

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Institut für Biosynthese neuraler Strukturen am  
Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH)

Leitung: Frau Prof. Dr. Melitta Schachner

**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Glykomimetika  
für das Tn-Antigen**

**Dissertation**

zur Erlangung eines Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sandra Bruhn  
aus Hamburg

Hamburg 2012

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.07.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Melitta Schachner**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dirk Isbrand**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Dr. Ralf Kleene**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>2</b>
2.1 Glykane und Glykosylierung.....	2
2.1.1 Aufbau und Biosynthese von Glykoproteinen .....	3
2.1.1.1 N-Glykosylierung.....	4
2.1.1.2 O-Glykosylierung.....	4
2.1.2 Biologische Funktion von Glykoproteinen .....	5
2.2 Das Tn Antigen.....	8
2.2.1 Pathophysiologische Rolle des Tn-Antigens.....	9
2.2.2 Das Tn-Antigen im zentralen Nervensystem .....	11
2.3 Glykomimetika .....	11
2.4 Die <i>Phage-display</i> -Technik.....	12
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.1 Material.....	15
3.1.1 Chemikalien.....	15
3.1.2 Lösungen und Puffer .....	15
3.1.3 Medien.....	20
3.1.4 Antikörper .....	21
3.1.4.1 Primäre Antikörper.....	21
3.1.4.2 Sekundäre Antikörper.....	21
3.1.5 Peptide .....	22
3.1.6 Mäuse .....	22
3.2 Methoden.....	22
3.2.1 Biochemische Methoden .....	22
3.2.1.1 ELISA.....	22
3.2.1.1.1 Standard-ELISA .....	22
3.2.1.1.2 Kompetitiver ELISA .....	23
3.2.1.2 SDS-PAGE.....	23
3.2.1.3 Coomassie-Färbung.....	24
3.2.1.4 Silberfärbung .....	24
3.2.1.5 Western Blot und Immunodetektion .....	24

3.2.1.6	BCA-Test.....	25
3.2.1.7	Kopplung des Glykomimetikums an Katalase .....	25
3.2.1.8	Enzymatischer Verdau .....	26
3.2.1.9	Aufreinigung des 5F4 Fab-Fragmentes mittels Affinitäts- Chromatographie.....	26
3.2.1.10	Immunfärbung an histologischen Gewebeschnitten.....	26
3.2.1.11	Kopplung des 5F4 Antikörpers an magnetische <i>beads</i> .....	27
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.2.2.1	Stammhaltung und Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	27
3.2.2.2	<i>Phage-display</i> .....	28
3.2.2.2.1	Phagenselektion ( <i>panning</i> ) .....	28
3.2.2.2.2	Amplifizierung und Titration.....	28
3.2.2.2.3	DNA-Isolation .....	29
3.2.2.2.4	Phagen-ELISA.....	29
3.2.2.3	Sequenzierung .....	30
3.2.3	Zellkultur .....	30
3.2.3.1	Beschichtung von Zellkulturplatten .....	30
3.2.3.2	Primärzellkultur von Kleinhirnneuronen.....	31
3.2.3.3	Primärzellkultur von Motoneuronen .....	31
3.2.3.4	Primärzellkultur von Hinterwurzelganglienneuronen .....	32
3.2.3.5	Neuritenwachstumsexperimente .....	32
3.2.3.6	Bestimmung des Zellüberlebens von Kleinhirnneuronen .....	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1	Identifizierung von Glykomimetika für das Tn-Antigen.....	34
4.1.1	Sequenzierte Phagenklone.....	34
4.1.2	Sequenzierte Phagenklone im ELISA .....	35
4.1.3	Ausgewählte Phagenklone im Western Blot.....	38
4.1.4	Nachweis einer Bindung von 5F4 IgM an die synthetisierten Peptide .....	39
4.1.4.1	BSM als Bindungspartner für 5F4 IgM.....	39
4.1.4.2	Synthetisierte Peptide im kompetitiven ELISA .....	40
4.2	Aufreinigung und Charakterisierung des 5F4 Fab-Fragmentes .....	41
4.2.1	Aufreinigung des 5F4 Fab-Fragmentes mittels Affinitätschromatografie .....	41
4.2.2	5F4 Fab im ELISA .....	42

4.2.3	5F4 Fab im Western Blot .....	44
4.2.4	5F4 Fab in der immunhistochemischen Gewebeschnittfärbung im Vergleich zum Vollantikörper .....	44
4.3	Funktionelle Charakterisierung des Tn-Glykomimetikums .....	45
4.3.1	Gekoppeltes Glykomimetikum in ELISA und Western Blot .....	45
4.3.2	Neuritenwachstumsexperimente .....	47
4.3.2.1	Kleinhirnneurone .....	48
4.3.2.2	Motoneurone .....	49
4.3.2.2	Hinterwurzelganglienneurone .....	49
4.3.3	Zellüberleben von Kleinhirnneuronen.....	52
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
5.1	Identifizierung von Glykomimetika für das Tn-Antigen.....	53
5.2	Funktionelle Charakterisierung des TnS-Glykomimetikums .....	55
5.3	Funktionelle Charakterisierung des 5F4 Fab-Fragmentes.....	58
5.4	Ausblick.....	60
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>68</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	68
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	70
8.3	Tabellenverzeichnis .....	71
8.4	Erklärung/Vereinbarung .....	72
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>74</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>75</b>

## 1 Zielsetzung der Arbeit

Kohlenhydratstrukturen sind ein entscheidender Bestandteil des menschlichen Organismus. Sie sind vielfach involviert beim Zusammenspiel von Zellen und spielen eine große Rolle im Nerven- und Immunsystem. Da sie die Interaktion zwischen Viren, Bakterien oder Parasiten und menschlichen Wirtszellen vermitteln, sind sie von großer Bedeutung bei der Entstehung von Krankheiten. Häufig sind Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus Ursache für die Ausbildung von Tumoren und Metastasen.

Das Tn-Antigen (CD 175) ist ein mit Serin oder Threonin O-glykosidisch verknüpfter N-Acetylgalaktosamin-Rest. Es stellt eine Vorstufe in der O-Glykanbiosynthese dar und tritt im adulten Organismus bis auf wenige Ausnahmen nur im Rahmen maligner Prozesse in Erscheinung. Im embryonalen Wachstum wird das Tn-Antigen unter anderem im zentralen Nervensystem exprimiert. Welche Rolle diese Expression für den Organismus spielt, ist nicht bekannt. Ziel dieses Projektes ist es, die physiologische Bedeutung des Tn-Antigens im Nervensystem näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollen mittels *Phage-display*-Technik Phagen-Peptid-Klone identifiziert werden, die spezifisch an den Tn-Antikörper 5F4 binden. Peptide, die diese Bedingung erfüllen und die somit ein Tn-Glykomimetikum darstellen, sollen in Form von synthetischen Peptiden in in-vitro-Tests wie Neuritenwachstum und Zellüberleben auf ihre Funktionalität untersucht werden. Parallel dazu soll der Tn-Antikörper als rekombinantes Fab-Fragment ebenfalls in in-vitro-Studien näher charakterisiert werden. Fab-Fragmente stellen die antigenbindende Domäne eines Antikörpers dar und finden aufgrund der fehlenden Immunantwort im Organismus breite Anwendung in Diagnostik und Therapie von Erkrankungen.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Glykane und Glykosylierung**

Kohlenhydrate zählen neben Lipiden, Proteinen und Nucleinsäuren zu den essentiellen Bestandteilen lebender Organismen. Sie dienen als Energiespeicher, Informationsträger oder Gewebekomponenten und finden sich sowohl im intra- und extrazellulären Kompartiment als auch auf Zellmembranen. Während in den Jahren nach Entdeckung der DNA-Struktur durch Watson und Crick (1953) hauptsächlich an Aufbau und Funktion von Proteinen geforscht wurde, kam den Kohlenhydraten vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit zuteil. Zum Einen ahnte man zu diesem Zeitpunkt nicht welche bedeutende Rolle Kohlenhydrate im Organismus spielen, zum Anderen waren die Analysetechniken zur Untersuchung komplexer Oligosaccharidstrukturen noch wenig ausgereift.

Die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms zeigte, gemessen an der Komplexität des Proteoms, eine überraschend geringe Anzahl proteincodierender Gene. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass prä- oder posttranslationale Modifizierung von Proteinen eine größere Rolle spielt, als zunächst angenommen (Venter et al. 2001). Eine Möglichkeit der posttranslationalen Modifizierung stellt die Glykosylierung dar, bei der Kohlehydratketten (Glykane) aus einzelnen bis mehreren hundert Monosacchariden kovalent an ein Protein gebunden werden. Sie dienen dort u.a. als Erkennungssignal und modulieren einen Großteil der Protein-Protein-Interaktionen. Durch Beeinflussung der Faltung verändern sie die räumliche Struktur eines Proteins und können so dessen Aktivität und Funktion regulieren.

