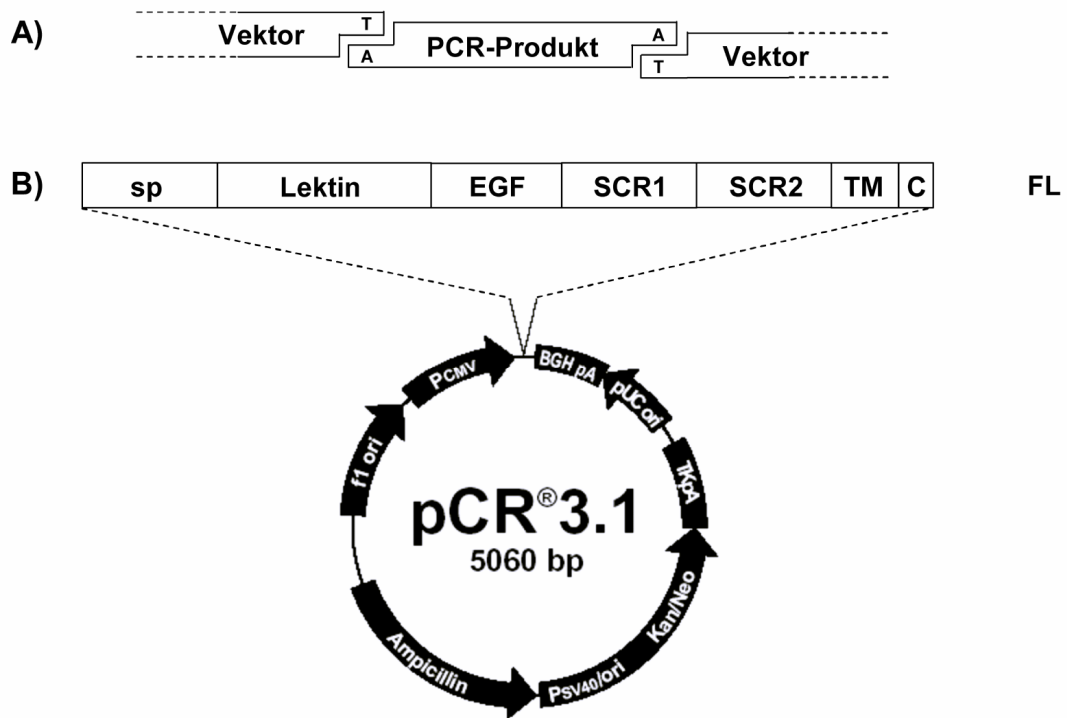


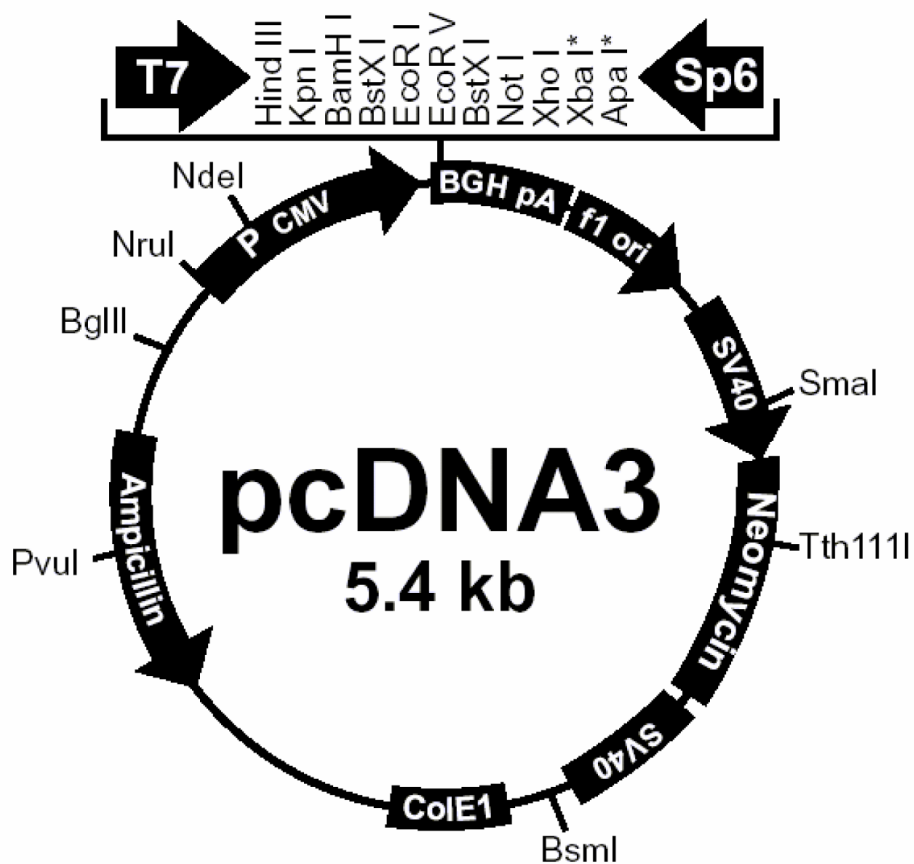
8 Anhang

8.1 Vektorkarten



