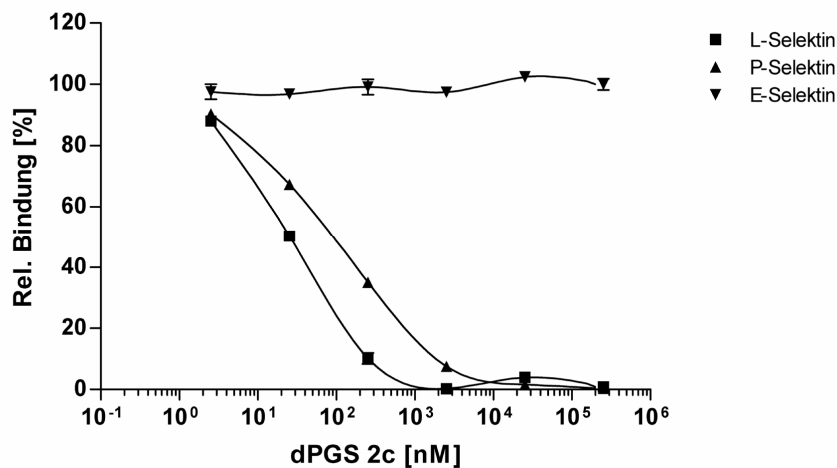


Abb. 29: Vergleich der Hemmwirkung von dPGS 2c auf die Bindungsfunktion von L-, P- und E-Selektin.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem E-, P- und L-Selektin-IgG (R&D Systems; 0,6 ng/μl) nach Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel gemessen. Vor einer Messung wurden E-, P- oder L-Selektin-IgG mit den angegebenen Konzentrationen des dPGS 2c vorinkubiert: 0 nM, 2,53 nM, 25,3 nM, 253 nM, 2,53 μM, 25,3 μM und 253 μM. Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens zwei Messwerten.

Der Vergleich der Hemmwirkung von dPGS 2c auf die Bindungsfunktion von L-, P- und E-Selektin zeigte, dass L-Selektin-IgG durch dPGS 2c am stärksten gehemmt wurde ($IC_{50} = 25$ nM). Für P-Selektin-IgG konnte ein IC_{50} -Wert von 90 nM ermittelt werden, während die Bindungsfunktion von E-Selektin-IgG unbeeinflusst blieb.

3.3.5.3 Die Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Sulfatierungsgrad

Die mögliche Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Sulfatierungsgrad wurde am Beispiel der dPGS-Variante 2d untersucht. Im kompetitiven Bindungsassay wurde die Interaktion zwischen L-Selektin-IgG und immobilisiertem SiaLe^x-PAA-sTyr (20 mol%/5 mol%) in Gegenwart von 10 nM dPGS 2d der Sulfatierungsgrade 10% (6800 g/mol), 41% (9400 g/mol) und 76% (12300 g/mol) gemessen.

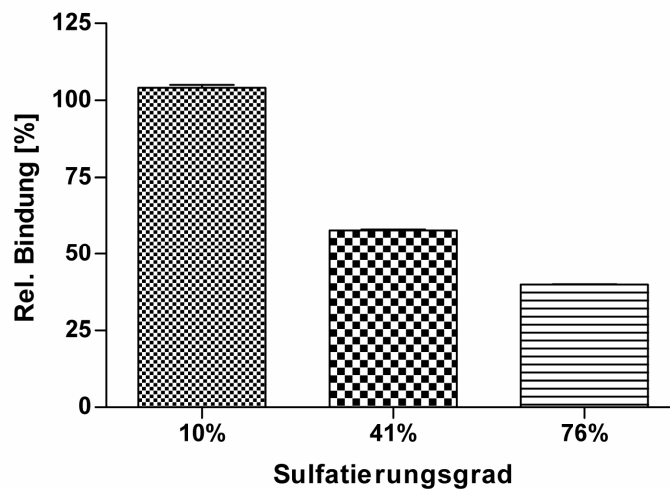


Abb. 30: Kompetitive Hemmung der L-Selektin-Bindung durch dPGS 2d mit unterschiedlichem Sulfatierungsgrad.

Auf einem Sensor Chip SA wurde der artifizielle Selektinligand SiaLe^x-PAA-sTyr immobilisiert und die Bindung von rekombinantem L-Selektin-IgG (Charge 07/2001; 0,6 ng/ μ l) nach Kopplung auf Protein A-beschichtete Goldnanopartikel gemessen. Untersucht wurde die Inhibitorwirkung von dPGS 2d mit 10%iger, 41%iger und 76%iger Sulfatierung. Vor einer Messung wurde L-Selektin-IgG mit 10 nM eines der Sulfatierungsvarianten vorinkubiert. Die Inhibitorwirkung wurde mittels SPR gemessen. Die Daten repräsentieren Messwerte abzüglich der auf der mit LacNAc-PAA beschichteten Kontrollspur erhaltenen Werte. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens zwei Messwerten.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, erfolgte mit zunehmendem Sulfatierungsgrad eine verstärkte Hemmung der Bindung von L-Selektin-IgG. Eine 10%ige Sulfatierung von dPGS 2d bewirkte keine Hemmung der Bindung, das Bindungssignal entsprach dem gemessenen Kontrollwert. DPGS 2d mit 41%iger Sulfatierung reduzierte das Bindungssignal auf ca. 60% des gemessenen Bindungssignals der Kontrolle. Eine 76%ige Sulfatierung zeigte den stärksten Effekt der Hemmung und reduzierte das Bindungssignal auf ca. 45% des Kontrollwertes.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dendritische Polyglycerolsulfate in Abhängigkeit vom Grad der Sulfatierung dosisabhängig an L-Selektin-IgG binden und so kompetitiv L-Selektin-abhängige Bindungen hemmen. Ein solcher inhibitorischer Einfluss konnte in einer exemplarischen Überprüfung auch für P-Selektin beobachtet werden. Die Bindung von E-Selektin blieb hingegen unbeeinflusst.

3.4 Untersuchungen zur Hemmung der Bindung von L-Selektin an intakten Zellen – Messungen in der Flusskammer

Auf der Ebene von Molekül-Molekül-Interaktionen konnten mittels SPR einige inhibitorisch wirkende Substanzen identifiziert und charakterisiert werden. Die nächsten Untersuchungen zielten auf die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung auf der Ebene intakter Zellen bzw. Zell-Zell-Interaktionen ab. Hierfür wurde die Flusskammer eingesetzt.

In der Flusskammer wird versucht, die rheologischen Bedingungen, wie sie im zirkulierenden Blut herrschen, so genau wie möglich nachzustellen. Dieses Modell wurde zuerst von Lawrence und Springer (1991) beschrieben, und erlaubt die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen auf Endothel und Leukocyten unter annähernd physiologischen Bedingungen.

Für die Untersuchung der Zell-Zell-Interaktion in der Flusskammer wurden als Modell für Leukocyten mit L-Selektin transfizierte NALM-6-Zellen, eine lymphoide Zelllinie, und als Modell für Endothelzellen HUVECs (humane Endothelzellen aus der Nabelschnur) nach Aktivierung mit TNF- α eingesetzt. L-Selektin exprimierende NALM-6-Zellen binden in Abhängigkeit vom Scherstress L-Selektin-vermittelt an mit dem Cytokin TNF- α aktiviertes Endothel. Diese Adhäsion ist durch L-Selektin-spezifische Antikörper inhibierbar [Zakrzewicz *et al.*, 1997], so dass angenommen wurde, dass der Flusskammerassay auch für die Untersuchung potentieller Inhibitoren geeignet sein sollte.

3.4.1 Expression von L-Selektin auf transfizierten NALM-6-Zellen

Der Wildtyp der lymphoiden Vorläuferzelllinie NALM-6 exprimiert kein L-Selektin auf der Zelloberfläche. Für die Flusskammeranalysen stand aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe eine Transfektante zur Verfügung, die L-Selektin auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Die Expression auf der Zelloberfläche der transfizierten Zellen wurde mittels FACS untersucht. Als Negativkontrolle wurde eine Mock-Transfektante eingesetzt, die mit dem Leervektor pCR3.1 transfiziert worden war. Die L-Selektin-Transfektanten enthielten das sog. FL-Konstrukt von L-Selektin. FL steht für „*full length*“ und beschreibt den gesamten kodierenden Bereich der L-Selektin cDNA. Das in den NALM-6-Zellen exprimierte L-Selektin enthielt damit neben dem extrazellulären Abschnitt auch die Transmembrandomäne und den

cytoplasmatischen Teil und wird analog zur physiologischen Expression auf Leukocyten auf der Zelloberfläche der NALM-6-Zellen präsentiert [C. Fieger, 1997, Dissertationsschrift].

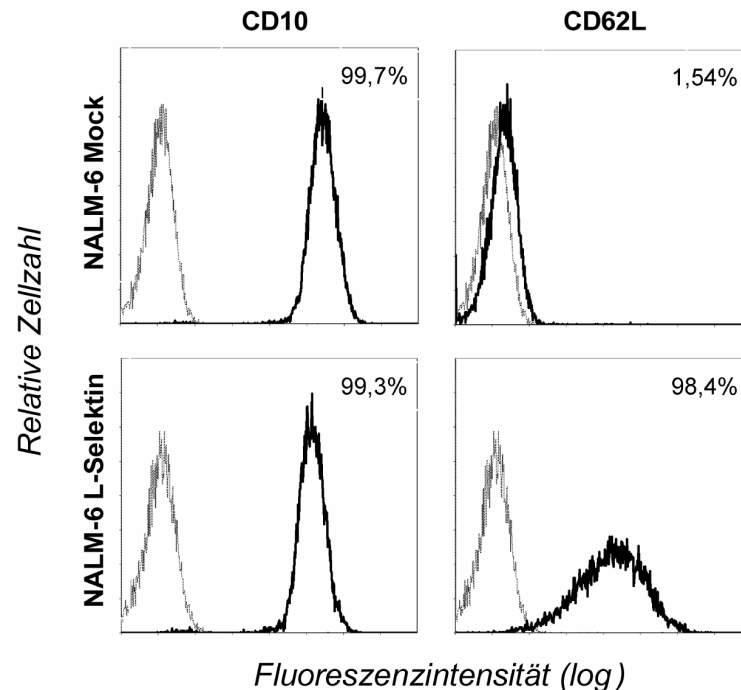


Abb. 31: FACS-Analyse der L-Selektin-Expression von NALM-6-Transfektanten.

Die lymphoide Vorläuferzelllinie NALM-6 wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit der *full length* cDNA von L-Selektin bzw. dem Leervektor pCR3.1 (Mock) stabil transfiziert. In einer FACS-Analyse wurde die L-Selektin-Expression überprüft. Transfizierte NALM-6-Zellen wurden mit *Mouse* IgG1/IgG2b (Isotypenkontrolle, helles Histogramm), L-Selektin-spezifischem Antikörper (Klon FMC 46, dunkles Histogramm) und CD10-spezifischem Antikörper (Klon MEM 78, dunkles Histogramm) angefärbt. Der Anteil an positiv gefärbten Zellen wird im jeweiligen Histogramm gezeigt. FMC 46 bindet spezifisch an L-Selektin-transfizierte Zellen, nicht aber an Mock-transfizierte Zellen. MEM 78 ist ein spezifischer Antikörper für den Nachweis des Oberflächenmarkers CD10, welcher nur auf lymphoiden Vorläuferzellen exprimiert wird.

Von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden Aliquots der L-Selektin- und Mock-Transfektanten in Kultur genommen; L-Selektin-exprimierende Zellen wurden durch Magnetpartikel über mehrere Zyklen angereichert. Der Nachweis der Expression von L-Selektin auf den transfizierten Zellen wurde durch FACS-Analysen unter Einsatz eines L-Selektin-spezifischen, monoklonalen Antikörpers durchgeführt. Als Positivkontrolle diente CD10, ein für lymphoide Vorläuferzellen charakteristischer Oberflächenmarker.

Das Ergebnis ist in Abbildung 31 gezeigt. L-Selektin ließ sich mittels FACS auf der Oberfläche L-Selektin transfizierter NALM-6-Zellen nachweisen. Mit Leervektor transfizierte Zellen konnten mit dem L-Selektin-spezifischen Antikörper nicht detektiert werden. Diese Zellen exprimierten kein L-Selektin auf ihrer Oberfläche.