Glykoproteine finden sich im Organismus ubiquitär verteilt. Zum größten Teil sind sie in der Zellmembran und im extrazellulären Raum lokalisiert. Lange Zeit glaubte man daher, dass eine Glykosylierung auf sekretorische Proteine beschränkt sei. Verschiedene Autoren konnten jedoch die Existenz von glykosylierten Proteinen auch in Zytosol und Kern nachweisen (Hart et al. 1989). Immer mehr Details der unglaublichen Komplexität der Kohlehydrate wurden im Laufe der Jahre aufgedeckt. Eine Beteiligung an vielen biologischen Prozessen konnte gezeigt werden. Das anfänglich geringe Interesse an Glykanen ist heute einer intensiven Forschung gewichen. Neben den Begriffen Genom und Proteom hat sich der Begriff Glykom für die Gesamtheit der Glykane in einem Organismus etabliert.

### **2.1.1 Aufbau und Biosynthese von Glykoproteinen**

Die physiologische Bedeutung der Glykane ist hauptsächlich auf ihre enorme strukturelle Vielfalt zurückzuführen. Neun verschiedene Monosaccharide (Glucose, Galaktose, N-Acetylglucosamin [GlcNAc], N-Acetylgalaktosamin [GalNAc], N-Acetylneuraminsäure, Glucuronsäure, Mannose, Fucose und Xylose) können in unterschiedlicher Konformation, Reihenfolge, Anzahl und Bindungsart aneinander gekoppelt werden (Kleene & Schachner 2004). Die Biosynthese von Glykanen ist nicht matrizenabhängig, wie bei Proteinen, sondern stellt das Resultat eines Zusammenspiels von hunderten Enzymen dar, für die rund 1% aller Gene codieren (Lowe & Marth 2003). Je nach Expressionsmuster dieser Enzyme entstehen in unterschiedlichen Zellarten verschiedenste Glykoproteine. Diese Heterogenität erlaubt jeder Zelle ein eigenes spezifisches Glykanprofil, das ihr unterschiedliche physiologische und biologische Eigenschaften verleiht.

Der größte Teil der glykosylierten Proteine befindet sich im extrazellulären Kompartiment und in der Zellmembran. Ihre Synthese erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat. Die für die Glykosylierung benötigten Monosaccharide werden aus Glucose und Fructose, die mit der Nahrung aufgenommen werden synthetisiert. Sie liegen im Zytosol als energiereiche Nukleotidzucker vor und müssen für eine Verwendung auf sekretorischen Proteinen in das Lumen des ERs bzw. des Golgi-Apparates transportiert werden. Da Nukleotidzucker die Membran dieser Organellen nicht selbst passieren können, sind spezielle Transporter notwendig. Diese Transporter sind auf den Bedarf an Monosacchariden abgestimmt, sodass ein Zucker nur dann transportiert wird, wenn er auch gebraucht wird (Wopereis et al. 2006). Die Bindung an ein Protein oder ein bereits bestehendes Glykan erfolgt mittels Glykosyltransferasen. Der Nukleotidrest wird bei diesem Prozess abgespalten.

Ein Glykan ist mit einem Protein hauptsächlich N- oder O-glykosidisch verbunden, wobei die N-Glykosylierung weitaus häufiger zu finden ist. Seltener ist die C-Glykosylierung, bei der Protein und Glykan über zwei Kohlenstoffatome verbunden sind (Hofsteenge et al. 1994). Tragen Proteine Glykosaminoglykane (lange Polymere aus sich wiederholenden Disacchariden, in der Regel Glucuronsäure verknüpft mit GlcNAc oder GalNAc) werden sie Proteoglykane genannt. Mucine sind Glykoproteine, die aufgrund eines hohen Gehalts an Serin und Threonin, eine große Anzahl O-Glykane enthalten (Kleene & Schachner 2004).

### **2.1.1.1 N-Glykosylierung**

Die N-Glykosylierung beginnt mit der Synthese einer Kernstruktur, die als Matrix für die weitere Prozessierung dient. Diese Kernstruktur besteht aus drei Glucose-, neun Mannose- und zwei GlcNAc-Molekülen, die an Dolichol-Phosphat gebunden werden. Dolichol ist ein langkettiges, mehrfach ungesättigtes Lipid, das aus mehreren Isoprenderivaten aufgebaut und in der Membran des ERs lokalisiert ist. Von Dolichol wird der Zuckerrest im Lumen des ER auf Asparagin, das in einer bestimmten Erkennungssequenz des zu glykosylierenden Proteins liegt, übertragen. Es folgt ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Glucosidasen und Glykosyltransferasen, die in ER und Golgi-Apparat durch Abspaltung und Bindung weiterer Monosaccharide die Kernstruktur modifizieren. Auf diese Weise entstehen drei verschiedenen Typen von N-Glykanen, denen eine Grundstruktur aus zwei GlcNAc- und drei Mannoseresten gemein ist. Bei oligomannosidischen Glykanen bleibt die mannosereiche Kernstruktur weitestgehend unsubstituiert. Hybride Glykane bestehen zum Teil aus unsubstituierten Mannoseresten, beinhalten aber auch Teile die weitere Monosaccharide tragen. Komplexe Glykane bestehen aus vielen verschiedenen, in unterschiedlicher Reihenfolge substituierten Monosacchariden (Stanley et al. 2009).

### **2.1.1.2 O-Glykosylierung**

Anders als bei der Synthese der N-Glykane erfolgt die O-Glykosylierung ohne eine feste Kernstruktur. Das erste Monosaccharid wird im Golgi-Apparat von einer Glykosyltransferase direkt an ein Protein gebunden. Je nach Expressionsmuster der verschiedenen Glykosyltransferasen werden anschließend weitere Monosaccharide angehängt (Wopereis et al. 2006). Die meisten O-glykosidischen Bindungen erfolgen an Serin oder Threonin, aber auch Bindungen an Hydroxylysin, Hydroxyprolin oder Tyrosin sind beschrieben (Blumenkrantz et al. 1969; Zarschler et al. 2010).

Sieben verschiedene Typen wurden bislang im menschlichen Organismus gefunden. Sie werden nach dem jeweils erstsubstituierten Monosaccharid eingeteilt. Am häufigsten ist der GalNAc-Typ, dessen Grundstruktur ein an Serin oder Threonin  $\alpha$ 1-glykosidisch gebundenes GalNAc-Monosaccharid darstellt (Tn-Antigen, siehe Abb. 1). GalNAc-O-Glykane finden sich in hohem Maße in Mucinen sowie auf Blut- und Epithelzellen. Die anderen Typen umfassen Xylose (in Glykosaminoglykanen), Galaktose (z.B. im Kollagen), GlcNAc (in nuclearen und zellulären Glykoproteinen), Mannose (z.B. im  $\alpha$ -Dystroglykan), Glucose und Fucose (beide in EGF Proteindomänen) (Wopereis et al. 2006).

O-Glykane sind zwar in der Regel kürzer, aber bedingt durch den komplexen Synthesemechanismus im Aufbau wesentlich variabler als die N-Glykane. Vor allem die O-Glykane des GalNAc-Typs weisen eine hohe strukturelle Diversität auf. Acht Kernstrukturen, basierend auf der Bindung von GalNAc an das nächstfolgende Monosaccharid, sind beschrieben (Abb. 1). Bei weitem am häufigsten ist die Core 1-Struktur (Thomsen-Friedenreich (TF) -Antigen) zu finden.