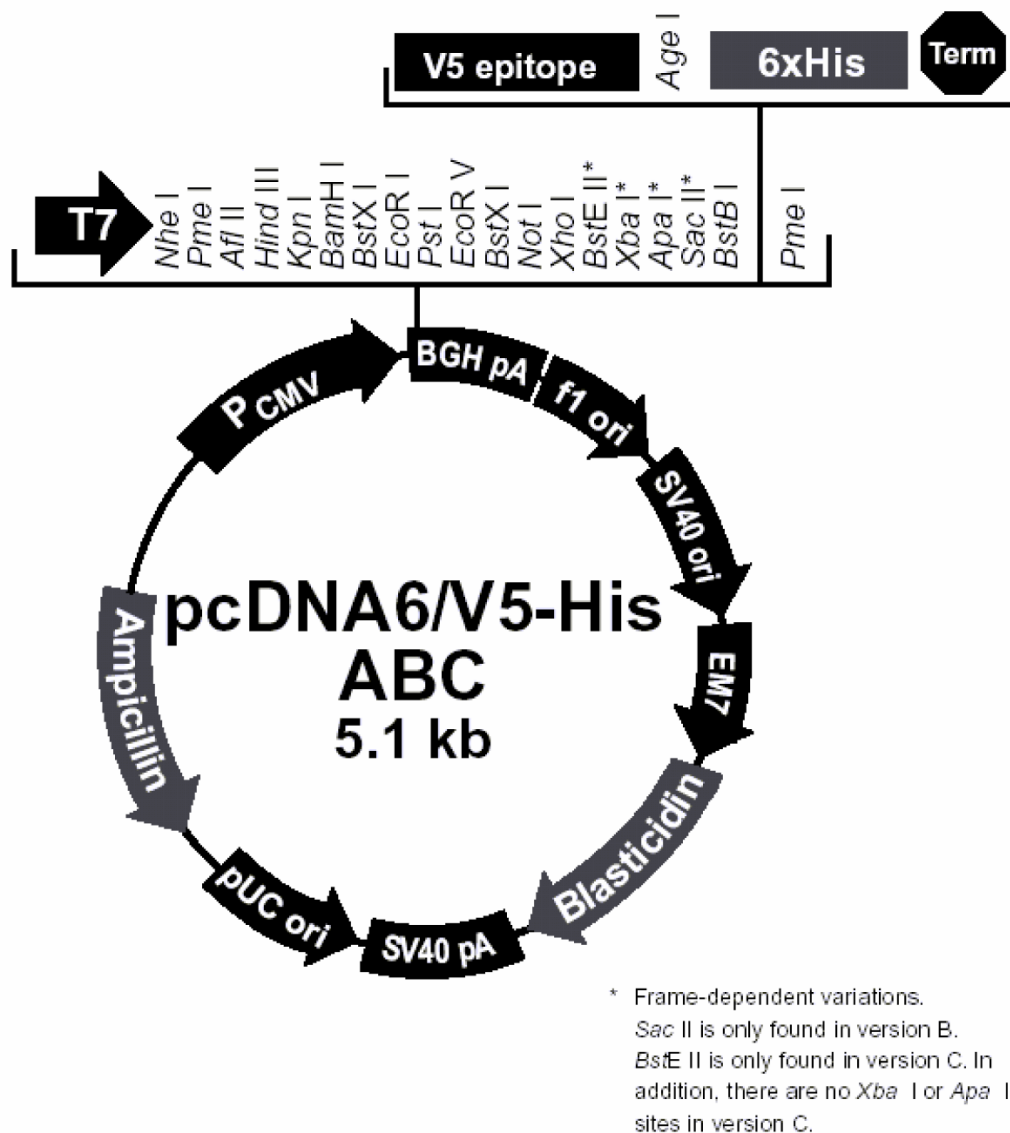
Anhang 8.1.1: Vektorkarte pCR3.1-FL (C. Fieger, Berlin, 1997)