3.4.2 TNF- α induzierte Expression von L-Selektin-Liganden auf HUVECs

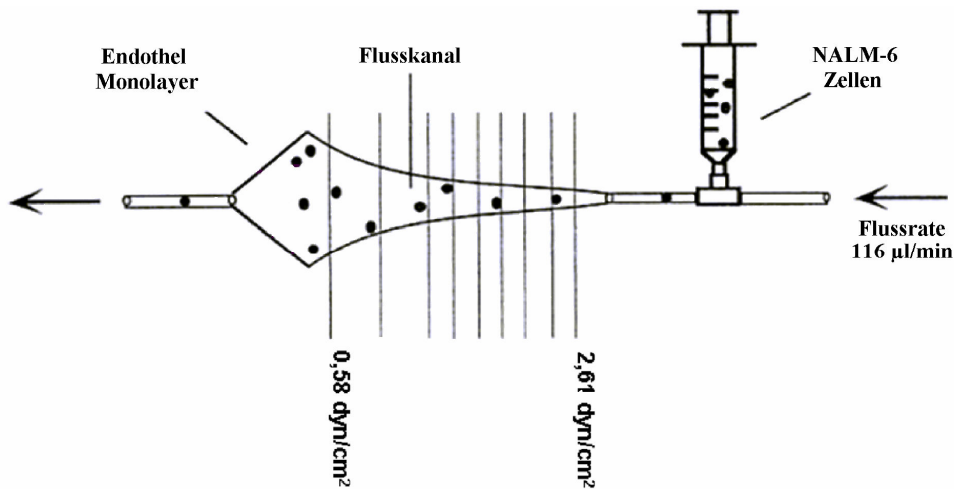


Abb. 32: Schematische Darstellung der Flusskammer [Quelle: C. Fieger, 1997, Dissertationsschrift].

Für die Flusskammeruntersuchungen werden 2-3 Tage vor Versuchsbeginn auf einem Deckgläschen humane Endothelzellen aus der Nabelschnur immobilisiert und fünf Stunden vor Versuchbeginn mit TNF- α aktiviert, um die Expression von Liganden zu induzieren. Die Endothelzellen wurden anschließend mit einer Schablone abgedeckt, deren Hohlraum einen Flusskanal über dem Endothel bildet. 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 µl/min zwischen 0,6-2,6 dyn/cm² [C. Fieger, Dissertationsschrift, 1997]. Abbildung 32 zeigt den schematischen Aufbau einer Flusskammer.

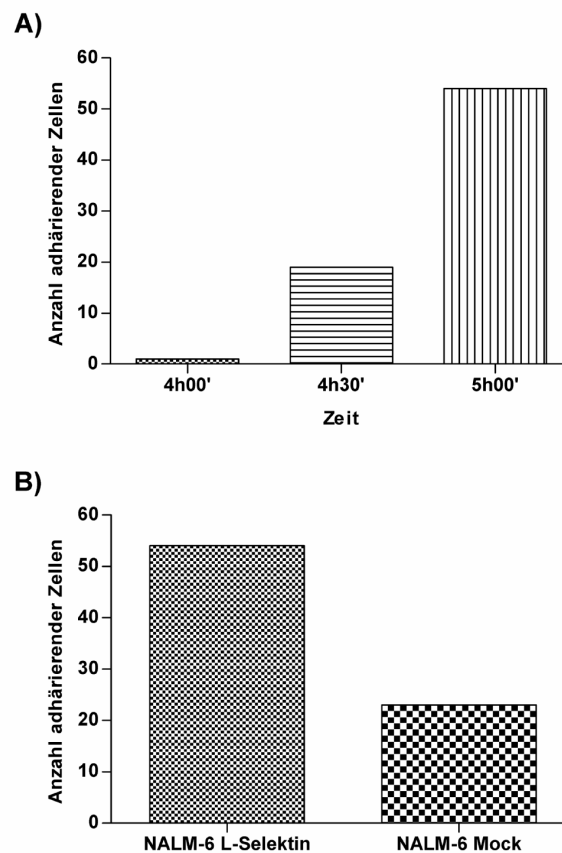


Abb. 33: Adhäsion von L-Selektin an HUVECs zu unterschiedlichen Zeiten nach Stimulation mit TNF- α .

(A) Die Adhäsion L-Selektin-exprimierender NALM-6-Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der TNF- α -Stimulation des Endothels gemessen. In der Flusskammer lag der Scherstress bei einer Flussrate von 116 $\mu\text{l}/\text{min}$ zwischen 0,6-2,6 dyn/cm^2 . 5 min nach Versuchsbeginn und unter Beibehaltung der Flussbedingungen wurden die Zellen gezählt, die an das Endothel gebunden hatten. (B) Vergleich der Adhäsion sowohl L-Selektin- als auch Mock-transfizierter NALM-6-Zellen. Hierbei war auf dem Endothel eine Adhäsion beider Zelllinien zu beobachten, diese war im Vergleich zur L-Selektin-Transfektante bei der Mock-Transfektante jedoch deutlich geringer. In beiden Abbildungen (A+B) ist die Adhäsion bei 0,9418 dyn/cm^2 dargestellt.

Zur Bestimmung eines geeigneten Zeitpunkts nach Stimulation mit TNF- α wurde die Adhäsion L-Selektin-exprimierender NALM-6-Zellen zu unterschiedlichen Zeiten gemessen. Abbildung 33A zeigt, dass zwischen null und fünf Stunden TNF- α -Stimulation ein deutlicher Anstieg adhärerender NALM-6-Zellen (L-Selektin transfiziert) beobachtet werden konnte. Der 5 h-Zeitpunkt wurde für die Durchführung der Untersuchungen ausgewählt. Mock-transfizierte NALM-6-Zellen adhärten ebenfalls an das Endothel, aber auf einem deutlich geringeren Niveau (Abb. 33B). Die Differenz zwischen L-Selektin-Transfektanten und

Mock-Transfektanten wurde als die L-Selektin-vermittelte Adhäsion gewertet. In Untersuchungen zur Hemmwirkung von PAA-basierten Ligandenkonjugaten wurde das Endothel neben der Stimulation mit TNF- α eine Stunde vor Versuchsbeginn zusätzlich mit adhäsionsblockierenden Antikörpern gegen E- und P-Selektin behandelt. Bei allen anderen Untersuchungen in der Flusskammer wurde keine Vorbehandlung des Endothels mit E- und P-Selektin-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

3.4.3 Eignung der Flusskammer für Inhibitoruntersuchungen

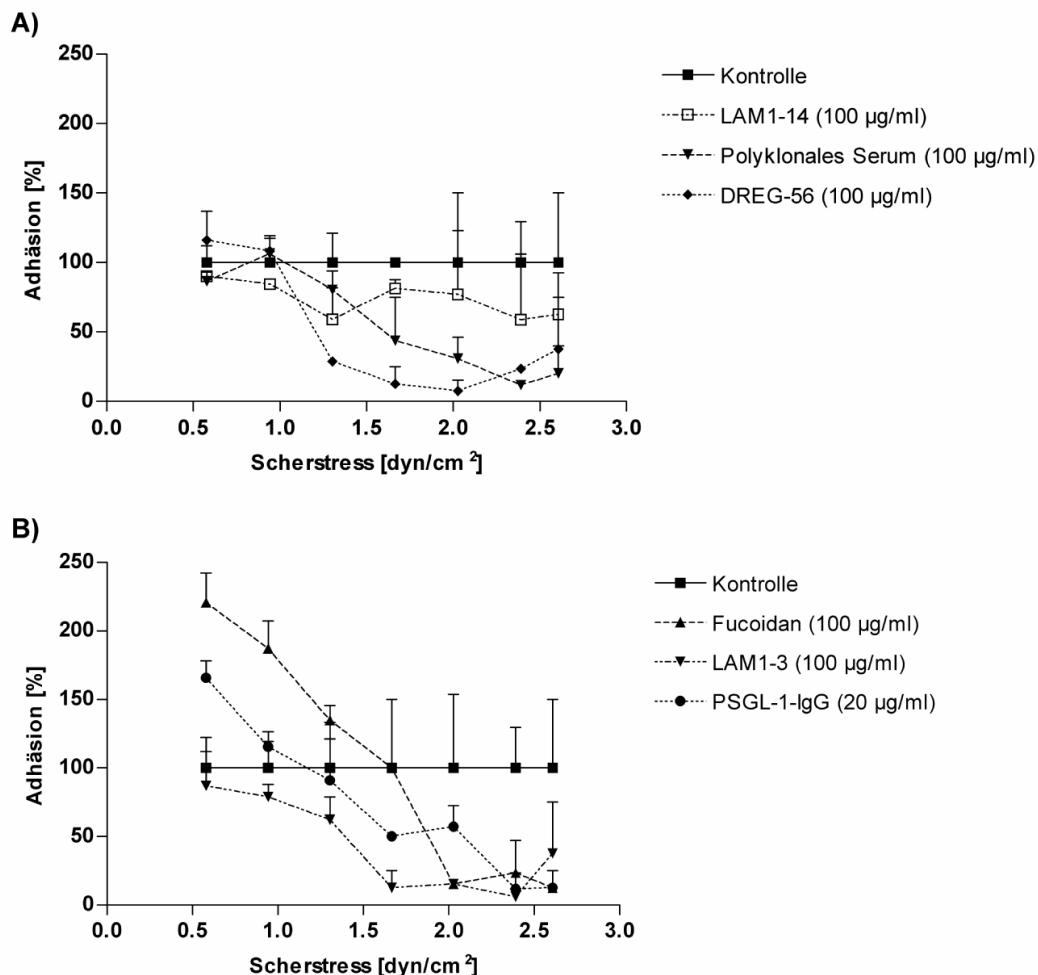


Abb. 34: Hemmung der L-Selektin-vermittelten Adhäsion durch L-Selektin-spezifische Antikörper und Liganden.

L-Selektin-exprimierende NALM-6-Zellen wurden 10-15 min vor Versuchbeginn mit folgenden Antikörpern und Liganden vorinkubiert: DREG-56 (100 µg/ml), LAM1-3 (100 µg/ml), Polyklonales Serum (100 µg/ml), LAM1-14 (100 µg/ml), Fucoïdan (100 µg/ml) und PSGL-1-IgG (20 µg/ml). Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens zwei Messwerten. Kontrolle: Keine Vorinkubation mit Antikörpern oder Liganden.

Bei diesen Versuchen wurden NALM-6-Zellen zuerst mit den monoklonalen Antikörpern DREG-56, LAM1-3 und LAM1-14, polyklonalem anti-L-Selektin-spezifischen Antiserum sowie den bekannten L-Selektin-Liganden Fucoidan und PSGL-1 vorinkubiert, um auf der Zelloberfläche exponierte L-Selektin-Moleküle zu blockieren. Danach wurden die Zellen durch die Flusskammer geleitet und die Adhäsion an das Endothel quantifiziert. Abbildung 34 zeigt, dass die Adhäsion durch die monoklonalen Antikörper DREG-56 und LAM1-3 [Spertini *et al.*, 1991b], die gegen die Ligandenbindungsstelle von L-Selektin gerichtet sind und diese blockieren, wie auch durch polyklonales anti-L-Selektin-spezifisches Antiserum gehemmt wurde, nicht dagegen durch den monoklonalen Antikörper LAM1-14, der gegen die Abschnitte von L-Selektin gerichtet ist, die nicht an der Ligandenbindung beteiligt sind. Durch Vorinkubation der NALM-6-Zellen mit den bekannten L-Selektin-Liganden Fucoidan und PSGL-1 konnte die Adhäsion ebenfalls gehemmt und zugleich die spezifische Interaktion dieser Liganden mit L-Selektin gezeigt werden.

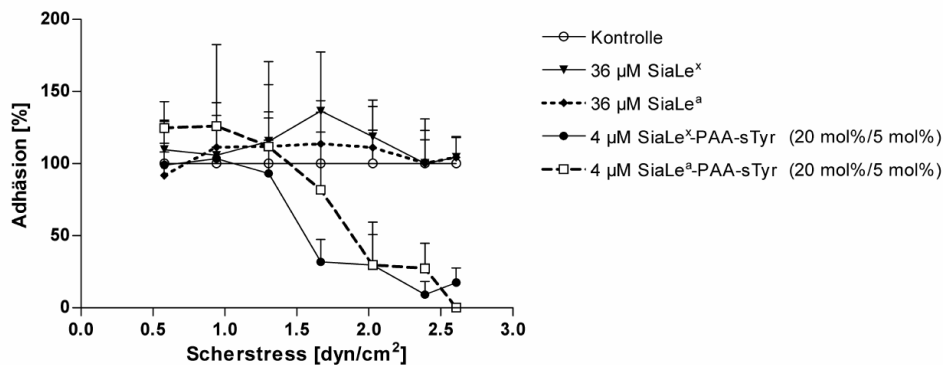
3.4.4 Hemmwirkung von PAA-basierten Ligandenkonjugaten

Nach Untersuchungen zur Hemmwirkung PAA-basierter Ligandenkonjugate mittels SPR folgten auf der Ebene von Zell-Zell-Interaktionen Untersuchungen in der Flusskammer. Hierbei wurde die Fähigkeit der PAA-Konjugate SiaLe^x-PAA-sTyr, SiaLe^a-PAA-sTyr, sTyr-PAA (5 mol%) und sTyr-PAA (20 mol%) untersucht, die Adhäsion L-Selektin-exprimierender NALM-6-Zellen an TNF- α -aktivierte HUVECs zu hemmen. Vor einer Injektion in die Flusskammer wurden die NALM-6-Zellen mit 4 μ M eines der PAA-Konjugate inkubiert. In äquivalenten Mengen zum Kohlenhydratanteil der PAA-Konjugate wurden Kontrollmessungen mit den monovalenten Tetrasacchariden SiaLe^x und SiaLe^a durchgeführt (36 μ M). Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 35 gezeigt.