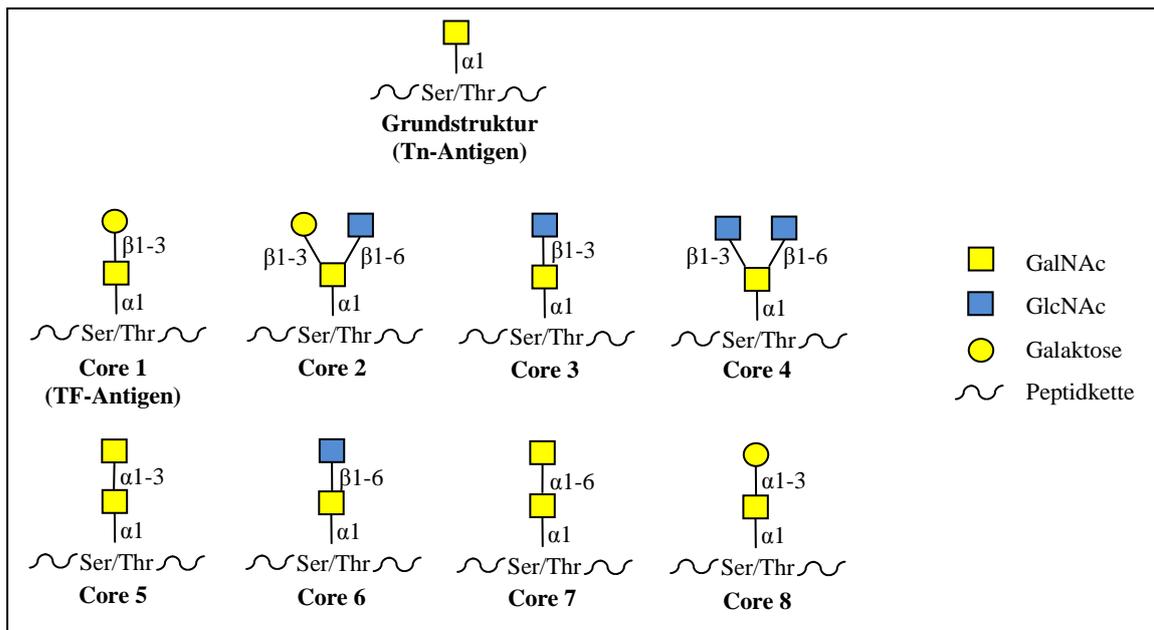


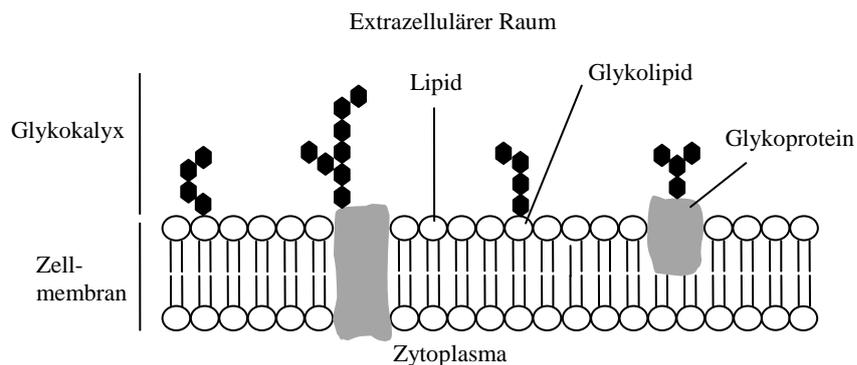
Abb. 1: Kernstrukturen der GalNAc-O-Glykane (Schema). Basierend auf der Grundstruktur GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr (Tn-Antigen) entstehen durch verschiedene Glucosyltransferasen acht Kernstrukturen. Zum Teil sind die gleichen Monosaccharide dabei unterschiedlich gebunden.

## 2.1.2 Funktion von Glykoproteinen

Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens spielen Glykane eine bedeutende Rolle für eine Vielzahl biologischer Prozesse. Das Spektrum ihrer Funktionen reicht von trivial (strukturelle Komponente im Gewebe) bis kritisch (Autoimmunprozesse). Generell ist es schwierig, die genaue Funktion, oder Bedeutsamkeit einer bestimmten Glykanstruktur vorauszusagen, da die gleiche Oligosaccharidsequenz an unterschiedlichen Orten in einem Organismus, oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ontogenese verschiedene Funktionen haben kann (Varki 1993).

Die Glykosylierung von Proteinen ist ein wesentlicher Faktor für die korrekte Faltung und übt einen modulierenden Effekt auf die Proteinfunktion aus. So können durch die Beeinflussung der Struktur z.B. Stabilität, Hitzeresistenz, Hydrophilie sowie die Labilität eines Proteins gegenüber Proteasen verändert werden (Van den Steen et al. 1998; Fiedler & Simons 1995). Manche Hormone und Enzyme werden auf diese Weise in ihrer Aktivität reguliert.

Wie bereits erwähnt, sind viele Glykoproteine ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembran. Der Kohlenhydratanteil bildet dabei zusammen mit dem der Glykolipide die Glykokalyx (Abb. 2), eine Schleimschicht, die der Zelle einerseits Schutz gewährleistet und ihr andererseits die Kommunikation nach außen ermöglicht. Verschiedene Glykorezeptoren erkennen und binden spezifisch einzelne Oligosaccharidstrukturen innerhalb der Glykokalyx. Auf diese Weise wird ein Großteil der physiologischen Erkennungsprozesse wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion sowie zelluläre Signaltransduktion, die zu Zellwachstum oder Apoptose führt, vermittelt.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Zellmembran.** Die in den extrazellulären Raum gerichteten Oligosaccharide bilden die Glykokalyx

Auch in den extrazellulären Kompartimenten finden sich viele Glykoproteine. In der extrazellulären Matrix haben diese vor allem einen Effekt auf Organisation, Struktur und Integrität von Gewebeverbänden (Varki 1993). Mucine, die aufgrund eines hohen Anteils an O-Glykanen große Mengen Wasser binden können, sind Teil von Schleimsekreten und bilden in Schleimhäuten eine Barriere für Krankheitserreger (Voynow & Rubin 2009). Zudem sind nahezu alle Proteine des Blutplasmas glykosyliert. Sie sind dort u.a. Bestandteil oder Mediator der Gerinnungskaskade (Varki 1993; Björk & Lindahl 1982).

Im Nervensystem haben Glykane eine wichtige Funktion in Prozessen, die auf Zellerkennung beruhen. So konnte für verschiedene Glykoproteine u.a. eine Beteiligung bei Zellmigration, Neuritenwachstum und Synapsenbildung gezeigt werden (Kleene & Schachner 2004). Manche Glykane, darunter viele Proteoglykane, sowie das Tn-Antigen (GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr; siehe 2.2) werden während der Reifung des Gehirns streng zeitlich und räumlich begrenzt exprimiert (Bandtlow & Zimmermann 2000; Akita et al. 2001a), was auf eine entscheidende Funktion im embryonalen Wachstum hindeutet.

Viele Pathogene tragen eine eigene Kohlehydrathülle, die durch Interaktion mit der Kohlehydrathülle des Wirtes Infektiösität vermittelt (Sharon 1996). So bindet z.B. der

Influenza-Virus über viruseigene Lektine, die Hämagglutinine, an terminale Sialinsäureeinheiten der Wirtszelle (Weis et al. 1988). Der Organismus verteidigt sich gegen diese Angriffe mit der Synthese spezifischer Antikörper, die gegen das Glykanmuster des Angreifers gerichtet sind. Zudem versucht er langfristig sein eigenes Glykanmuster in einer Weise abzuändern, die vor einem weiteren Angriff schützt, die aber die eigene Funktion nicht beeinträchtigt. Um ihre Infektiösität zu wahren, reagieren die Pathogene darauf ebenfalls mit einer Änderung ihres Glykanmusters. Dieser stetige Prozess der gegenseitigen Anpassung führte im Laufe der Evolution wahrscheinlich zu der heutigen Vielseitigkeit und Artenvielfalt der Glykanstrukturen (Varki 2006).

Die Bedeutsamkeit der Glykane spiegelt sich vor allem in Krankheitsbildern wieder, bei denen eine Veränderung des physiologischen Glykanmusters vorliegt, die die Funktion einer Zelle nachhaltig beeinträchtigt. In der Regel haben solche Veränderungen schwere Konsequenzen für den ganzen Organismus. Man unterscheidet zwischen angeborenen und erworbenen Defekten der Glykansynthese. Zu den angeborenen Erkrankungen zählen die sogenannten CDGs (*congenital disorders of glycosylation*), Multisystemerkrankungen, die je nach Lokalisation des Defektes unterschiedlich schwer verlaufen (Jaeken & Matthijs 2007). Häufige Symptome sind frühzeitiges Organversagen und psychomotorische Entwicklungsstörungen schon im Säuglingsalter. Betroffene Patienten haben in der Regel eine geringe Lebenserwartung. Weitere Beispiele sind die angeborenen Muskeldystrophien (Collins & Bönnemann 2010), oder das Wiskott-Aldrich-Syndrom (Peacocke & Siminovitch 1992). Auch im gesunden Organismus können Defekte in der Glykosylierung auftreten. Sie zählen zu den erworbenen Defekten und beruhen meist auf einer veränderten Expression von normal auftretenden Glykanmustern (Alavi & Axford 2008). In diese Kategorie fallen z.B. die meisten Tumorerkrankungen.