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde mittels PCR eine cDNA generiert, die den gesamten kodierenden Bereich von L-Selektin enthielt (FL für „full length L-selectin“) und über Desoxy-Thymidin/Desoxy-Adenosin Basenpaarung in die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors pCR3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) eingebracht wurde [C. Fieger, Dissertationsschrift 1997]. Bei der PCR werden DNA-Fragmente durch die Taq-Polymerase mit 3'-Adenosin Überhänge versehen. Der Vektor verfügt in linearer Form über entsprechende 3'-Thymidin Überhänge. Die cDNA-Abschnitte sind vereinfacht durch die Proteindomänen dargestellt, für die sie kodieren. Domänenbezeichnung: Signalpeptid (sp); calciumabhängige Lektin-Bindungsdomäne (Lektin); EGF-Domäne (EGF); Short Consensus Repeats (SCR1 + SCR2); transmembranärer Bereich (TM); cytoplasmatischer Abschnitt (C). Die Expression in Vektor pCR3.1 steht unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors. Zur Selektion in Prokaryonten trägt der Vektor ein Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen, zur Selektion in Eukaryonten ein Neomycin-Resistenzgen. Am 5'-Ende der MCS besitzt der Vektor einen T7-Promotor.



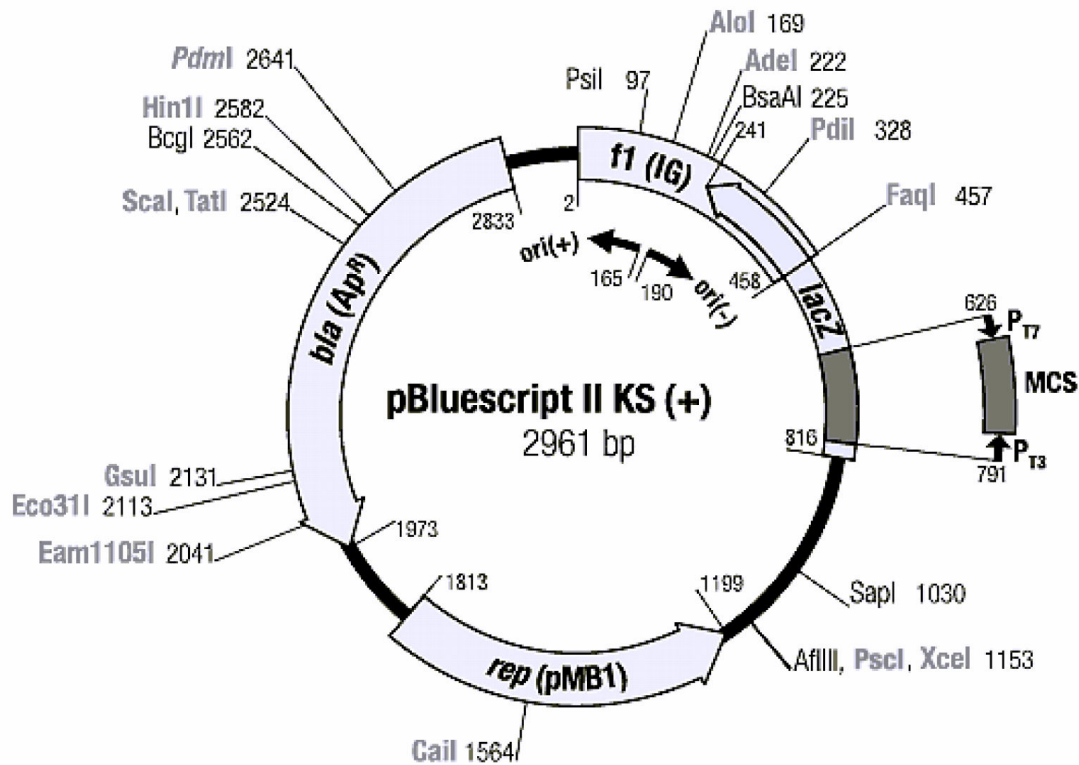
Anhang 8.1.2: Vektorkarte pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe)