Bei einem Scherstress von 1,67 dyn/cm² konnte die L-Selektin-vermittelte Adhäsion der NALM-6-Zellen durch Zugabe des Biligandpolymers SiaLe^x-PAA-sTyr um mehr als 50% gehemmt werden, während SiaLe^a-PAA-sTyr fast keine Hemmwirkung besaß. Dies deutete auf eine stärkere Hemmung durch SiaLe^x-PAA-sTyr als durch SiaLe^a-PAA-sTyr hin. Bei einem Scherstress von 2,03 dyn/cm² reduzierten sowohl SiaLe^x-PAA-sTyr als auch SiaLe^a-PAA-sTyr die Bindung der Zellen um mehr als 50%. Die monovalenten Tetrasaccharide SiaLe^x und SiaLe^a bewirkten keine Hemmung der Bindung. Diese Daten zeigten, dass die Hemmwirkung der Biligandkonjugate bei hohem Scherstress ansteigt. Ein ähnlicher Anstieg der Hemmwirkung bei hohem

Scherstress konnte in anderen Untersuchungen zur Hemmung der Adhäsion von L-Selektin-exprimierenden NALM-6-Zellen an TNF- α -aktiviertes Endothel durch den monoklonalen Antikörper LAM1-3 gezeigt werden [Zakrzewicz *et al.*, 1997].

A)



B)

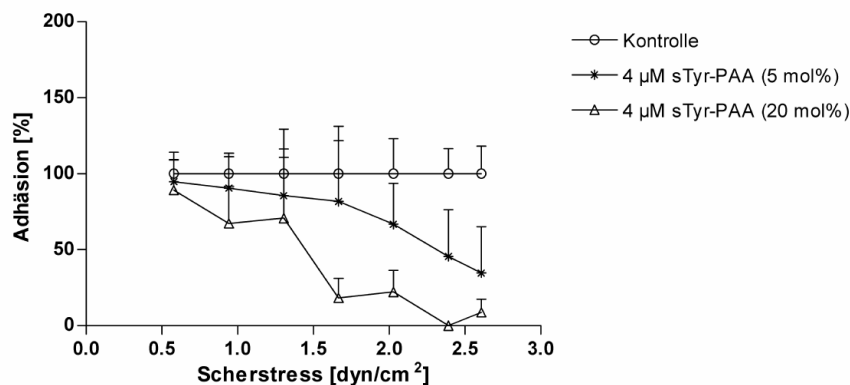


Abb. 35: Hemmung der L-Selektin-vermittelten Adhäsion durch PAA-basierte Ligandenkonjugate im Flusskammerassay.

In Flusskammerexperimenten wurde die inhibitorische Wirkung der PAA-basierten Ligandenkonjugate untersucht. 10-15 min vor Versuchsbeginn wurden L-Selektin-transfizierte NALM-6-Zellen mit 4 μ M der Konjugate SiaLe^x-PAA-sTyr, SiaLe^a-PAA-sTyr, sTyr-PAA (5 mol%) oder sTyr-PAA (20 mol%) bzw. mit 36 μ M der monovalenten Tetrasaccharide SiaLe^x oder SiaLe^a vorinkubiert. Die HUVECs wurden zusätzlich vor Versuchsbeginn 1 h mit α -E- und α -P-Selektin-spezifischen Antikörpern behandelt. In der Flusskammer lag der Scherstress bei einer Flussrate von 116 μ l/min zwischen 0,6-2,6 dyn/cm². 5 min nach Versuchsbeginn und unter Beibehaltung der Flussbedingungen wurden adhäsierende Zellen ausgezählt, die an das Endothel gebunden hatten. In A) ist die Hemmwirkung der Biligandpolymere SiaLe^x-PAA-sTyr und SiaLe^a-PAA-sTyr im Vergleich zur Wirkung der monovalenten Tetrasacchariden SiaLe^x und SiaLe^a zu sehen. In B) ist die Hemmwirkung multivalenter Tyrosinsulfatkonjugate gezeigt. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von vier einzelnen Messwerten. Kontrolle: Keine Vorinkubation mit PAA-Konjugaten.

In weiteren Untersuchungen wurde die Hemmwirkung von sTyr-PAA (5 mol%) und sTyr-PAA (20 mol%) getestet. sTyr-PAA (20 mol%) hemmte die Adäsion der NALM-6-Zellen um mehr als 50% ab einem Scherstress von $1,67 \text{ dyn/cm}^2$. Ähnlich wie bei den Biligandkonjugaten steigerte sich die Hemmwirkung mit zunehmendem Scherstress. Die Hemmwirkung von sTyr-PAA (20 mol%) war vergleichbar mit der von SiaLe^x-PAA-sTyr. Entsprechende Hinweise gaben auch Untersuchungen, in denen multivalente sTyr-PAA-Konjugate sich im Rahmen eines statischen Bindungsassays als potente Selektininhibitoren zeigten [Pochechueva *et al.*, 2003]. Diese Schlussfolgerung wird durch Untersuchungen unterstützt, die zeigen, dass negativ geladene Proteine wie Nucleolin [Harms *et al.*, 2001] und negativ geladene Kohlenhydrate wie Fucoidin [Ley *et al.*, 1993] als L-Selektin-Liganden fungieren.

3.4.5 Hemmwirkung von dPGS

Verschiedene dendritische Polyglycerolsulfate zeigten im SPR-Assay eine stark inhibitorische Wirkung auf die Bindungsfunktion von L-Selektin (s. 3.3.5). So folgte daran anknüpfend eine Untersuchung zur Hemmwirkung des dPGS 2c auf die L-Selektin-abhängige Zell-Zell-Interaktion.

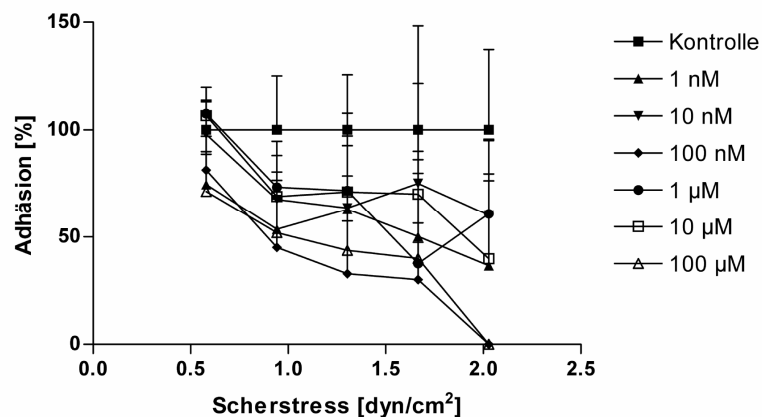


Abb. 36: Hemmung der L-Selektin-vermittelten Adhäsion durch dPGS 2c im Flusskammerassay.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Hemmwirkung von dPGS 2c auf die Zell-Zell-Interaktion zwischen L-Selektin-exprimierenden NALM-6-Zellen und Endothel getestet. 10-15 min vor Versuchsbeginn wurden L-Selektin-transfizierte NALM-6-Zellen mit folgenden Konzentrationen des dPGS 2c vorinkubiert: 1 nM; 10 nM; 100 nM; 1 µM; 10 µM und 100 µM. In der Flusskammer lag der Scherstress bei einer Flussrate von $116 \mu\text{l/min}$ zwischen $0,6-2,6 \text{ dyn/cm}^2$. 5 min nach Versuchsbeginn und unter Beibehaltung der Flussbedingungen wurden adhärierende Zellen gezählt, die an das Endothel gebunden hatten. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von drei einzelnen Messwerten. Kontrolle: Keine Vorinkubation mit dPGS 2c.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 36. Bereits mit Zugabe von 1 nM dPGS 2c konnte ein inhibitorischer Effekt beobachtet werden. Dieser ließ sich mit höheren Konzentrationen steigern, ohne dass sich eine ganz klare Dosisabhängigkeit der Inhibition zeigte. Vielmehr schien sich die verminderte Adhäsion in einem von der Konzentration nicht absolut beeinflussbaren Bereich zu bewegen. Eine absolute Hemmwirkung war mit den eingesetzten Konzentrationen nicht erreichbar. Zusammenfassend konnte jedoch eine eindeutig inhibitorische Wirkung des Polyglycerolsulfats 2c gezeigt werden.

3.4.6 Hemmwirkung des Makrolids Efomycin M

In SPR-Analysen zeigte das Makrolid Efomycin M eine deutlich inhibitorische Wirkung. Mittels Flusskammermessungen wurde diese Wirkung auch auf der Ebene der Zell-Zell- und Zell-Ligand-Interaktion verifiziert.

3.4.6.1 Untersuchungen zur Hemmwirkung der L-Selektin-abhängigen Zell-Zell-Interaktion

In der Flusskammer wurde die Adhäsion L-Selektin-transfizierter NALM-6-Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Efomycin M-Konzentrationen gemessen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 37. Die L-Selektin-abhängige Adhäsion der NALM-6-Zellen konnte durch Zugabe von Efomycin M konzentrationsabhängig gehemmt werden. Während nach Vorinkubation mit 0,1 μM Efomycin M kein inhibitorischer Effekt zu beobachten war, erfolgte eine deutliche Hemmung der L-Selektin-abhängigen Adhäsion ab einer Konzentration von 1 μM Efomycin M. Hierbei konnte ab einem Scherstress von 1,30 dyn/cm^2 die Adhäsion der L-Selektin-exprimierenden NALM-6-Zellen um mehr als 50% gehemmt werden. Nach Vorinkubation mit 10 μM Efomycin M war die L-Selektin-abhängige Adhäsion der Zellen bereits ab einem Scherstress von 0,94 dyn/cm^2 um mehr als 50% reduziert. Diese Daten zeigten, dass die Hemmwirkung von Efomycin M bei hohem Scherstress zunimmt. Ein ähnlicher Anstieg der Hemmwirkung bei hohem Scherstress konnte bei Untersuchungen mit PAA-Ligandenkonjugaten bereits beobachtet werden. Die gezeigte Hemmwirkung im SPR-Assay konnte somit auf der Ebene von Zell-Zell-Interaktionen mittels Flusskammeruntersuchungen bestätigt werden.

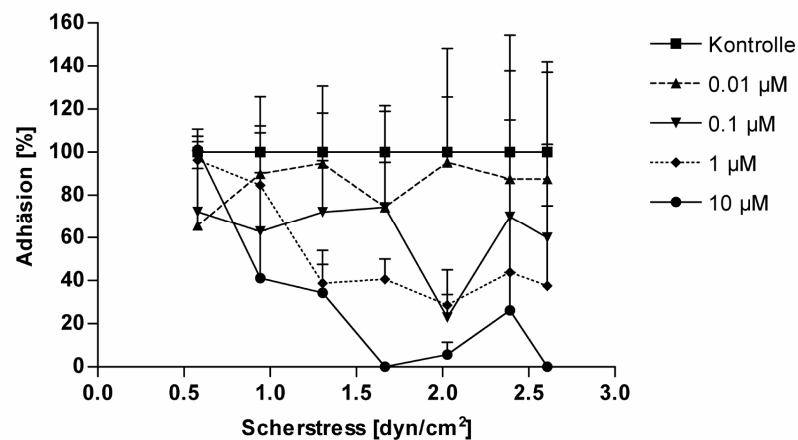


Abb. 37: Hemmung der L-Selektin-vermittelten Adhäsion durch Efomycin M im Flusskammerassay.

In Flusskammerexperimenten wurde die Hemmwirkung des potentiellen Selektinliganden Efomycin M untersucht. 10-15 min vor Versuchsbeginn wurden L-Selektin transfizierte NALM-6-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen des Makrolids Efomycin M vorinkubiert: 0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM und 10 µM. In der Flusskammer lag der Scherstress bei einer Flussrate von 116 µl/min zwischen 0,6-2,6 dyn/cm². 5 min nach Versuchsbeginn und unter Beibehaltung der Flussbedingungen wurden adhärierende Zellen gezählt, die an das Endothel (HUVECs) gebunden hatten. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von bis zu zehn einzelnen Messwerten. Kontrolle: Keine Vorinkubation mit Efomycin M.

3.4.6.2 Untersuchungen zur Hemmwirkung der L-Selektin-abhängigen Zell-Ligand-Interaktion

Der in den bisher beschriebenen Versuchen verwendete Aufbau der Flusskammer, bei dem strömende NALM-6-Zellen an immobilisierte Endothelzellen adhäreren, weist bezüglich der Interpretation der erhobenen Daten zwei Einschränkungen auf.

Erstens kann nicht differenziert werden, ob die Beobachtung einer scherkraftabhängigen Hemmung durch Inhibitoren auf Eigenschaften von L-Selektin oder auf Eigenschaften der endothelialen Liganden zurückgeführt werden kann. Zweitens zeigt die Beobachtung, dass die Adhäsion durch den Antikörper DREG-56 gehemmt werden kann, und dass auf Seiten der NALM-6-Zellen die Bindung durch L-Selektin vermittelt wird. Unklar bleibt jedoch, ob auf Seiten der Endothelzellen die Bindung durch Glykoproteinliganden von L-Selektin vermittelt wird. Daher wurde in einer Gruppe von Kontrolluntersuchungen die stationäre Phase, d. h. das Deckgläschen der Flusskammer nicht mit endothelialen Zellen, sondern mit dem Liganden SiaLe^x-PAA-sTyr beschichtet. Bei diesem Versuchsaufbau ist sichergestellt, dass NALM-6-Zellen über auf ihrer Oberfläche exponiertes L-Selektin ausschließlich an ihren Liganden SiaLe^x-PAA-sTyr adhäreren.