Tumorzellen unterscheiden sich von gesunden Zellen in Struktur und Menge der Glykoproteine. Viele maligne Tumoren exprimieren verstärkt Mucine, die verkürzte Kohlenhydratepitope tragen. Einige dieser verkürzten Glykanstrukturen, darunter das Tn-Antigen, sind tumorassoziiert. Das bedeutet, sie können bei vielen Tumorerkrankungen in großer Anzahl nachgewiesen werden, sind aber im gesunden Organismus nicht oder nur in geringer Anzahl vorhanden. Krebserkrankungen, die mit einer erhöhten Expression verkürzter Kohlenhydratepitope einhergehen, haben in der Regel eine schlechte Prognose. Da die Strukturen zum Teil immunogenes Potential aufweisen, stellen sie primäre Ziele in der Entwicklung von Krebsimpfstoffen dar (Astronomo & Burton 2010).

## 2.2 Das Tn Antigen

Das Tn-Antigen (T antigen nouvelle; CD 175) ist ein mit Serin oder Threonin  $\alpha$ 1-O-glykosidisch verbundener N-Acetylgalaktosaminrest (Abb. 3) und entspricht der Grundstruktur der GalNAc-O-Glykosylierung. Während es im embryonalen Wachstum vielfach auf diversen Zellen präsentiert wird (Barr et al. 1989), tritt das Tn-Antigen im gesunden adulten Organismus, bis auf wenige Ausnahmen, nicht in Erscheinung. Es ist maskiert durch die Anheftung weiterer Monosaccharide im Rahmen der O-Glykan-Synthese.

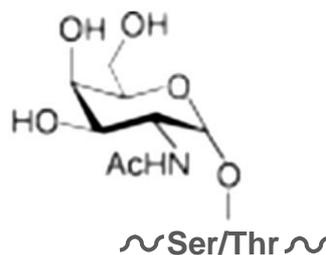


Abb. 3: Biochemische Struktur des Tn-Antigens. GalNAc ist  $\alpha$ 1-O-glykosidisch mit dem Serin oder Threoninrest einer Peptidkette verbunden.

Das Tn-Antigen wird durch die Enzymgruppe der  $\alpha$ -N-Acetylgalaktosaminyltransferasen (ppGalNAcTs), die GalNAc vom Donor UDP-GalNAc auf den Serin- oder Threoninrest eines Proteins übertragen, synthetisiert (Abb. 4). Dieser Prozess findet im Golgi-Apparat statt. Zwanzig verschiedene ppGalNAcTs sind bislang im menschlichen Genom beschrieben (Gill et al. 2011). Sie werden gewebespezifisch exprimiert und haben unterschiedliche Substratpräferenzen (Pratt et al. 2004).

Die Struktur des Tn-Antigens weist immunogenes Potential auf. Im Laufe seiner Entwicklung bildet jeder Mensch bei der immunologischen Auseinandersetzung mit Enterobacteriaceae Antikörper gegen das Tn-Epitop (Springer & Tegtmeyer 1981). Kommt es im adulten Organismus zu einer Demaskierung des Epitops, führen die Antikörper zu einer Aktivierung des Immunsystems (Dausset et al. 1959). Auf wenigen O-glykosylierten Proteinen, vorwiegend auf epithelialeem Gewebe, wird das Tn-Antigen physiologisch exprimiert (Cao et al. 1996). Es scheint an diesen Orten unerreichbar für zirkulierende Antikörper, zu einer Aktivierung des Immunsystems kommt es nicht. Welche Funktion das Tn-Antigen an diesen Orten hat ist bislang unbekannt.

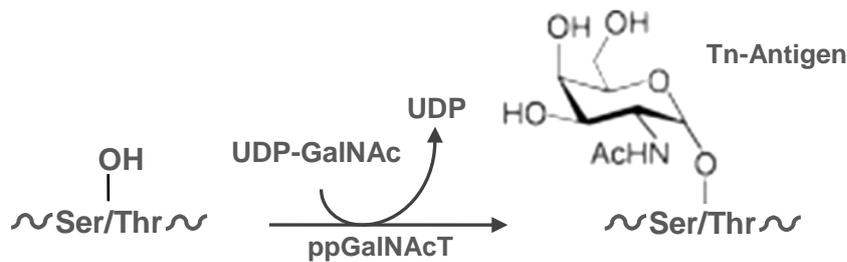


Abb. 4: Biosynthese des Tn-Antigens (Schema). Das Enzym ppGalNAcT katalysiert die Bindung von GalNAc an einen Serin- oder Threoninrest.

Verschiedene Autoren konnte mithilfe von Lektinen oder Antikörpern eine vermehrte Expression des Tn-Epitops auf embryonalem Gewebe, v.a. auf epithelialen Zellen nachweisen (Barr et al. 1989; Tian & Ten Hagen 2007). Da das Antigen zum Teil räumlich und zeitlich sehr begrenzt auftritt, wird eine entscheidende Funktion im embryonalen Wachstum angenommen.

### 2.2.1 Pathophysiologische Rolle des Tn-Antigens

Das Tn-Antigen stellt eine Vorstufe der GalNAc-O-Glykane dar und ist physiologisch nur in sehr wenigen Geweben zu finden. Kommt es im adulten Organismus zu einem Auftreten des Tn-Antigens über das normale Maß hinaus, ist dies ein Ausdruck von unvollständiger Glykosylierung und Malignität. Ursächlich sind meist Mutationen, die sich auf die Synthese der für die weitere Prozessierung des Tn-Antigens verantwortlichen Enzyme auswirken.

Ein entscheidender Schritt in der Biosynthese der Core-1 Struktur ist die Bindung von Galaktose an das Tn-Antigen durch das Enzym  $\beta$ -1,3-Galaktosyltransferase (T-Synthase). Das Chaperon *Cosmc* ist für die korrekte Faltung und Aktivierung dieses Enzyms verantwortlich (Ju et al. 2008a). Bei dem äußerst seltenen Krankheitsbild des Tn-Syndrom (auch PMFP – *permanent mixed-field polyagglutinability*) kommt es durch eine Mutation des Chaperons zu einem Verlust der T-Synthase in hämatopoetischen Stammzellen (Ju & Cummings 2005). Durch den Ausfall des Enzyms wird das Tn-Antigen auf allen Zellen der Hämatopoese demaskiert (Berger 1999). Im Blut zirkulierende Antikörper führen zu einer Immunantwort mit hämolytischer Anämie, sowie milder Thrombo- und Leukozytopenie. Nicht alle Mutationen beeinflussen die Aktivität des Chaperons in gleicher Weise. Die Ausprägung des Krankheitsbildes ist daher sehr heterogen.

Auch bei der Krebsentstehung spielen Enzymdefekte aufgrund von Mutationen eine entscheidende Rolle. Sie führen zu einer Demaskierung verkürzter Kohlenhydratepitope,

darunter das Tn- und TF-Antigen (siehe Abb. 1). Springer et. al beschrieben das Tn-Epitop bereits 1974 als tumorassoziiert (Springer et al. 1974). Seither konnte eine Überexpression auf vielen Tumor-Entitäten, darunter Brust-, Kolon- und Prostatakarzinome, gezeigt werden (Springer 1997). Das Tn-Antigen wurde dabei sowohl auf Primärtumoren, als auch auf Metastasen nachgewiesen. In vielen Fällen korreliert eine erhöhte Expression mit einer Tendenz zur Metastasierung und schlechter Prognose (Desai 2000). Wie schon im Falle des Tn-Syndroms, liegt der Überexpression des Tn-Antigens in Tumoren meist eine Mutation des Chaperons *Cosmc* zu Grunde (Ju et al. 2008b). Daneben sind Veränderungen in der Expression von Core-2 bildenden Enzymen beschrieben (Dalziel et al. 2001). Zwar erkennt das Immunsystem die Tn-Epitope in Tumoren als „fremd“, die Immunantwort ist jedoch aus bisher wenig verstandenen Gründen nicht effektiv genug, um eine Zerstörung von Tumorzellen zu bewirken. Diskutiert werden u.a. immunsuppressive Effekte durch eine Bindung an das *macrophage galactose-type lectin* (MGL) auf dendritischen Zellen (Saeland et al. 2007). Um eine bessere Immunabwehr des Organismus zu fördern wurde in den letzten Jahren verstärkt an der Herstellung spezifischer Tumor-Impfstoffe geforscht. Einige befinden sich in klinischer Erprobung (für eine Zusammenfassung siehe Ju et al. 2011).