pcDNA3 ist ein eukaryontisches Expressionsplasmid unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors. Der Vektor kodiert für Resistenzen gegen Ampicillin (für prokaryontische Selektion) und Neomycin (für eukaryontische Selektion) und hat einen SV40-Replikationsursprung. Am 5'-Ende der *Multiple Cloning Site* besitzt der Vektor einen T7-Promotor.



Anhang 8.1.3: Vektorkarte pcDNA6/V5-His (Invitrogen, Karlsruhe)

pcDNA6/V5-His ist ein eukaryontisches Expressionsplasmid unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors. Der Vektor kodiert für Resistenzen gegen Ampicillin (für prokaryontische Selektion) und Blastidicin (für eukaryontische Selektion) und einen SV40-Replikationsursprung. Am 5'-Ende der *Multiple Cloning Site* besitzt der Vektor einen T7-Promotor und am 3'-Ende kodierende Sequenzen für ein V5- und Polyhistidin-Epitop. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Variante pcDNA6/V5-His B besitzt eine zusätzliche Sac II-Schnittstelle.



Multiple Cloning Site (MCS):

M13pUC sequencing primer (20, 17-mer) T7 promoter T7 transcription start

5' G TAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT
 3' C ATT TTG CTC CCG GTC ACT TAA CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC CCT TAA
 LacZ ← Val Val Ala Leu Ser Asn Tyr Tyr Ser Glu Ser Tyr Pro Ser Asn

BglI Cln42I Eco52I HincII Sall XmlI XhoI Eco0109I Acp65I KpnI 760

653 SnaI NotI XbaI BclI BamHI SmaI PstI EcoRI Eco32I HindIII Bsu15I Sall XmlI XhoI AclI Bsp120I KpnI 760

gGA GCT CCA CCG CGG TGG CCG CCG CTC TAG AAC TAG TGG ATC CCC CGG GCT GCA GGA ATT CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CGT CGA CCT CGA GGG GGG GCC CGG TAC CCA
 CCT CGA GGT GGC GCC ACC GCC GGC GAG ATC TTG ATC ACC TAG GGG GCC CGA CGT CCT TAA GCT ATA GTT CGA ATA GCT ATG GCA GCT GGA GCT CCC CCC GCC GGC ATG GGT
 Ser Ser Trp Arg Pro Pro Pro Arg Glu Leu Val Leu Pro Asp Gly Pro Ser Cys Ser Asn Ser Ile Leu Ser Ile Ser Val Thr Ser Arg Ser Pro Pro Gly Pro Val Trp