In einem ersten Versuchansatz wurden NALM-6-Zellen mit L-Selektin-spezifischen Antikörpern behandelt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 38. Die L-Selektin-abhängige Adhäsion der Zellen an SiaLe^x-PAA-sTyr konnte durch Zugabe des Antikörpers DREG-56 erfolgreich inhibiert werden. Der nicht inhibitorische Antikörper LAM1-14 beeinflusste die Adhäsion hingegen nur geringfügig. Mock-transfizierte NALM-6-Zellen hatten überhaupt nicht gebunden. Es deutete sich allerdings an, dass dieser Assayaufbau limitiert ist. Eine verlässliche Adhäsion der Zellen war nur bis zu einem Scherstress von 2 dyn/cm² zu beobachten. Bei höherem Scherstress hatten zu wenige Zellen gebunden, so dass die Auswertung keine zuverlässigen Aussagen zuließ.

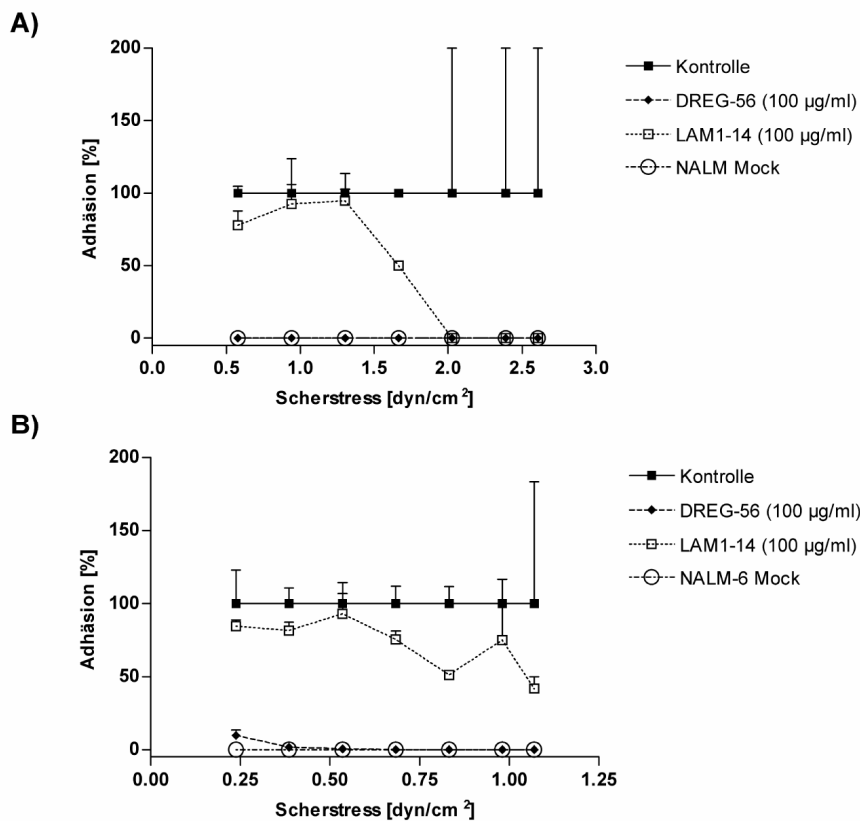


Abb. 38: Hemmung der L-Selektin-vermittelten Adhäsion durch bekannte Inhibitoren.

L-Selektin-transfizierten NALM-6-Zellen wurden 10-15 min vor Versuchsbeginn mit 100 µg/ml des Antikörpers DREG-56 oder LAM1-14 vorinkubiert. In der Flusskammer lag der Scherstress bei einer Flussrate von (A) 116 µl/min zwischen 0,6-2,6 dyn/cm² bzw. bei einer Flussrate von (B) 48 µl/min zwischen 0,2-1,1 dyn/cm². NALM-6-Zellen wurden dem Medium vor Eintritt in die Flusskammer zugesetzt. 5 min nach Versuchsbeginn und unter Beibehaltung der Flussbedingungen wurden die Zellen gezählt, die an den immobilisierten Liganden SiaLe^x-PAA-sTyr gebunden hatten. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von mindestens zwei Messwerten. Kontrolle: Keine Vorinkubation mit Inhibitoren.

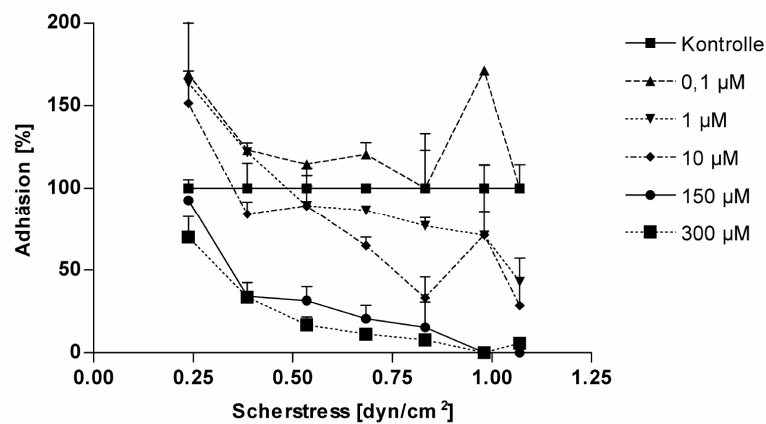


Abb. 39: Hemmung der L-Selektin-vermittelten Adhäsion durch Efomycin M.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Hemmwirkung von Efomycin M auf die Zell-Ligand-Interaktion zwischen L-Selektin-exprimierenden NALM-6-Zellen und dem Ligandenkonjugat SiaLe^x-PAA-sTyr getestet. 10-15 min vor Versuchsbeginn wurden NALM-6-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen des Makrolids Efomycin M inkubiert: 0,1 µM; 1 µM; 10 µM; 150 µM und 300 µM. In der Flusskammer lag der Schersstress bei einer Flussrate von 48 µl/min zwischen 0,2-1,1 dyn/cm². 5 min nach Versuchsbeginn und unter Beibehaltung der Flussbedingungen wurden adhärierende Zellen gezählt, die an den immobilisierten Liganden SiaLe^x-PAA-sTyr gebunden hatten. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von zwei einzelnen Messwerten. Kontrolle: Keine Vorinkubation mit Efomycin M.

In Abbildung 39 ist gezeigt, dass die L-Selektin-abhängige Adhäsion durch Zugabe des potentiellen Selektinliganden Efomycin M konzentrationsabhängig inhibiert werden konnte. Wie bereits im Vorversuch gezeigt, scheint dieser Assayaufbau allerdings ungeeignet für eine Adhäsion der Zellen ab einem Schersstress von 2 dyn/cm². Auf weitere Analysen im Rahmen von Zell-Ligand-Interaktionen wurde daher verzichtet.

3.5 Herstellung von Referenzglykoproteinen für Inhibitionsuntersuchungen (PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG)

Für die Entwicklung effizienter Testsysteme zur Identifizierung neuartiger Liganden/Inhibitoren ist es wichtig, gute Referenzsubstanzen einsetzen zu können. So wie der Einsatz von SiaLe^x-PAA-sTyr als Referenz für die Identifizierung nicht-proteinbasierter L-Selektin-Liganden dienen kann, so sollten für die Identifizierung von Glykoproteinliganden entsprechende Referenzglykoproteine zum Einsatz kommen. Für die Herstellung eines Referenzglykoproteins wurden Informationen über den gut

charakterisierten und allgemein anerkannten Selektinliganden PSGL-1 (Genbezeichnung *selplg*; *GenBank accession number NM_003006*) genutzt. Das N-terminale Selektinbindungsepitop von PSGL-1 wurde C-terminal mit dem Fc-Anteil von humanem IgG (Genbezeichnung *ighg1*; *GenBank accession number J00228*) fusioniert und in einem geeigneten Zellsystem exprimiert.

Das Referenzglykoprotein PSGL-1-IgG wurde dazu verwendet, seine Bindungseigenschaften mit den Bindungseigenschaften eines in der Arbeitsgruppe neu identifizierten L-Selektin-Liganden zu vergleichen. Bei diesem Liganden handelt es sich um das konstitutiv exprimierte ATP-abhängige Chaperon Hsc70 (Genbezeichnung *hsc70*; *GenBank accession number Y00371*). In einem medialen Sequenzabschnitt direkt hinter der ATP-Bindungsdomäne und vor der klassischen substratbindenden Domäne dieses Proteins wurde ein Motiv an der Sequenzposition 279-299 identifiziert, das eine gewisse Ähnlichkeit zum bindungsrelevanten N-terminalen Bindungsmotiv von humanem PSGL-1 aufweist (Abb. 40). Es wurde vermutet, dass über dieses Motiv die Selektinbindung erfolgen könnte und damit ein neues funktionelles Epitop am multifunktionalen Protein Hsc70 identifiziert wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde analog zum PSGL-1-IgG eine Hsc70-IgG-Chimäre mit postuliertem Selektinbindungsmotiv konstruiert und exprimiert. Mit Hilfe von SPR-Bindungsanalysen sollte dann die Bindung der Hsc70-IgG-Chimäre an L-Selektin direkt mit der Bindung der PSGL-1-IgG-Referenzchimäre verglichen werden.

Hsc70: 279 – Q A S I E I D S L Y E G I D F – Y T S I T R – 299
PSGL-1: 42 – Q A T – E – – – – Y E Y L D Y D F L P E T E – 58

Abb. 40: Vergleich eines Hsc70-Sequenzabschnitts mit dem Selektinbindungsepitop von humanem PSGL-1 [Quelle: G. Harms, Dissertationsschrift, 2002].

3.5.1 Klonierung einer humanen PSGL-1-IgG- und einer Hsc70-IgG-Chimäre

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden PCR-Fragmente des Selektinbindungsepitops von PSGL-1 (Tab. 2) und des Sequenzabschnitt von Hsc70, der als Selektinbindungsepitop untersucht werden sollte (Tab. 2), über Subklonierungen in pBluescript II KS(+) (Fermentas, St. Leon-Roth; Vektorkarte siehe Anhang 8.1.4) und pCMV5-IgG (S. Rosen, San Francisco, USA; Vektorkarte siehe Anhang 8.1.5) als IgG-Fusionsfragmente in den Vektor pcDNA3 (Vektorkarte siehe Anhang 8.1.2)

kloniert. Dieser Vektor enthielt ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Geniticin (G-418), welches sich in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit als nicht ausreichend wirksam für die Selektion transfizierter KG1a-Zellen herausstellte. Daher wurden sowohl *hsc70-IgG* als auch *psgl-1-IgG* in den Vektor pcDNA6 (Vektorkarte siehe Anhang 8.1.3) umkloniert. Der Vektor pcDNA6 enthielt ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Blasticidin, welches in geringeren Mengen schnellere Wirkung zeigte.

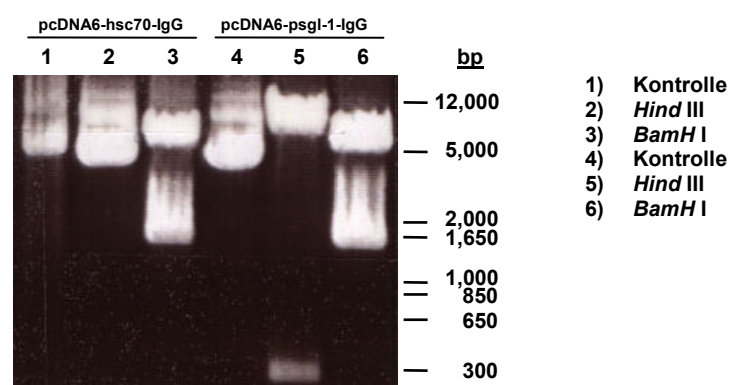


Abb. 41: Restriktionsanalyse zur Insertion der Selektinbindungsmotive von *psgl-1* und *hsc70* in pcDNA6/V5-His B.

Nach Umklonierung von *psgl-1*, *hsc70* und humanem *IgG* aus pcDNA3 in Vektor pcDNA6 erfolgte eine Überprüfung der Insertion mittels Restriktionsverdau. Nach Mini-Präparation wurde die Plasmid-DNA in zwei unabhängigen Ansätzen mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Bam*HI verdaut. Pro Restriktionsverdau wurden 2 µg DNA eingesetzt (Gesamtvolumen 10 µl), für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Probenpuffer vermengt. Danach wurden von jedem Ansatz 3 µl auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Folgende Fragmentgrößen wurden sowohl für *hsc70* (1-3) als auch *psgl-1* (4-6) erwartet: Kontrolle: 6,5 kb; *Hind* III: 250 bp und 6,25 kb; *Bam*HI: 1,4 kb und 5,1 kb.