Bei der IgA-Nephropathie kommt es durch Ablagerung von polymerem Immunglobulin A, insbesondere des IgA1 Subtyps, im Mesangium zur Glomerulonephritis. Im Normalfall trägt die Gelenkregion (*hinge region*) des IgA1 Moleküls zahlreiche sialysierte Core-1 Disaccharide. Bei Patienten mit IgA-Nephropathie wurden Galaktose-defiziente IgA1 Varianten mit Tn-Expression gefunden (Julian & Novak 2004). Ein funktionelles Defizit der T-Synthase scheint auch hier gegeben. Ob *Cosmc*-Mutationen eine Rolle spielen ist bislang nicht geklärt. Die verkürzten Kohlehydratepitope scheinen jedoch die Pathogenese der IgA Nephritis entscheidend zu beeinflussen (Ju et al. 2011).

Neben den genannten Erkrankungen scheint eine Tn-Expression auch in der Infektiologie eine Rolle zu spielen. So konnte das Tn-Antigen in zahlreichen Parasiten, darunter *Echinococcus granulosus* und *Cryptosporidium parvum*, nachgewiesen werden (Alvarez Errico et al. 2001; O'Connor et al. 2003). Auch auf Hüllproteinen von Viren, darunter gp120 und gp160 des humanen Immunodefizienz-Virus, konnte eine Expression gezeigt werden (Hansen et al. 1991).

### 2.2.2 Das Tn-Antigen im zentralen Nervensystem

Während des embryonalen Wachstums von Mäusen wird das Tn-Antigen in verschiedenen Hirnstrukturen, darunter Kleinhirn und Zerebralcortex, exprimiert (Akita et al. 2001a). Die Expression ist begrenzt auf einen Zeitraum zwischen Embryonaltag neun und der dritten Lebenswoche, anschließend ist das Epitop nicht mehr nachweisbar. Aus der Gruppe der  $\alpha$ -N-Acetylgalaktosaminyltransferasen, die das Tn-Antigen synthetisieren, wurde das Enzym ppGalNAcT-13 spezifisch in Neuronen des zentralen Nervensystems nachgewiesen. Es scheint für die Expression des Tn-Antigens im Gehirn von entscheidender Bedeutung (Zhang et al. 2003).

Das Proteoglykan *Syndecan-3* konnte als Trägerprotein für das Tn-Antigen identifiziert werden (Akita et al. 2001b). Anders als andere Unterformen beinhaltet es eine mucinähnliche Domäne mit zahlreichen Serin- und Threonin-Resten, die eine O-Glykosylierung ermöglichen (Gould et al. 1992). Welche Rolle die Expression des Tn-Antigens auf *Syndecan-3* für die embryonale Entwicklung spielt, ist bislang nicht bekannt. Eine Beeinflussung der Nervenzellentwicklung wird angenommen.

### 2.3 Glykomimetika

Viele wichtige Funktionen von Glykanen werden über Interaktionen mit spezifischen Kohlenhydratrezeptoren vermittelt. Diese Wechselwirkung bietet zahlreiche Möglichkeiten der therapeutischen Intervention in pathologischen Prozessen. Die künstliche Herstellung von Glykanen für Forschung und Therapie ist trotz methodischer Fortschritte bei der Oligosaccharidsynthese (Bartolozzi & Seeberger 2001, Zhou & O'Doherty 2008) nach wie vor kompliziert und kostenintensiv. Zudem haben viele Glykane ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften (z.B. schlechte Affinität zum Rezeptor, oder Labilität gegenüber enzymatischem Abbau), sodass sie für die Entwicklung Kohlenhydrat-basierter Wirk- und Impfstoffe ungeeignet sind (Sears & Wong 1999).

Abhilfe schaffen Glykomimetika, organische Strukturen, die in der Lage sind, Glykane funktionell zu imitieren („mimikrieren“). Diese Strukturen sind in der Regel einfacher aufgebaut als das Original und können daher leichter synthetisiert werden. Durch gezielte Modifizierungen lassen sich Affinität, Spezifität und Stabilität beeinflussen, sodass die pharmakokinetischen Eigenschaften im Vergleich zum Original verbessert sind. Ein Glykomimetikum muss seinem Original nicht zwangsweise strukturell ähneln, viel wichtiger dagegen ist eine enge Funktionsverwandtschaft. Im Idealfall wird ein

Glykomimetikum durch sämtliche Rezeptoren und Antikörper erkannt, die auch mit dem Original eine Wechselwirkung eingehen. Ein geeignetes Glykomimetikum kann so nicht nur bei der Aufklärung von molekularen Grundlagen vieler Oligosaccharid-vermittelter Prozesse helfen, sondern eröffnet auch neue Ansätze zur Therapie von Krankheiten.

Viele Mimetika wurden bislang durch rationales Design erstellt, bei dem ausgehend vom Original durch gezielte Modifikation und Vereinfachung eine neue Struktur entworfen wird. Prominentes Beispiel hierfür sind die Mimetika für das Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Tetrasaccharid (Kaila & Thomas 2002). Große, stark verzweigte Glykane können durch sogenannte Glykodendrimere mimikriert werden (von der Lieth et al. 2002). Diese, auf dem Konzept der Dendrimere beruhenden Glykomoleküle, sind in der Lage die im Organismus vorkommende Multivalenz zu imitieren.

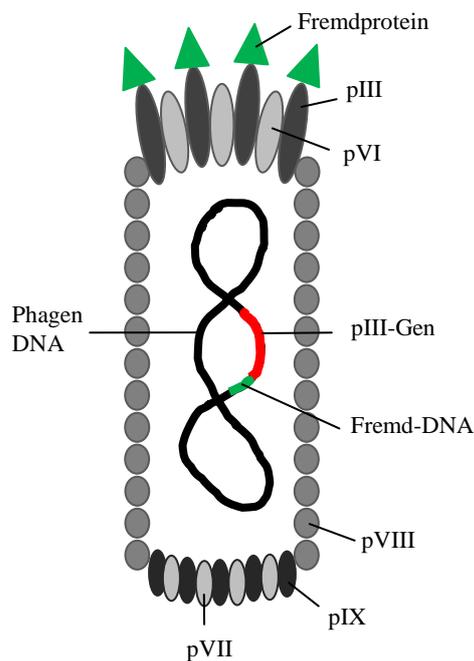
Eine weitere Möglichkeit der Glykanimation bieten Peptide. Oldenburg et al. und Scott et al. waren 1992 die ersten, die mithilfe von randomisierten Phagenbibliotheken Peptide identifizieren konnten, die an das Lectin Concanavalin A binden und somit ein Glykomimetikum für mannosehaltige Oligosaccharide darstellen. Diverse Veröffentlichungen über andere glykomimetische Peptidstrukturen folgten, einige der Glykomimetika zeigten sogar immunogenes Potential (Johnson & Pinto 2002). Auf neuraler Ebene konnte kürzlich eine Stimulation des Neuritenwachstums durch peptidische Glykomimetika von Polysialinäure und HNK-1 (*human natural killer cell*) Glykan in vitro und in vivo gezeigt werden (Mehanna et al. 2010; Bächle et al. 2006).

#### **2.4 Die *Phage-display*-Technik**

*Phage-display* ist primär eine Methode zur Selektion von Peptiden, Proteinen oder Antikörpern, es wird aber auch zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, Charakterisierung von Immunantworten und Modifizierung von Proteineigenschaften eingesetzt (Bradbury 2010). Prinzip der Methode ist die Präsentation (*display*) von Proteinen oder Peptiden auf der Oberfläche von Bakteriophagen (Smith 1985). Auf genetischer Ebene werden diese mit einem Oberflächenprotein des Phagen fusioniert, sodass ein Kopplungsprodukt entsteht, welches in die Hülle des Phagen integriert wird. Die eigentliche Funktion des Hüllproteins bleibt bei der Kopplung erhalten.

Am häufigsten kommen für das *Phage-display* filamentöse Phagen der Ff-Gruppe (z.B. M13, fd oder f1) zum Einsatz. Diese stabförmigen, 6nm breiten und 1000-2000nm langen Phagen tragen ein zirkuläres, einzelsträngiges DNA-Genom (Marvin & Wachtel 1976) und

infizieren gram-negative Bakterien über den F-Pilus. Bindet ein Phage an den Pilus, wird er in die Bakterienoberfläche integriert und die DNA gelang in das Bakterium. Dort wird die einzelsträngige DNA mithilfe bakterieller Enzyme in Doppelstrangform umgeschrieben, aus der sämtliche Proteine, sowie eine Einzelstrangkopie für die Produktion neuer Phagen erstellt werden können. Im periplasmatischen Raum werden die Phagenbestandteile zusammengesetzt. Anschließend verlassen die fertigen Phagen das Bakterium, das durch die Infektion zwar nicht getötet, aber in seiner Vermehrung stark eingeschränkt wird.