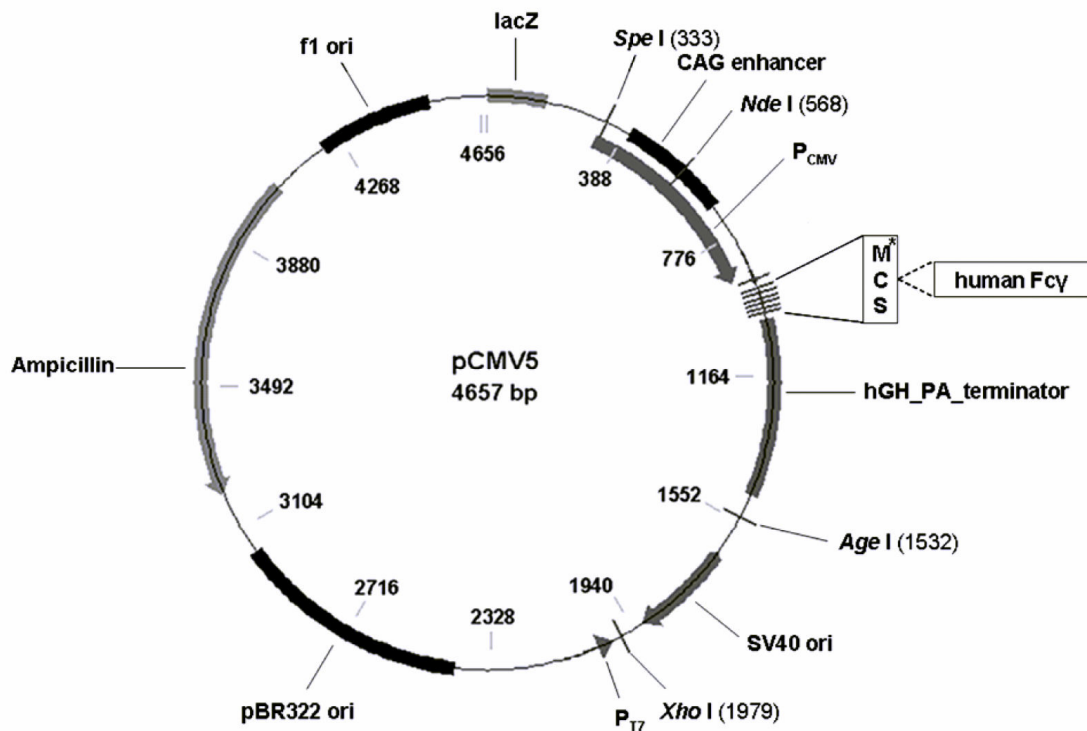
GCT TTT GTT CCC TTT AGT GAG GGT TAA TTG CGC GCT TGG COT AAT CAT GGT CAT AGC TGT TTC CTG 3'
 CGA AAA CAA GGG AAA TCA CTC CCA ATT AAC GCG CGA ACC GCA TTA GTA CCA GYA TCG ACA AAG GAC 5'

[†]T3 transcription start T3 promoter M13pUC reverse sequencing primer (20, 17-mer)

Ser Lys Asn Gly Lys Thr Leu Thr Leu Glu Ser Ser Pro Thr Ile Met Thr Met

Anhang 8.1.4: Vektorkarte pBluescript II KS (+) (Stratagene, Amsterdam)

pBluescript II KS (+) ist ein Vektor, der sich sehr gut zur Klonierung, Sequenzierung und Amplifizierung verschiedener DNA's eignet. Dieser Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen und besitzt eine *Multiple Cloning Site* (MCS) innerhalb des *lacZ*-Gens. KS repräsentiert eine Orientierung der MCS, in der die *lacZ*-Transkription von *Kpn* I nach *Sac* I erfolgt. Das Symbol (+) beschreibt diejenige von zwei möglichen Orientierungen der *f1 intergenic* (IG) region, die die Herstellung von Einzelstrang-DNA erlaubt. Am 5'-Ende der *Multiple Cloning Site* besitzt der Vektor einen T7-Promotor.



***Multiple Cloning Site (MCS):**
Sac I (902), *EcoR* I (920), *Bgl* II (926),
Kpn I (936), *Cla* I (945), *Hind* III (950),
Pst I (966), *Sal* I (968), *Xba* I (974),
BamH I (980), *Sma* I (986)

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

pCMV5 ist ein eukaryontischer Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz und starkem CMV-Promotor. Am 3'-Ende der *Multiple Cloning Site* (MCS) enthält der Vektor ein Polyadenylierungs- und Terminatonsignal des humanen Wachstumshormogens (*human growth hormone*, *hGH*; Polyadenylierungssignal, *PA*; Terminationssignal, *terminator*). Der Vektor besitzt einen SV40-Replikationsursprung und kodiert zudem als Leihgabe aus dem Labor von Dr. Steven Rosen innerhalb der MCS für humanes *Fcy*. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde dieser Vektor im Rahmen von Subklonierungen für die Herstellung von IgG-Fusionsproteinen verwendet.