Der Nachweis der erfolgreichen Klonierung von *psgl-1-IgG* und *hsc70-IgG* in Vektor pcDNA6 ist in Abbildung 41 gezeigt. Die Analyse des Restriktionsverdaus mit *Bam*HI ergab bei beiden Konstrukten eine erfolgreiche Trennung des Vektors (ca. 5,1 kb) von den Fragmenten *psgl-1-IgG* bzw. *hsc70-IgG* (ca. 1,4 kb). Der Restriktionsverdau mit *Hind* III deutete auf einen Verlust der Schnittstelle im *hsc70-IgG*-Konstrukt hin. Das *psgl-1*-Fragment (ca. 250 bp) konnte erfolgreich aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Eine anschließende Sequenzierung bestätigte zum einen die erfolgreiche Insertion beider Fragmente in der richtigen Orientierung ohne weitere Mutation, zum anderen aber auch den Verlust einer *Hind* III-Schnittstelle im *hsc70-IgG*-Konstrukt. Da diese Schnittstelle außerhalb der codierenden Sequenz lag, stellte der Verlust kein Hindernis für eine erfolgreich Expression des Proteins dar.

3.5.2 Entwicklung eines Transfektionsprotokolls für 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.

Daher wurde zunächst ein reproduzierbares Transfektionsprotokoll für diese Zelllinie erarbeitet. Verschiedene Methoden wurden unter Berücksichtigung der Viabilität und Transfektionseffizienz getestet (Tab. 24). Als die letztendlich beste Vorgehensweise erwies sich eine Transfektion über Nukleofektion (Technologie von Amaxa, Köln). Verschiedene Programme und Lösungen wurden bei der Nukleofektion getestet, um die bestmöglichen Voraussetzungen für eine stabile Transfektion zu schaffen. Folgende Bedingungen wurden für eine erfolgreiche Transfektion von KG1a-Zellen ermittelt:

- 5×10^6 Zellen pro Nukleofektion (100 μ l),
- 5 μ g DNA pro Ansatz,
- Programm A23,
- mindestens 3 Ansätze pro Konstrukt (für spätere Vereinigung),
- nach 24 h Mediumwechsel unter Zugabe von Blasticidin (Endkonzentration 5 μ g/ml),
- nach 14 Tagen Vereinigung der zueinander gehörenden Ansätze zu einem Gesamtansatz unter Zugabe proliferierender, nicht-transfizierter Zellen ($1,5 \times 10^7$ Zellen/Gesamtansatz). Dieses wurde durchgeführt, da die erfolgreich transfizierten Zellen zwar vital waren, sich aber in einer Art statischen Phase befanden und nicht mehr proliferierten. Durch Zugabe proliferierender, nicht-transfizierter Zellen konnte die Proliferation der transfizierten Zellen erfolgreich angestoßen werden. Die zugegebenen nicht-transfizierten Zellen starben unter Selektionsdruck innerhalb weniger Tage.

Tabelle 24: Verschiedene Transfektionsversuche zur Erzeugung stabiler KG1a-Transfektanten.

<u>Vektor</u>	<u>Resistenz</u>	<u>Methode</u>	<u>Viabilität (24h)</u>	<u>Effizienz (24h)</u>	<u>Erfolg</u>
pEGFP	Genitacin	Elektroporation (Biorad)	30%	< 1%	Nein
pcDNA3	Genitacin	Elektroporation (Biorad)	30%	-	Nein
pEGFP	Genitacin	jetPEI (Biomol)	100%	0%	Nein
pEGFP	Genitacin	ExGen 500 (Fermentas)	100%	0%	Nein
pEGFP	Genitacin	Ca ²⁺ -Phosphat (Promega)	100%	0%	Nein
pEGFP	Genitacin	Nukleofektion (Amaxa)	80%	10-15%	Nein
pcDNA3	Genitacin	Nukleofektion (Amaxa)	80%	-	Nein
pcDNA6	Blasticidin	Nukleofektion (Amaxa)	80%	-	Ja

3.5.3 Nachweis der Transkription nach stabiler Transfektion

Die stabile Transfektion der Zelllinie KG1a wurde zunächst auf Transkriptionsebene überprüft. Dazu wurde mRNA isoliert (Oligotex mRNA Kit von Qiagen, Hilden) und eine RT-PCR durchgeführt. Der verwendete *Forward-Primer* (*psgl-1* Kozak, Tab. 4) deckte die für beide mRNAs gültige Kozak-Sequenz ab, während der *Reverse-Primer* (*CH3 his rev.*, Tab. 4) an das für beide mRNAs gültige Ende der *IgG*-Fusionssequenz band. Die RT-PCR lieferte erfolgreich amplifizierte cDNA-Fragmente (Abb. 42A). Der Nachweis einer spezifischen *psgl-1-IgG*- und *hsc70-IgG*-Transkription erfolgte in einer weiteren PCR mit für *psgl-1* und *hsc70* sequenzspezifischen Primern (Abb. 42B). Hierfür wurde die cDNA der zuvor durchgeführten RT-PCR verwendet.

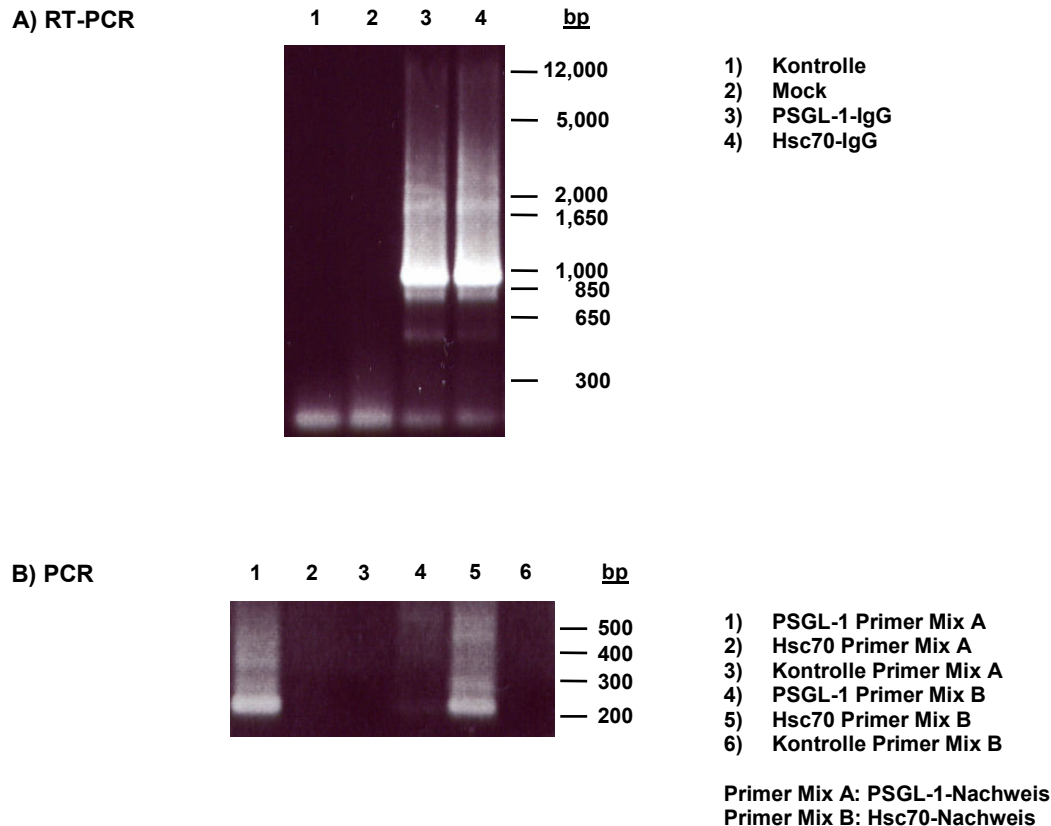


Abb. 42: Transkriptionsnachweis von *psgl-1-IgG* und *hsc70-IgG*.

Mit Hilfe eines RNeasy Midi Kits (Qiagen, Hilden) wurde die cytoplasmatische Gesamt-RNA aus stabil transfizierten KG1a-Zellen isoliert. Die Isolierung wurde gemäß dem Protokoll *RNeasy Midi/Maxi Protocol for Isolation of Cytoplasmatic RNA from Animal Cells (RNeasy Midi/Maxi Handbook, Vers. 06/2001, S. 32-37)* durchgeführt. Die Gesamtzellzahl betrug pro Ansatz $3,5 \times 10^7$ Zellen. Anschließend erfolgte eine Aufarbeitung der mRNA mit Hilfe eines Oligotex mRNA Kits (Qiagen). Diese erfolgte nach dem *Oligotex mRNA Spin-Column Protocol (Oligotex Handbook, Vers. 05/2002, S. 20-22)*. Je 100 ng poly A⁺ mRNA wurden für eine RT-PCR eingesetzt. Als Primer wurden *psgl-1* Kozak und *CH3 his rev.* verwendet (s. 2.2.4.4). Verwendet wurde der One-Step RT-PCR Kit der Firma Qiagen. Das Gesamtvolumen pro RT-PCR-Ansatz betrug 50 µl. (A) Pro Ansatz wurden 6 µl eines RT-PCR-Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die erwartete Größe der Fragmentbande lag bei ca. 950 bp. (B) Die PCR hatte die Unterscheidung zwischen *psgl-1* und *hsc70* zum Ziel. Hierfür wurde die cDNA der RT-PCR genutzt. Für den spezifischen *psgl-1*-Nachweis kamen die Primer *psgl-1* Kozak und *psgl-1 rev.* zum Einsatz, während für den spezifischen *hsc70*-Nachweis die Primer *psgl-1* Kozak und *hsc70 rev.* verwendet wurden (s. 2.2.4.2). Das Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz betrug 50 µl. Davon wurden 6 µl eines PCR-Ansatzes auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Die erwartete Fragmentgröße sowohl für *psgl-1* als auch für *hsc70* betrug 250 bp.

In den stabil transfizierten KG1a-Zellen ließ sich die Transkription der *psgl-1-IgG* und *hsc70-IgG* codierenden Sequenzen erfolgreich nachweisen. Die Generierung stabiler Zelllinien war auf der Transkriptionsebene demnach erfolgreich.

3.5.4 Nachweis der Proteinexpression nach stabiler Transfektion

Der Zellkulturüberstand sowohl nicht transfizierter als auch stabil transfizierter KG1a-Zellen wurde mit Protein A-Sepharose (Bindung des IgG-Anteils der Proteine) inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde anschließend mehrmals mit PBS gewaschen und präzipitiertes Protein mit Glyzin-HCl, pH 2,5 eluiert. Die Eluate wurden direkt in PBS umgepuffert und über Zentrifugation aufkonzentriert. Die Analyse der Kulturüberstände, vor (Abb. 43 I.1) und nach (Abb. 43 I.2) Inkubation mit Protein A-Sepharose, und der konzentrierten Eluate (Abb. 43 I.3) erfolgte mittels SDS-PAGE.

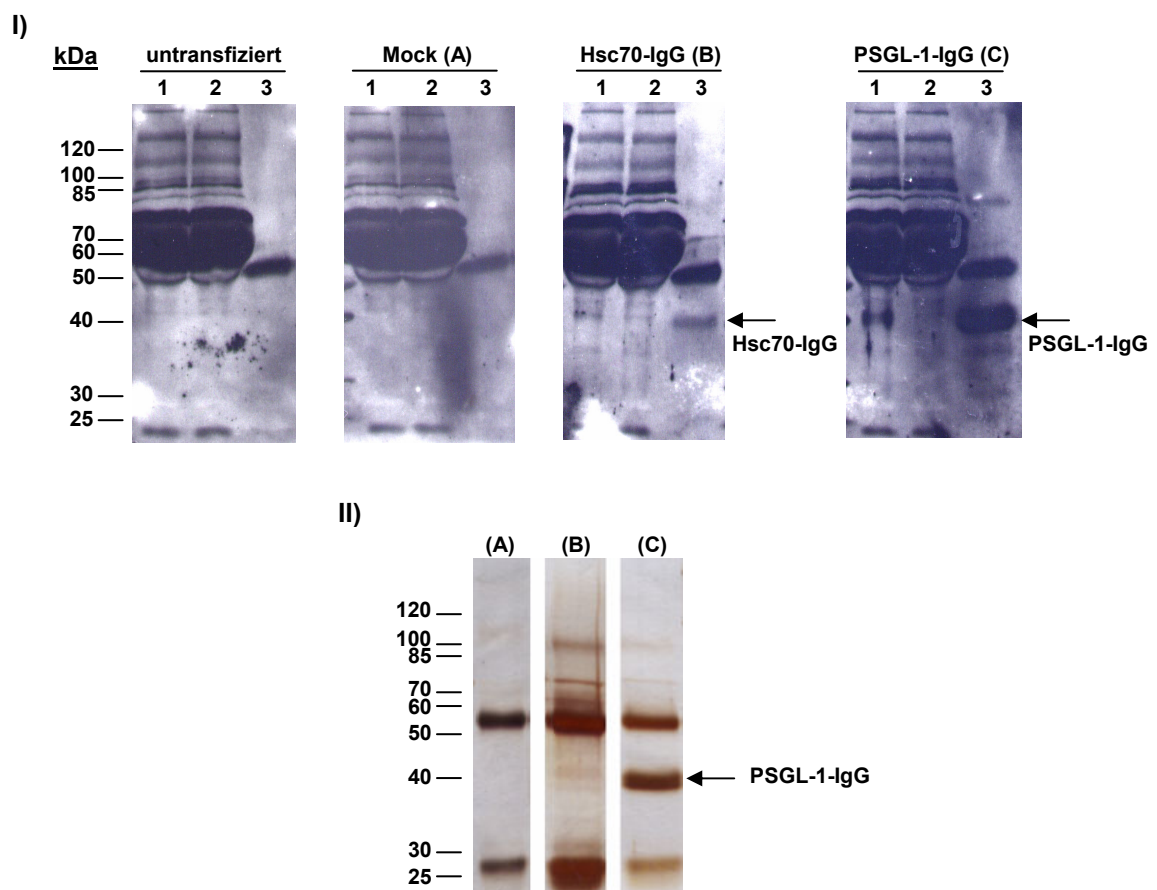


Abb. 43: Expressionsnachweis von Hsc70-IgG und PSGL-1-IgG.