**Abb. 5: Struktur eines filamentösen Phagen (Schema).** pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX bezeichnen die Hüllproteine des Phagen. Von pVIII sind etwa 2700 Kopien in einem Phagen vorhanden, die anderen Hüllproteine liegen in 3-5facher Kopie vor. Das Produkt der an das pIII-Gen gekoppelten Fremd-DNA wird auf dem pIII Protein präsentiert.

Das Phagen-Genom beinhaltet elf verschiedene Proteine, von denen fünf die Hülle bilden und die anderen sechs an der Reproduktion beteiligt sind. Unter den Hüllproteinen hat pVIII, das in etwa 2700 Kopien vorliegt, den Hauptanteil. pIII ist verantwortlich für die Bindung an den F-Pilus und liegt in drei- bis fünffacher Anzahl zusammen mit pVI an einem Ende des Phagen. pVII und pIX sind auf der gegenüberliegenden Seite lokalisiert (Abb. 5).

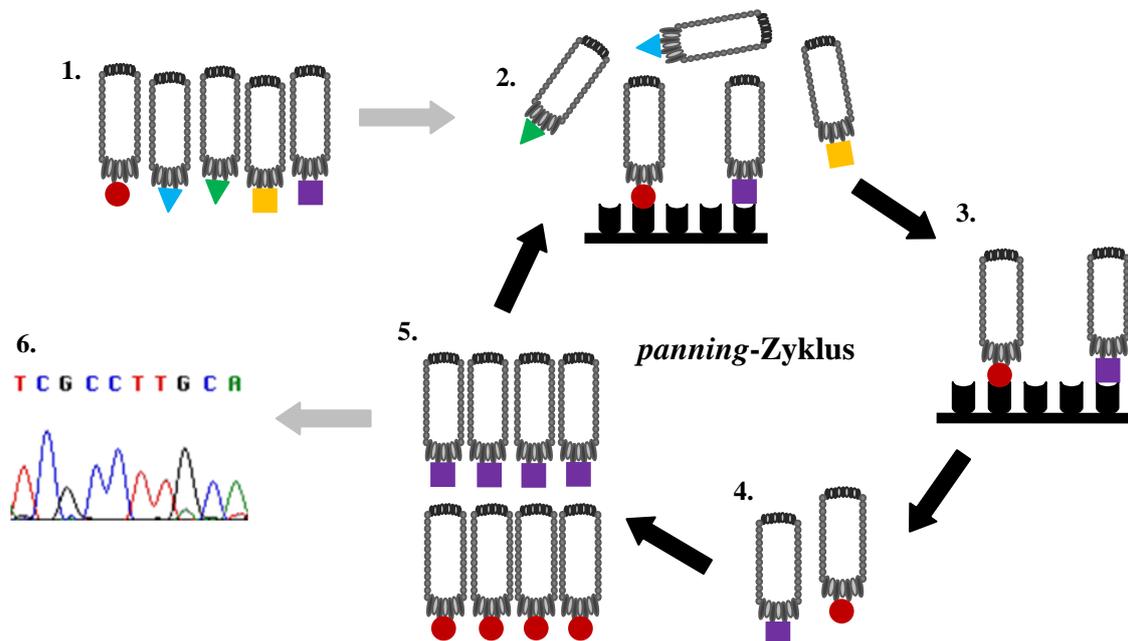
Die Kopplung des Fremd-Proteins, das an der Oberfläche präsentiert werden soll, erfolgt am N-Terminus von pVIII oder pIII, wobei Letzteres bei weitem am häufigsten zum Einsatz kommt.

Für die Fusion der Proteine auf DNA-Ebene wurden bisher zwei verschiedene Vektorsysteme beschrieben: Phagenbasiert und Phagemidbasiert.

In phagenbasierten Vektoren wird die Fremd-DNA direkt an pIII in das Phagen genom kloniert. Die Präsentation erfolgt multivalent, d.h. auf jeder Kopie von pIII wird das Fremdprotein präsentiert. Aufgrund der schlechten Transformationsrate und der Instabilität des Genoms hat sich diese Methode jedoch als schwierig erwiesen. Sehr viel häufiger kommen in *E. coli* transformierte, phagemidbasierte Vektoren zum Einsatz. Diese enthalten neben einem Resistenzgen lediglich den Ff-Replikationsursprung, sowie eine Kopie von pIII, gekoppelt an die Fremd-DNA. Das Phagemid enthaltende Bakterium wird von einem Helferphagen, der alle wichtigen Phagenproteine bereitstellt, infiziert. Beim

Zusammenbau neuer Phagenklone wird nun zum Teil das Phagemidprotein eingebaut. Die Präsentation des Fremdproteins erfolgt monovalent, d.h. trägt ein Phage das Fremdprotein, dann ist es in der Regel nur auf einem pIII-Protein vertreten.

Phagenbibliotheken bestehen aus Millionen Phagenklonen, die unterschiedliche Fremdproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren. Aus solchen Bibliotheken lassen sich, ähnlich einer Affinitätsaufreinigung, Bindungspartner für Antikörper, Proteine, oder andere Substanzen anreichern. Die Phagenbibliothek wird dazu auf eine immobilisierte Zielstruktur gegeben. Ungebundene Phagen werden entfernt und die gebundenen Phagen gelöst, um sie anschließend in *E. coli* zu vermehren. Dieser Selektionsprozess (Abb. 6), auch *panning* genannt, wird drei Mal wiederholt, wobei jedes Mal das amplifizierte Phageneluat auf die Zielstruktur gegeben wird. Am Ende sollten im Idealfall ein oder zwei Phagenklone übrig bleiben, die spezifisch an die Zielstruktur binden. In der vorliegenden Arbeit wurden Peptidbibliotheken, deren Phagen die Fremdstruktur auf pIII präsentieren, zur Identifizierung eines Antigens für den Tn-Antikörper 5F4 verwendet.



**Abb. 6:** Ablauf der Selektion von Peptiden/Proteinen aus Phagenbibliotheken mittels *Phage-display*. Die Phagenbibliothek (1.) wird zunächst mit dem Zielantigen inkubiert (2.). Nicht bindende Phagen werden durch Waschen entfernt (3.). Die bindende Phagen werden eluiert (4.) und anschließend in *E. coli* amplifiziert (5.). Es folgen zwei weitere Selektionsrunden, danach werden die Phagenklone sequenziert (6.).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt wurden alle Chemikalien in analysereiner Qualität von folgenden Firmen bezogen (weitere Firmen siehe Tab. 1):

- Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Fluka/ Riedel-de-Haen/ Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
- Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Merck KGaA, Darmstadt
- PAA Laboratories GmbH, Pasching

<b>Chemikalie</b>	<b>Herkunft</b>
Acrylamid/Bis 30%	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Desthiobiotin	IBA GmbH, Göttingen
Dimethylformamid	Th. Geyer GmbH, Renningen
DTT	Biomol GmbH, Hamburg
Glutaraldehyd 25%	Agar Scientific Ltd., Stansted
IPTG	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen
Normales Ziegenserum	Dianova, Hamburg
OPD	Perbio, Bonn
SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Stable Peroxide Substrate	Perbio, Bonn
Transferrin, holo (bovine plasma)	VWR International, Hannover
X-Gal	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen

Tab. 1: Herkunft verwendeter Chemikalien

#### 3.1.2 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders erwähnt wurden sämtliche Lösungen und Puffer mit dH<sub>2</sub>O angesetzt.