8.2 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

S. Enders, G. Bernhard, A. Zakrzewicz, R. Tauber.

Inhibition of L-selectin binding by polyacrylamide-based conjugates under defined flow conditions.

Biochim Biophys Acta (2007), **1770**(10): 1441-1449.

G. J. Oostingh*, R. J. Ludwig*, **S. Enders***, S. Gruner, G. Harms, W. H. Boehncke, B. Nieswandt, R. Tauber, M. P. Schön.

Diminished lymphocyte adhesion and alleviation of allergic responses by small-molecule- or antibody-mediated inhibition of L-selectin functions.

J Invest Dermatol (2007), **127**(1): 90-97.

* These authors contributed equally to this work.

Patente

R. Haag, J. Dervedde, R. Tauber, G. Bernhard, H. Türk, **S. Enders**, M. Weinhart.

Dendritische Polyglycerolsulfate dPGS.

Deutsche Patentanmeldung: DE 10 006036326.4

Vorträge (Vortragender unterstrichen)

J. Dervedde, **S. Enders**, M. Weinhart, R. Haag.

Dendritic polyglycerol sulfates as potent selectin inhibitors.

International Symposium on Polymer Therapeutics (ISPT-07).

19.-21.02.2007, Freie Universität Berlin.

Abstracts (in Tagungsbänden)

S. Enders, G. Harms, M. Schön, R. Tauber.

Identification of novel inhibitors of L-selectin-mediated adhesion.

In: *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie* (European Journal of Cell Biology (2004), 83 Suppl. 54; Elsevier GmbH, Hrsg.), Seite 90, Berlin, 2004.

S. Enders, G. Harms, M. Schön, R. Tauber.

Specific small-molecule inhibitors of L-selectin dependent interactions.

In: *Cellular Interactions in the Immune System (CIIS) - Joint Meeting* (Swiss Medical Weekly (2004), 134 Suppl. 140; EHM Schweizerischer Ärzteverlag AG, Hrsg.), Seite S35, Genf, Schweiz, 2004.

S. Enders, G. Harms, R. Tauber.

L-selectin-mediated binding: Inhibition under shear-flow conditions.

In: *GBM Annual Fall Meeting Berlin/Potsdam 2005* (Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V., Hrsg.), Seite 90, Berlin, 2005.

S. Enders, G. Harms, R. Tauber.

Comparison of monomeric and multimeric L-selectin blockers.

In: *9th International Dahlem Symposium on Cellular Signal Recognition and Transduction* (Charité - Universitätsmedizin Berlin, Hrsg.), Seite P31, Berlin, 2005.

S. Enders, G. Harms, M. Schön, R. Tauber.

Diminished lymphocyte adhesion by small-molecule-inhibition of L-selectin functions.

In: *The 2nd Glycan Forum in Berlin* (Charité - Universitätsmedizin Berlin, BioTOP Berlin Brandenburg, Hrsg.), Seite 45, Berlin, 2005.

J. Dervedde, **S. Enders**, R. Tauber, Marie Weinhart, Rainer Haag.

Dendritic polyglycerol sulfates as potent selectin inhibitors.

In: *The 3rd Glycan Forum in Berlin* (Charité - Universitätsmedizin Berlin, BioTOP Berlin Brandenburg, Hrsg.), Seite 19, Berlin, 2007.

S. Enders, G. Bernhard, A. Zakrzewicz, R. Tauber.

Inhibition of L-selectin function by polyacrylamide-based glycoconjugates.

In: *The 3rd Glycan Forum in Berlin* (Charité - Universitätsmedizin Berlin, BioTOP Berlin Brandenburg, Hrsg.), Seite 21, Berlin, 2007.