Im Rahmen einer Immunpräzipitation über Protein A-Sepharose konnten sowohl PSGL-1-IgG als auch Hsc70-IgG im Zellkulturüberstand transfizierter KG1a-Zellen nachgewiesen werden. Protein A-Sepharose wurde mit Zellkulturüberstand folgender KG1a-Zelllinien inkubiert: KG1a 'nicht transfiziert', KG1a Mock (A), KG1a Hsc70-IgG (B) und KG1a PSGL-1-IgG (C). Die Elution von Hsc70-IgG und PSGL-1-IgG erfolgte mittels einer pH-Wert-Änderung durch Zugabe von Glyzin-HCl, pH 2,5. Die Eluate wurden in PBS umgepuffert, aufkonzentriert und nach SDS-PAGE (10%ige Polyacrylamidgele) per Western Blot (I) und Silberfärbung (II) analysiert. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit *Goat α-human IgG*, Fc-spezifischen Antikörper (1:500). Die Expositionsdauer des Films betrug 1h.

mit anschließendem Western Blotting (Abb. 43 I) bzw. anschließender Silberfärbung (Abb. 43 II). Die Detektion im Western Blot wurde mit einem α -human IgG, Fc-spezifischen Antikörper durchgeführt.

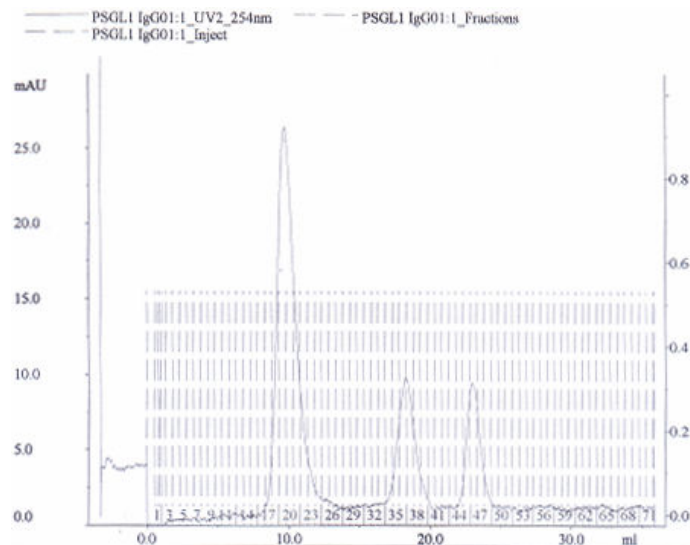
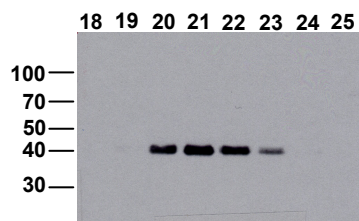
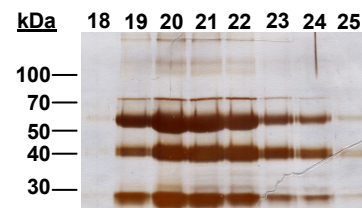
Wie Abbildung 43 zeigt, war die Expression mittels Western Blot sowohl von Hsc70-IgG als auch PSGL-1-IgG nachweisbar (Abb. 43 I(C) + 43 I(B)). Für eine Detektion im Silbergel war die aufgereinigte Proteinmenge von Hsc70-IgG nicht ausreichend (Abb. 43 II(B)). PSGL-1-IgG konnte im Silbergel detektiert werden (Abb. 43 II(C)). Aus Zellkulturüberstand der Negativkontrollen 'KG1a nicht transfiziert' und 'KG1a Mock' konnte erwartungsgemäß kein rekombinant exprimiertes Protein nachgewiesen werden. Die Proteinexpression von Hsc70-IgG und PSGL-1-IgG aus stabil exprimierenden KG1a-Zellen war somit gezeigt.

3.5.5 Reinigung der Eluate

Nach erfolgreichem Nachweis wurden die rekombinanten Proteine in größeren Mengen produziert und mit Hilfe einer affinitätschromatographischen Reinigung über Protein A-Sepharose isoliert und konzentriert. Wie Abbildung 43 zeigt, waren in den Eluaten neben PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG zusätzliche Banden vorhanden. Es wurde angenommen, dass es sich um zusätzlich aufgereinigtes IgG handelt, welches aus dem zum Zellkulturmedium zugesetzten FCS stammte. Dies bestätigten wiederholend Analysen per Silberfärbung und Western Blot mit α -human IgG-Antikörper. Neben Hsc-70-IgG und PSGL-1-IgG mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 40 kDa handelte es sich vor allem um zwei zusätzliche prominente Proteinbanden mit einem apparenten Molekulargewicht von 28 kDa bzw. 55 kDa (Abb. 43). Da die IgG-Verunreinigungen bei den geplanten SPR-Bindungsanalysen hätten stören können, wurde eine Methode gesucht, mit der die rekombinanten Proteine von den IgG-Verunreinigungen getrennt werden können.

3.5.5.1 Gelfiltration

Als erstes wurde eine Gelfiltration mit PSGL-1-IgG-Eluat getestet. Für einen Durchlauf wurde eine mit Superdex 75 gefüllte Säule an eine ÄKTAexplorer-Anlage angeschlossen und das Elutionsprofil der Proteinfractionen aufgezeichnet (Abb. 44).

**A) Western Blot****B) Silbergel****Abb. 44: Gelfiltration – Elutionsprofil und SDS-PAGE-Analyse der Auftrennung.**

Im Rahmen eines Gelfiltrationslaufs wurde eine mit Superdex 75 gefüllte Säule (Durchmesser: 10 mm, Höhe: 30 cm) mit PSGL-1-IgG-Eluat beladen. Das Auftragsvolumen des Eluats betrug 160 μ l und hatte eine Konzentration von 5,6 mg/ml Protein (BCA-Proteinbestimmung). Die Flussrate war während des Laufes auf 0,3 ml/min eingestellt, das Volumen pro gesammelte Fraktion betrug 500 μ l. Mittels SDS-PAGE (10%ige Polyacrylamidgele) folgte die Auftrennung der Proteine: (A) Western Blot-Analyse der Fraktionen 18-25 (pro Fraktion 17,5 μ l Gelauftrag) mit PSGL-1-spezifischem Antikörper (Klon KPL-1, 1:500, Expositionsdauer des Films: 5 min). PSGL-1-IgG war in den Fraktionen 20-23 nachgewiesbar. (B) Silberfärbung der Fraktionen 18-25 (pro Fraktion 17,5 μ l Gelauftrag). Neben der eigentlichen PSGL-1-IgG-Bande waren weiterhin zusätzliche Proteinbanden detektierbar.

Das Elutionsprofil deutete zunächst auf eine erfolgreiche Trennung der drei prominenten Proteinbanden hin. Die Fraktionen 18-25, 35-42 und 45-52 zeichnen drei nacheinander folgende, klar voneinander getrennte Elutionspeaks. Eine anschließende Untersuchung per Western Blot und Silberfärbung zeigte

hingegen, dass keine Trennung erfolgt war. Der Größe entsprechend wurde PSGL-1-IgG im zweiten Elutionspeak des Profils erwartet. Sowohl PSGL-1-IgG als auch IgG-Verunreinigungen wurden jedoch mit dem ersten Peak (Fraktion 18-25) eluiert.

3.5.5.2 Affinitätschromatographischer Reinigungsversuch über L-Selektin-IgG

Als weitere Möglichkeit wurde eine affinitätschromatographische Reinigung über L-Selektin getestet. Bei erfolgreicher Reinigung hätte dies gleichzeitig den Nachweis der Interaktion von PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG mit L-Selektin-IgG und für deren

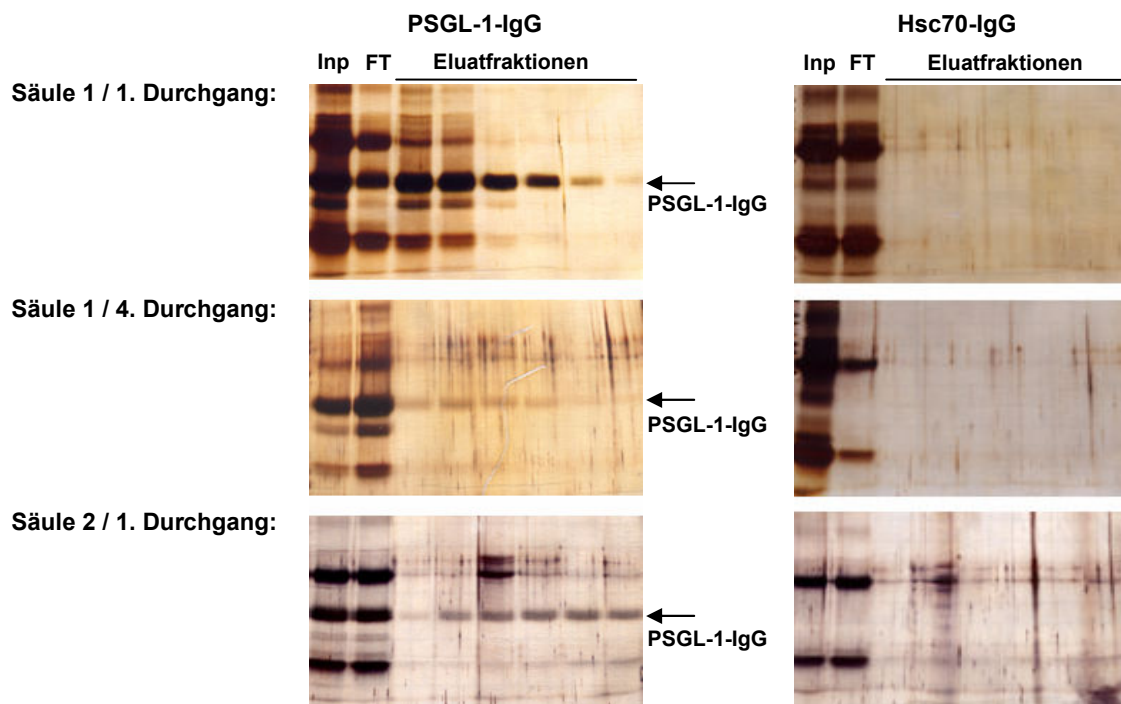


Abb. 45: Affinitätschromatographischer Reinigungsversuch über L-Selektin-IgG.

Im Rahmen eines affinitätschromatographischen Reinigungsversuchs erfolgte zunächst die Immobilisierung von rekombinantem L-Selektin-IgG an eine *CarboLink* Gelmatrix (Pierce Biotechnology, USA). Anschließend wurde in mehreren Durchgängen PSGL-1-IgG- bzw. Hsc70-IgG-Eluat (aus der affinitätschromatographischen Isolierung mittels Protein A-Sepharose) über die L-Selektin-Säule geschickt. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 50 mM EDTA. Die Eluate wurden fraktioniert (je 500 µl). Aufgrund einer proteolytischen Inaktivierung des L-Selektins war nur eine begrenzte Anzahl an Durchläufen möglich. Nach insgesamt acht Durchgängen (4x PSGL-1-IgG + 4x Hsc70-IgG) erfolgte die Immobilisierung von L-Selektin-IgG an eine neue *CarboLink* Gelmatrix. Die Reinigungsversuche wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Die ersten beiden Spuren der Gelaufräge kennzeichnen den Auftrag vor einem Säulendurchlauf (Inp = *Input*) und den Durchlauf der L-Selektin-Säule (FT = *Flow Through*).

Funktionalität bedeutet. L-Selektin-IgG aus der myeloischen Zelllinie K-562 wurde zunächst über die chemische Modifikation von Zuckerstrukturen an eine *CarboLink* Gelmatrix (Pierce Biotechnology, USA) immobilisiert. Anschließend wurde versucht, Hsc70-IgG- und PSGL-1-IgG-Eluat affinitätschromatographisch zu reinigen.