PBS	137mM NaCl	pH 7,4
	2,7mM KCl	
	8mM NaHPO <sub>4</sub>	
	1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

PBST 0,05% 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

### **ELISA**

Blockpuffer 1% (w/v) BSA in PBS  
(*Phage-display*)

Blockpuffer 5% (w/v) BSA in PBS  
(restliche Bindungsversuche)

Detektionsreagenz 1mg/ml OPD  
10% Stable Peroxide Substrate

### **FAB-Aufreinigung**

Elutionspuffer 100mM Tris-HCl pH 8.0  
150mM NaCl  
1mM EDTA  
2,5mM Desthiobiotin

Waschpuffer 100mM Tris-HCl pH 8.0  
150mM NaCl  
1mM EDTA

### **Immunfärbung histologischer Schnitte**

Blocklösung 0,2% (v/v) Triton X-100  
0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>  
5% (v/v) normales Ziegenserum  
in PBS

Verdünnungspuffer 0,5% (w/v) λ-caraggeenan  
0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>  
in PBS; gefiltert

### **Phage Display**

Ammoniumsulfat-Puffer 3M (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> pH 7,4  
0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,1M NaHPO<sub>4</sub>

Blockpuffer 1% (w/v) BSA pH 7,4  
0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,1M NaHPO<sub>4</sub>

Iodid-Puffer	10mM Tris-HCl 1mM EDTA 4M NaI	pH 8,0
IPTG/XGal	5% (w/v) IPTG 4% (w/v) XGal in Dimethylformamid	
Natriumphosphat-Puffer	0,1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M NaHPO <sub>4</sub>	pH 7,4
PEG/NaCl	20% (w/v) PolyethylenGlykol-8000 2,5M NaCl	
Tetracyclin-Stammlösung	20mg/ml Tetracyclin in Ethanol	
TBS	50mM Tris-HCl 150mM NaCl	pH 7,5
TBST 0,1/0,3/0,5%	50mM Tris-HCl 150mM NaCl 0,1/0,3/0,5% (v/v) Tween 20	pH 7,5
<b>Primärzellkultur</b>		
DNase I –Lösung (Kleinhirnneurone)	0,05% (w/v) DNase I 0,25% (w/v) Glucose 1 x Neurobasal A	
DNase I –Lösung (DRG- und Motoneurone)	0,01% (w/v) DNase I 1 x F12/DMEM	
DRG-Medium	2% (v/v) Penicillin/Streptomycin 100µg/ml BSA 50µg/ml Insulin 50µg/ml Transferrin 100ng/ml NGF 30nM L-Thyroxin 10nM Hydrocortison 100µM Putrescin 20nM Progesteron	

	30nM Natriumselenit	
	1 x B27 Supplement	
	1 x F12/DMEM	
Färbelösung	1% (w/v) Toluidinblau O	
	1% (w/v) Methylenblau	
	1% (w/v) Borax	
Motoneuronmedium	1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	
	1% (v/v) Natriumpyruvat	
	0,5% (v/v) L-Glutamin	
	9µg/ml BSA	
	9µg/ml Insulin	
	8ng/ml Hydrocortison	
	29µg/ml Putrescin	
	5µg/ml Transferrin	
	20nM Progesteron	
	30nM Natriumselenit	
	1 x B27 Supplement	
	1 x F12/DMEM	
Trypsin/DNase-Lösung	1% (w/v) Trypsin	pH 7,8
	0,1% (w/v) DNase I	
	0,8mM MgCl	
	1 x HBSS	
Trypsin/Collagenase-Lösung	0,25% (w/v) Trypsin	
	0,1% (w/v) Collagenase	
	1 x F12/DMEM	
X1-Medium	1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	
	1% (v/v) Natriumpyruvat	
	1% (v/v) L-Glutamin	
	10µg/ml BSA	
	10µg/ml Insulin	
	100µg/ml Transferrin, holo	
	4nM L-Tyroxin	
	30nM Natriumselenit	

1 x Neurobasal A

### **Proteinfärbung**

Coomassie-Lösung                      20% (v/v) Roti-Blue 5x Konzentrat  
   20% (v/v) Methanol

### **SDS-Page und Western Blot**

3% SDS-Sammelgel                      3,84 ml ddH<sub>2</sub>O  
(Ansatz für 2 Gele)                      500µl 30% Acrylamid-Bis 29:1 (w/v)  
   625µl 1M Tris pH 6,8  
   50µl 10% (w/v) SDS  
   25µl 10% (w/v) APS  
   5µl TEMED

4% SDS-Sammelgel                      3,68 ml ddH<sub>2</sub>O  
(Ansatz für 2 Gele)                      665µl 30% Acrylamid-Bis 29:1 (w/v)  
   625µl 1M Tris pH 6,8  
   50µl 10% (w/v) SDS  
   25µl 10% (w/v) APS  
   5µl TEMED

6% SDS-Trenngel                        5,12 ml ddH<sub>2</sub>O  
(Ansatz für 2 Gele)                      2,5 ml 30% Acrylamid-Bis 29:1 (w/v)  
   4,65ml 1M Tris pH 8,8  
   125µl 10% (w/v) SDS  
   62,5µl 10% (w/v) APS  
   6,25µl TEMED

10% SDS-Trenngel                        3,45 ml ddH<sub>2</sub>O  
(Ansatz für 2 Gele)                      4,17 ml 30% Acrylamid-Bis 29:1 (w/v)  
   4,65ml 1M Tris pH 8,8  
   125µl 10% (w/v) SDS  
   62,5µl 10% (w/v) APS  
   6,25µl TEMED

5xSDS-Probenpuffer                      40% (v/v) 1M Tris-HCl pH 6,8  
(mit DTT)                                    50% (v/v) Glycerin 100%  
   100mg/ml SDS

	0,5mg/ml Bromphenolblau
	12,5mg/ml DTT
5xSDS-Probenpuffer (ohne DTT)	40% (v/v) 1M Tris-HCl pH 6,8 50% (v/v) Glycerin 100% 100mg/ml SDS 0,5mg/ml Bromphenolblau
10xSDS-Laufpuffer	1,9M Glycin 250mM Tris 1% (w/v) SDS
Blotpuffer	192mM Glycin 25mM Tris 9,1% (v/v) Methanol

### 3.1.3 Medien

Sämtliche Medien wurden autoklaviert. Tetracyclin und IPTG/XGal wurden erst nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur <70°C hinzugefügt.

IPTG/Xgal-Agar	1,5% (w/v) Agar 0,1% (v/v) IPTG/Xgal in LB-Medium
LB-Medium	10g/l Pepton 5g/l Hefeextrakt 5g/l NaCl
Tetracyclin-Agar	1,5% (w/v) Agar 0,1% Tetracyclin-Stammlösung in LB-Medium
Top-Agar	0,7% (w/v) Agar 0,1% (w/v) MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O in LB-Medium

### 3.1.4 Antikörper

#### 3.1.4.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Klonalität	Spezies	Epitop	Herkunft
5F4 IgM	mc	Maus	Tn-Antigen	InVivo BioTech Services GmbH, Henningsdorf
5F4 FAB	mc	Maus, humanisiert	Tn-Antigen	Labor von Prof. Schachner, selbst aufgereinigt
Anti-Calbindin-D-28K (EG-20)	mc	Kaninchen	Maus-Purkinjezellen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HRP/Anti-M13-conjugate	mc	-	M13 major coat protein	GE Healthcare, München

Tab. 2: Primäre Antikörper. mc = monoklonal

#### 3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Sekundärantikörper wurden bei Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA bestellt

Fluoreszierend:

Bezeichnung	Spezies	Epitop
Anti-Human DyLight	Esel	Human IgG (H+L)
FITC	Ziege	Maus IgG + IgM (H+L)
TRITC	Ziege	Maus IgG (H+L)

Tab. 3: Sekundäre Antikörper, fluoreszierend

HRP-konjugiert:

Bezeichnung	Spezies	Epitop
Anti-Human F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Ziege	Human IgG, FAB-spezifisch
Anti-Maus	Ziege	Maus IgG + IgM (H+L)

Tab. 4: Sekundäre Antikörper, HRP-konjugiert

### 3.1.5 Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden synthetisiert von Schafer-N, Kopenhagen.

Name	Sequenz
TnS	H- Tn-Peptid S <sup>*</sup> -OH
TnS, biotinkonjugiert	Biotin-(EACA)Tn-Peptid S <sup>*</sup> -OH
TnS, cysteingekoppelt	H-Tn-Peptid S <sup>*</sup> -GGGC-OH
TnA	H-THHPPGYFAAHS-OH
TnA, biotinkonjugiert	Biotin-(EACA)THHPPGYFAAHS-OH
TnC, biotinkonjugiert	Biotin-(EACA)KKCFHDRLPQC-OH

Tab. 5: Peptidsequenzen; \*Peptidsequenz entfernt, siehe Erklärung/Vereinbarung S. 72

### 3.1.6 Mäuse

Für sämtliche Zellkulturexperimente wurden sechs oder sieben Tage alte (P6/P7) Wildtypmäuse der Linien C57Black/6 verwendet. Die Tiere stammten aus der hauseigenen Zucht.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Biochemische Methoden

#### 3.2.1.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay)

##### 3.2.1.1.1 Standard-ELISA

Vom zu detektierenden Antigen wurden Verdünnungsreihen mit PBS angesetzt und je 50µl in die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte (*Nunc-ImmunoModule F-8 Maxisorp*, NUNC, Dänemark) pipettiert. Die Beschichtung erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Am folgenden Tag wurde der Überstand entfernt und die wells für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 5%igem BSA geblockt (150µl/well). Anschließend wurde der Blockpuffer wieder entfernt und die wells für zwei bis drei Stunden bei RT mit dem Erstantikörper inkubiert (verdünnt in PBS; 50µl/well). Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 150µl/well PBST für je 5min entfernt. Danach wurden die wells für eine Stunde bei RT mit dem passenden Zweitantikörper (verdünnt in PBS; 50µl/well) auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneut dreimaligem Waschen mit PBST erfolgte die Detektion. Dazu wurden je 50µl

Detektionsreagenz in die *wells* gegeben und die Proben im Dunkeln bei RT auf den Schüttler gestellt. Bei ausreichendem Farbumschlag (nach 1-10min) wurde die Reaktion mit 2,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption bei 490nm im ELISA-Reader (*μQuant*; BioTek Instruments Inc., Vermont) gemessen. Die Bestimmungen erfolgten mindestens mit Zweifachansätzen.