Wie Abbildung 45 zeigt, hatte PSGL-1-IgG an immobilisiertes L-Selektin-IgG gebunden. Eine Trennung des PSGL-1-IgG von den IgG-Nebenbanden war somit möglich. Entsprechendes konnte für Hsc70-IgG nicht gezeigt werden. Die Proteinmengen von Hsc70-IgG lagen vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze. Zudem sank die biologische Aktivität des an die Matrix immobilisierten L-Selektin-IgG sehr schnell. Die Matrix war nur für wenige Durchläufe einsetzbar. Dieser methodische Ansatz stellte daher keine ausreichende Alternative dar.

3.5.5.3 Affinitätschromatographischer Reinigungsversuch über α -Rind IgG, $F(ab')_2$ -spezifischen Antikörper

Eine weitere Möglichkeit bestand in dem Versuch einer affinitätschromatographischen Reinigung durch die Verwendung eines α -Rind IgG, $F(ab')_2$ -spezifischen Antikörpers. Da Hsc70-IgG und PSGL-1-IgG als Fusionsproteine den *Fc*-Anteil des humanen IgG besaßen, sollten Kreuzreaktionen mit α -Rind *Fab*- oder $F(ab')_2$ -spezifischen Antikörpern ausgeschlossen sein. In einem solchen Ansatz wurde erwartet, dass die aus dem FCS stammenden Immunglobuline durch α -Rind IgG, $F(ab')_2$ -spezifischen Antikörper gebunden werden, während Hsc70-IgG bzw. PSGL-1-IgG sich im Durchlauf wiederfinden. Analog zu den Versuchen in 3.5.5.2 wurde eine *CarboLink* Gelmatrix (Pierce Biotechnology, USA) verwendet, um den α -Rind IgG, $F(ab')_2$ -spezifischen Antikörper zu immobilisieren und anschließend für einen affinitätschromatographischen Reinigungsversuch einzusetzen.

Wie Abbildung 46 zeigt, ließen sich die IgG-Nebenbanden gut vom PSGL-1-IgG trennen. Da für eine einmalige Aufreinigung die Kapazität der Säule nicht ausreichend war, mussten mehrere Durchläufe durchgeführt werden, um PSGL-1-IgG ausreichend zu säubern (insgesamt fünf Durchläufe). Die IgG-Nebenbanden im Hsc70-IgG-Eluat hatten ebenfalls gut gebunden. Hsc70-IgG war im Zellkulturüberstand allerdings nur als schwache Proteinbande nachweisbar. Es wurde erwartet, dass die Hsc70-IgG repräsentierende Proteinbande nach mehreren Durchläufen stärker werden würde. Vor jedem Gelauftrag wurden die Proteinkonzentrationen mittels Absorptionmessungen bei 280 nm abgeschätzt, um für jeden Durchlauf ungefähr

Ergebnisse

gleiche Ausgangsbedingungen gewährleisten zu können. Die Hsc70-IgG-Proteinbande blieb jedoch kaum nachweisbar. Auf eine Analyse per Western Blot wurde verzichtet, um den Probenverbrauch für weiterführende Bindungsanalysen mittels SPR so gering wie möglich zu halten.

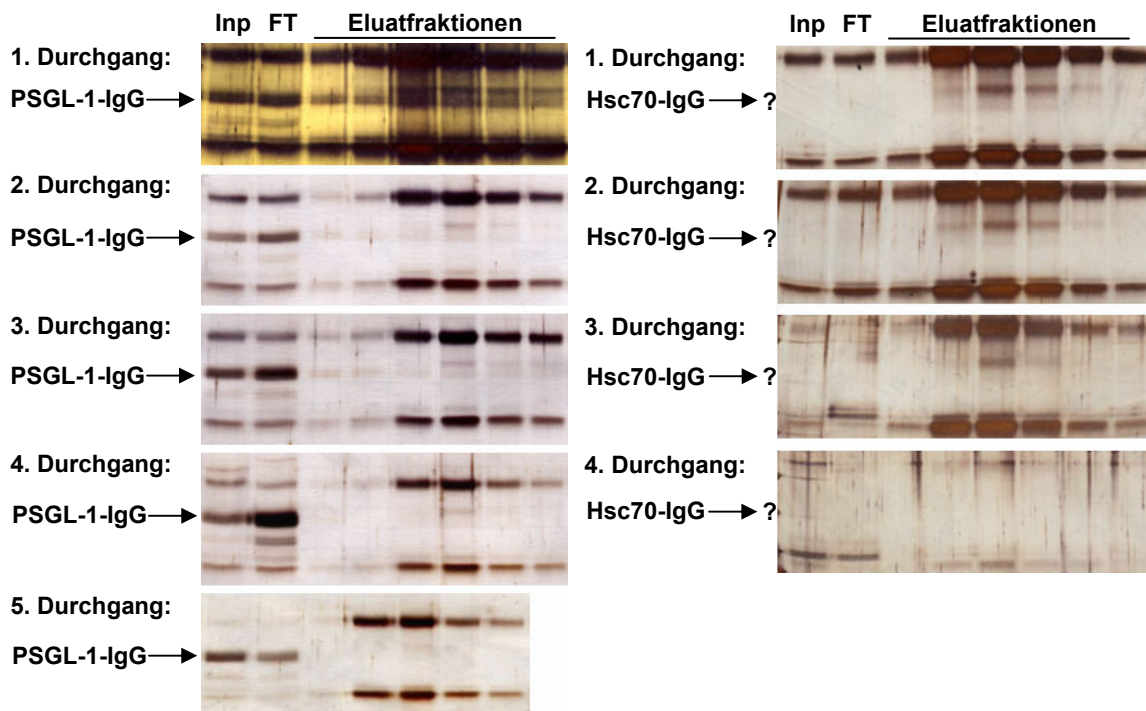


Abb. 46: Affinitätschromatographischer Reinigungsversuch über α -Rind IgG, $F(ab')_2$ -spezifischen Antikörper.

Im Rahmen dieses affinitätschromatographischen Reinigungsversuchs erfolgte die Immobilisierung von α -Rind IgG, $F(ab')_2$ -spezifischen Antikörper an eine *CarboLink* Gelmatrix (Pierce Biotechnology, USA). In mehreren Durchläufen wurde PSGL-1-IgG- bzw. Hsc70-IgG-Eluat (aus der affinitätschromatographischen Isolierung mittels Protein A-Sepharose) über frisch präparierte Antikörpersäulen gegeben. Die Elution erfolgte mittels pH-Wert-Änderung durch Zugabe von 50 mM Glyzin-HCl, pH 2,5. Die Eluate wurden fraktioniert (je 500 μ l). Es folgten insgesamt fünf Reinigungsdurchgänge für PSGL-1-IgG bzw. vier Reinigungsdurchläufe für Hsc70-IgG. Die Durchgänge wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Die ersten beiden Spuren der Geläufträge kennzeichnen den Auftrag vor einem Säulendurchlauf (Inp = *Input*) und den Durchlauf der Antikörpersäule (FT = *Flow Through*). Die nächsten Spuren zeigen die Eluatfraktionen E9 - E14.

Hiemit war eine Methode gefunden, um Immunglobuline aus FCS des Zellkulturmediums, die bei einer Isolierung von rekombinantem Protein über Protein A-Sepharose mitisoliert werden, vom rekombinanten Protein wieder zu trennen. Voraussetzung für dieses Vorgehen sind allerdings ausreichende Proteinmengen.

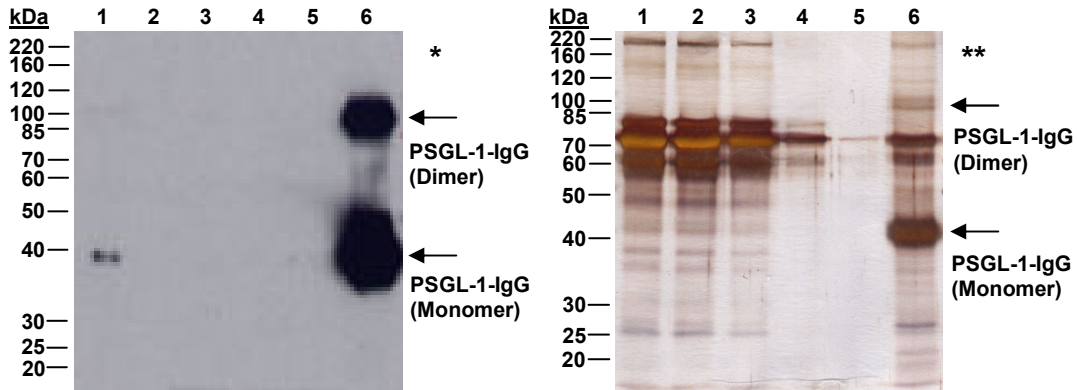
PSGL-1-IgG war nach der Reinigung in Gegensatz zu Hsc70-IgG für Untersuchungen mittels SPR einsetzbar. Alternativ wurde allerdings nach einer Möglichkeit gesucht, die IgG-Nebenbanden während einer Expression im Vorhinein zu vermeiden, um auch bei schwächerer Proteinexpression ein vergleichsweise sauberes Eluat zu erhalten.

3.5.6 Proteinexpression mit *Ultra Low IgG FCS*

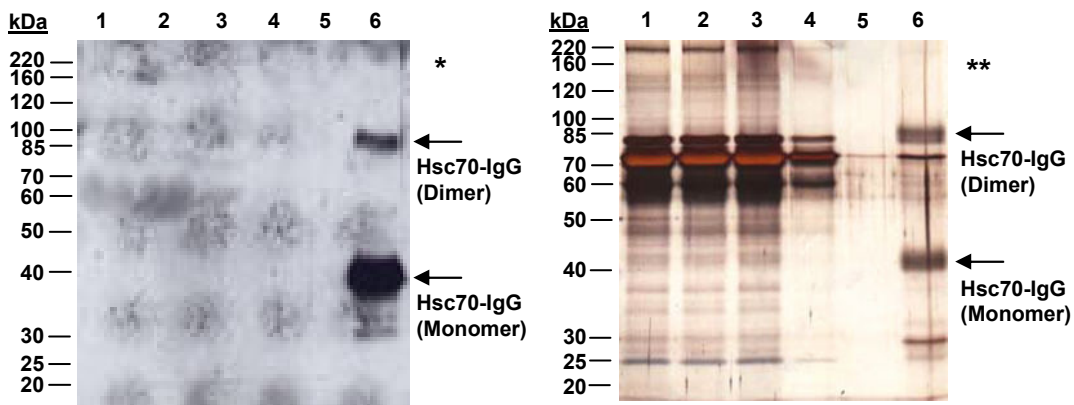
Die rekombinante Proteinexpression in eukaryontischen Zellsystemen erfolgt in Zellkulturmedium zumeist in Gegenwart von fötalem Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*). Ein natürlicher Bestandteil des FCS sind Immunglobuline. Bei einer affinitätschromatographischen Aufreinigung von rekombinantem Protein über Protein A werden insbesondere IgG-Bestandteile des Serums mit isoliert. Diese IgG-Bestandteile können für weiterführende Analysen hinderlich sein. In 3.5.5 wurde deshalb versucht, über verschiedene Wege ungewünschte IgG-Nebenbanden zu beseitigen. Ein kritischer Punkt ist allerdings die Menge an rekombinantem Protein. Ist die Ausbeute an rekombinantem Protein nur gering, so ist die Gefahr eines Totalverlustes während weiterer Reinigungsprozeduren groß.

Neben handelsüblichem FCS werden kommerziell auch Chargen angeboten, die nach Vorbehandlung einen besonders geringen Anteil an Immunglobulinen versprechen (*Ultra Low IgG FCS*). Ein solches FCS wurde für die Expression von PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 47 gezeigt. In den Eluaten waren nach affinitätschromatographischer Aufreinigung über Protein A nur noch sehr wenig IgG-Nebenbanden erkennen. Im Vergleich zu Hsc70-IgG und PSGL-1-IgG, sowohl monovalente als auch divalente Form, taten sich nur noch wenige Nebenbanden hervor. Eine etwas stärkere Nebenbande repräsentierte Serumalbumin (ca. 72 kDa), welches für nachfolgende Experimente kein Hindernis darstellte. Somit war eine Möglichkeit gefunden, um ausreichende Mengen Hsc70-IgG ohne störende Verunreinigungen zu produzieren. Die Eluate wurden für einen angestrebten Bindungstest mittels SPR für ausreichend sauber befunden.

A) PSGL-1-IgG



B) Hsc70-IgG



* Western Blot
** Silbergel

Abb. 47: Expression von Hsc70-IgG und PSGL-1-IgG in Gegenwart von *Ultra Low* IgG FCS.

Die Expression von Hsc70-IgG und PSGL-1-IgG erfolgte in Gegenwart von 10% *Ultra Low* IgG FCS im Zellkulturmedium. Die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte mittels Protein A-Sepharose. Die Aufreinigungen wurden nach SDS-PAGE (10%ige Polyacrylamidgele) per Western Blot und Silberfärbung analysiert. (A) Hsc70-IgG-Aufreinigung. Die Elution des Proteins von der Protein A-Sepharose erfolgte durch Zugabe von 4 M $MgCl_2$. (B) PSGL-1-IgG Aufreinigung. Die Elution des Proteins von der Protein A-Sepharose erfolgte über eine pH-Wert-Änderung durch Zugabe von 50 mM Glyzin-HCl, pH 2,5. Anschließend wurden beide isolierten Proteine in PBS umgepuffert und aufkonzentriert. Es folgten die Analysen per Western Blot und Silberfärbung. Auftragsreihenfolge: 1 = Zellkulturmedium; 2 = Durchlauf der Protein A-Sepharose-Säule; 3 - 5 = Wasch 1 - Wasch 3; 6 = Eluat. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit dem PSGL-1-spezifischen Antikörper KPL-1 (A) bzw. mit *Goat α -human IgG, Fc*-spezifischem Antikörper (B). Die Expositionsdauer der Filme betrug 30 s (A) bzw. 2 min (B).

3.5.7 SPR-Bindungsanalyse

Im Rahmen von Affinitätschromatographischen Reinigungsversuchen (s. 3.5.5) konnte eine biologische Bindungsaktivität von PSGL-1-IgG an L-Selektin bereits gezeigt werden. Für Hsc70-IgG konnte gleiches bis dahin nicht gezeigt werden. Eine mögliche Wechselwirkung der Hsc70-IgG-Chimäre mit L-Selektin sollte daher im Rahmen einer SPR-Bindungsanalyse erfolgen. PSGL-1-IgG wurde hierbei als Referenzprotein eingesetzt. Im Rahmen der SPR-Bindungsanalysen war die Immobilisierung von L-Selektin-IgG auf der Oberfläche eines Sensor Chip SA geplant, und PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG sollten anschließend in Lösung über den Sensor Chip gegeben werden.

Die Immobilisierung von L-Selektin-IgG auf einem Sensor Chip SA war indirekt über eine vorgeschaltete Kopplung eines biotinylierten Anti-*Fcγ*-spezifischen Antikörpers denkbar oder wäre nach einer Biotinylierung des L-Selektins direkt möglich. Für die Bindungsanalysen war wichtig, dass die Bindungsregion der Lektindomäne des L-Selektins unbeeinflusst und zugänglich bleibt. Dies wäre beim indirekten Verfahren durch die gerichtete Bindung des IgG-Fusionsanteils der L-Selektin-IgG-Chimäre der Fall gewesen. Der Nachteil am indirekten Aufbau wäre allerdings, dass bei jeder Regeneration des Sensor Chips auch Antikörper-L-Selektin-Bindungen gelöst werden und Nachfolgemessungen nicht mehr unter den exakt gleichen Voraussetzungen stattfinden würden.

Daher wurde L-Selektin-IgG nach einer gezielten Biotinylierung direkt auf der Chipoberfläche immobilisiert. Um nicht die Zugänglichkeit der Bindungsregion für Liganden zu blockieren, wurde eine gezielte Biotinylierung der *Hinge*-Region des IgG-Fusionsanteils der L-Selektin-IgG-Chimäre durchgeführt. Die Biotinylierung war irreversibel und sollte keinen Einfluss auf die biologische Funktionalität der Chimäre haben. Eine selektive Trennung der Disulfidbrücken der *Hinge*-Region erfolgte unter Verwendung des milden Reduktionsmittels 2-Mercaptoethylamin-HCl. Anschließend erfolgte eine gezielte Kopplung von Maleimid PEO₂-Biotin an freie SH-Gruppen.

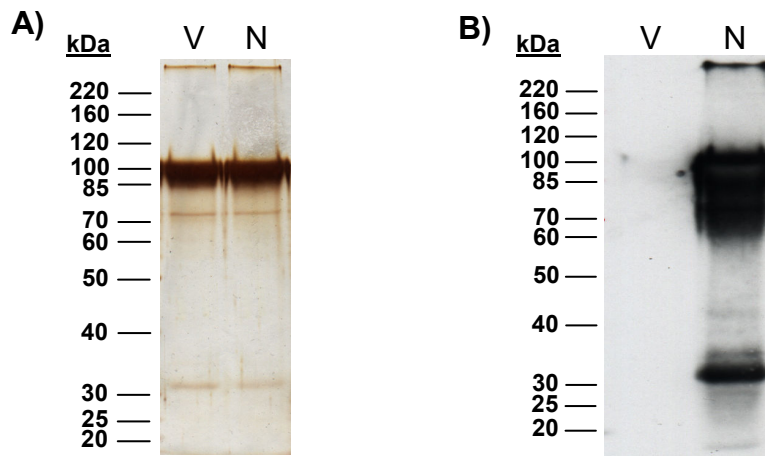


Abb. 48: Biotinylierung von L-Selektin-IgG.

Disulfidbrückenbindungen der L-Selektin-IgG-Chimäre (10 mg/ml) wurden mit 2-Mercaptoethylamin-HCl (Pierce, Rockford, IL, USA) in PBS-EDTA (50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,2) gelöst. Anschließend wurde reduziertes L-Selektin-IgG (200 µg/ml) durch Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur mit 100 µl EZ-Link Maleimid PEO₂-Biotin (Pierce) biotinyliert. Nicht reaktives Maleimid PEO₂-Biotin wurde durch Entsalzung entfernt. Es folgte eine Auftrennung der Proben in 10%igen Polyacrylamidgelen mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (A) und Western Blot-Analyse (B). Die aufgetragene Proteinmengen pro Spur betragen im Sibergel wie auch im Western Blot 1 µg (V = vor der Biotinylierung; N = nach der Biotinylierung). Die Detektion im Western Blot erfolgte mit Extravidin-Peroxidase (Sigma, 1:2000). Die Expositionsdauer des Films betrug 2 min.

Wie in Abbildung 48 gezeigt, konnte L-Selektin-IgG erfolgreich biotinyliert werden. In der Silberfärbung waren nach Reduktions- und Biotinylierungsprozedur keine Veränderungen im Bandenmuster zu erkennen. Der Western Blot bestätigte die erfolgreiche Biotinylierung des Proteins.

Um sicherzustellen, dass nur funktionell einwandfreies L-Selektin-IgG auf dem Sensor Chip immobilisiert wird, wurde das biotinylierte L-Selektin-IgG zuvor über eine mit SiaLe^x und Tyrosinsulfaten ausgestattete Ligandenaffinitätsmatrix gegeben. Biologisch aktives L-Selektin-IgG sollte an die Matrix binden und anschließend von dieser mit EDTA eluierbar und für die SPR-Bindungsanalysen einsetzbar sein (Abb. 49).

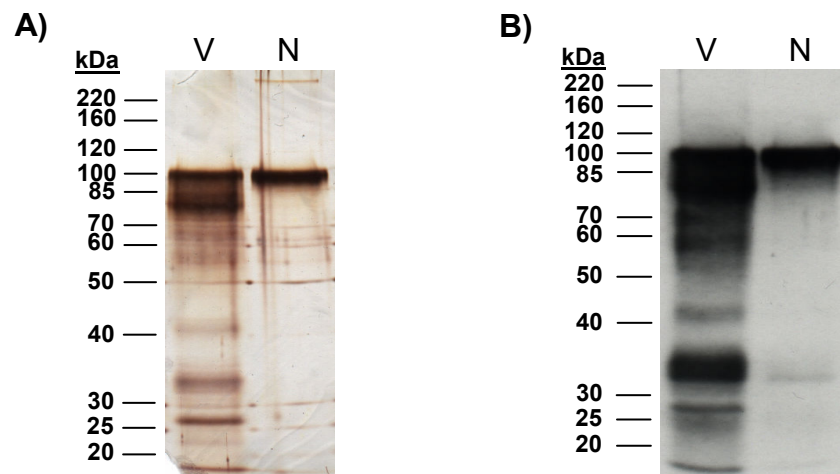


Abb. 49: Überprüfung der Funktionalität von L-Selektin-IgG nach Biotinylierung.

Die Funktionalität von biotinyliertem L-Selektin-IgG wurde mit Hilfe einer affinitätschromatographischen Testbindung an den Minimalliganden SiaLe^x und Tyrosinsulfat (Lectinity, Moskau, Russland) überprüft. Die Elution erfolgte mit 50 mM EDTA. Der Säulenauftrag und der Säulendurchlauf wurden in 10%igen Polyacrylamidgelen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit anschließender Silberfärbung (A) und Western Blot-Analysen (B) überprüft. Pro Spur betrug die eingesetzte Proteinmenge im Silbergel 500 ng bzw. 250 ng im Western Blot (V = vor der Biotinylierung; N = nach der Biotinylierung). Die Detektion im Western Blot erfolgte mit Extravidin-Peroxidase (Sigma, 1:2000). Die Expositionsdauer des Films betrug 30 s.

Wie Abbildung 49 zeigt, war sowohl in der Silberfärbung als auch im Western Blot funktionelles und biotinyliertes L-Selektin-IgG nachweisbar. Im Säulendurchlauf konnte eine distinkte, 90 - 100 kDa große Proteinbande detektiert werden, die biotinyliertes L-Selektin-IgG repräsentierte. Im Säulenauftrag waren zusätzlich biotinylierte Proteinbanden nachweisbar. Diese Proteinbanden kennzeichneten entweder biotinyliertes, nicht-bindungsaktives L-Selektin oder weitere biotinylierte Proteine, die mit der Aufreinigung über Protein A-Sepharose angereichert wurden.

Mit der erfolgreich biotinylierten und funktionellen L-Selektin-IgG-Chimäre erfolgte die direkte Immobilisierung auf einem Sensor Chip SA. Vor Beginn der Messungen wurden die Bindungswalenzen von PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG durch Vorinkubation mit Protein A-beschichtete Goldnanopartikel erhöht. Anschließend folgten die Messungen.

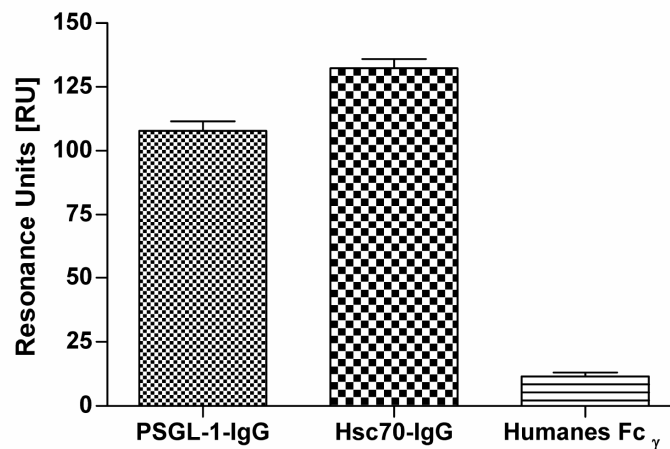


Abb. 50: Bindung von PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG an L-Selektin-IgG.

Im Rahmen eines Bindungstests mittels SPR wurde die direkte Bindung des potentiellen L-Selektin-Bindungsmotivs von Hsc70 (Aminosäure 279-299) an L-Selektin-IgG getestet. SPR ermöglicht die Analyse der Bildung von Komplexen und dessen Dissoziationsvorgänge in Echtzeit. Bei diesen Messungen erfolgte zuerst die Immobilisierung von biotinyliertem L-Selektin-IgG auf der Oberfläche eines mit Streptavidin vorbeschichteten Sensor Chips (Sensor Chip SA, Biacore AB). Anschließend erfolgte die Bindung der Hsc70-IgG-Chimäre. Das L- und P-Selektin-Bindungsepitop von PSGL-1-IgG wurde als Referenzpeptid gemessen. Humanes *Fc γ* wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Messungen erfolgten unter Flussbedingungen bei 30 μ l/min. Ein Vergleich der Bindung des PSGL-1-Peptids mit der des Hsc70-Peptids ergab ein ähnlich starkes Bindungssignal. Das absolute Bindungssignal von PSGL-1-IgG lag bei 108 *Resonance Units* (RU) bzw. 132 RU für Hsc70-IgG. Unspezifische Bindungen des humanen *Fc γ* ergaben ein mehr als zehnmal schwächeres Bindungssignal (11 RU). Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert ($\pm \sigma_M$) von vier einzelnen Messwerten.

Wie in Abbildung 50 zu sehen, zeigten PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG vergleichbare Bindungsaktivität. Beide Proteine hatten mit einer Signalstärke von 100 RU und mehr an immobilisiertes L-Selektin gebunden, während Kontrollmessungen mit multivalentem humanen *Fc γ* eine mehr als neunmal schwächere Bindung ergaben. Hiermit konnte zum einen gezeigt werden, dass das entwickelte Vorgehen im Rahmen eines SPR-Bindungsassays für die Bindungsanalyse von L-Selektin-Liganden auf Proteinbasis geeignet ist, zum anderen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der gewählte Sequenzabschnitt von Hsc70 tatsächlich L-Selektin bindet. Dieses Ergebnis lieferte einen deutlichen Hinweis, dass die identifizierte Sequenz tatsächlich ein physiologisches Bindungsmotiv von L-Selektin darstellen könnte.