Versuche, die mit 5F4 Fab durchgeführt wurden, erfolgten mit nur einem Inkubationsschritt für beide Antikörper. Dazu wurden Erst- und Zweitantikörper zunächst für 15min bei RT zusammen inkubiert und anschließend auf das geblockte Antigen (s.o.) gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (150μl/*well*) erfolgte direkt die Detektion.

#### **3.2.1.1.2 Kompetitiver ELISA**

Die Beschichtung mit Antigen für den kompetitiven ELISA erfolgte in einer Konzentration, bei der eine Bindung im Standard-ELISA sicher nachgewiesen werden konnte, die sich aber noch nicht in der Sättigung befand. Dazu wurden 50μl der Antigenverdünnung in mehrere *wells* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte (*Nunc-ImmunoModule F-8 Maxisorp*, NUNC, Dänemark) pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die *wells* wie im Standard-ELISA beschrieben geblockt. Vom kompetitiven Antigen wurde eine Verdünnungsreihe mit PBS angesetzt und diese für 15min bei RT mit Erstantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf das geblockte Antigen gegeben und für zwei bis drei Stunden bei RT auf den Schüttler gestellt. Waschschrte, Inkubation mit Zweitantikörper und Detektion erfolgten wie im Standard-ELISA. Bei Versuchen mit 5F4 Fab wurde der Zweitantikörper direkt zu der Lösung aus kompetitivem Antigen und Erstantikörper gegeben.

#### **3.2.1.2 SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*)**

Für die eindimensionale Gelelektrophorese wurden diskontinuierliche SDS Gele von 1mm Dicke verwendet. Zum Einsatz kamen 3 bzw. 4%ige Sammelgele sowie 6 bzw. 10%ige Trenngele.

Die zu untersuchenden Proben wurden auf die gewünschte Konzentration mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und im Verhältnis 1:5 mit 5xSDS-Probenpuffer versetzt. Proben mit DTT-haltigem Probenpuffer wurden für 10min bei 95°C erhitzt. Proben mit selbigem Puffer ohne DTT wurden unverändert belassen. Die fertigen Proben wurden zusammen mit einem Proteinstandard (*Precision Plus Protein Standard „All blue“*, BioRad Laboratories GmbH, München) auf ein zuvor gegossenes Gel aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte in

einer Elektrophoresekammer (*Mini-Trans Blot Cell*, BioRad Laboratories GmbH, München) mit SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 150V im Sammelgel und 200V im Trenngel.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Silber- oder Coomassiefärbung (3.2.1.3 bzw. 3.2.1.4) direkt im Gel angefärbt oder für einen immunologischen Nachweis auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (3.2.1.5).

### **3.2.1.3 Coomassie-Färbung**

Zum Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau wurde das SDS-Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese in eine Färbeschale gelegt und über Nacht bei RT auf dem Schüttler mit Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

Für eine Langzeitaufbewahrung des Gels wurde dieses in einem Gelrockner (*GelAir Dryer*, BioRad Laboratories GmbH, München) nach Herstellerangaben zwischen zwei Blättern Cellophanfolie getrocknet.

### **3.2.1.4 Silberfärbung**

Die Färbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel mittels Silberfärbung erfolgte mit dem *PageSilver™ Silver Staining Kit* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach dem Protokoll für maximale Sensitivität.

### **3.2.1.5 Westernblot und Immunodetektion**

Zur immunologischen Detektion wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine (siehe 3.2.1.2) mittels Westernblot auf eine Nitrocellulosemembran (Protran<sup>®</sup> BA 85; 0,45µm; VWR International, Hannover) transferiert. Der elektrophoretische Transfer erfolgte in einer mit Blotpuffer getränkten Kammer (*Mini-Trans Blot Cell*, BioRad Laboratories GmbH, München), in der das Gel und die Membran zwischen Blotpapier (MN 218B; Machery Nagel GmbH, Düren) und zwei Schwämme geklemmt wurde, bei einer konstanten Spannung von 85V für 50min bei 4°C.

Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst für eine Stunde bei RT mit Polymerblocker geblockt (Roti-Block; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und anschließend bei 4°C über Nacht mit Erstantikörper inkubiert (5F4 IgM 1:2000 in PBS). Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurde die Membran fünf Mal 5min mit PBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Zweitantikörper (Anti-Maus-HRP 1:10.000 in

PBS) für eine Stunde bei RT. Nach erneut fünfmaligem Waschen mit PBST wurde die Membran nach Herstellerangaben mit Substrat (*SuperSignal West Pico*; Perbio, Bonn) benetzt und zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Filmkassette gelegt. Die Detektion erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (*Kodak BioMax Light Film*, Sigma Aldrich, Taufkirchen) mit variablen Expositionszeiten.

### **3.2.1.6 BCA-Test**

Zur Bestimmung des Proteingehaltes verschiedener Proben unbekannter Konzentration wurde das *BC Assay protein Quantitation Kit* (Uptima Interchim, Montluçon) verwendet. Die darin enthaltenen Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:50 gemischt um das BCA-Reagenz zu erhalten. Jeweils 10µl der Proteinprobe unbekannter Konzentration wurden in eine *96-well*-Mikrotiterplatte (nicht steril, unbehandelt; VWR International, Hannover) pipettiert und mit 200µl BCA-Reagenz versetzt. Die Bestimmungen erfolgten in Dreifachansätzen. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C und die anschließende Messung der Absorption bei 560nm im *ELISA-Reader* (*µQuant*; BioTek Instruments Inc., Vermont). Zusätzlich zu den Proteinproben unbekannter Konzentration wurde eine BSA-Standardreihe mit bekannten Konzentrationen (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000µg/ml in dH<sub>2</sub>O) wie oben beschrieben analysiert. Die daraus ermittelte Eichgerade wurde zur Abschätzung der Proteinkonzentration in den Proben verwendet.

### **3.2.1.7 Kopplung an Katalase**

Die Kopplung des TnS-Peptides an Katalase erfolgte mittels MBS (Perbio, Bonn) als *Crosslinker*. 24mg Katalase (aus Rinderleber; Sigma Aldrich, Taufkirchen) wurden in 0,9ml Kopplungspuffer (5mM EDTA in PBS; pH 7,2), sowie 3,14mg MBS in 0,1ml DMSO (Sigma Aldrich, Taufkirchen) gelöst. Beide Ansätze wurden zusammen gegeben und für eine halbe Stunde bei RT und leichter Rotation inkubiert. Mithilfe einer *Zeba<sup>TM</sup> Desalt Spin Column* (Perbio, Bonn) wurde der MBS-Überschuss anschließend wieder entfernt. Die Säule wurde dafür nach Herstellerangaben mit Kopplungspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Probe geladen und bei 1000xg für 2min durch die Säule zentrifugiert. 1,6mg Cystein-gekoppeltes TnS-Peptid (TnS-Cys; siehe 3.1.5) wurden in 200µl 20%igem DMSO/PBS gelöst und für 30min bei RT und leichter Rotation mit der MBS-gekoppelten Katalase inkubiert. Um ungekoppeltes Peptid wieder zu entfernen wurde anschließend mithilfe einer Dialysekassette (MWCO: 10kDa; Perbio, Bonn) gegen zwei Liter PBS dialysiert. Das Konjugat wurde bei -20°C gelagert.

### **3.2.1.8 Enzymatischer Verdau**

Zu einer Lösung von 1mg/ml BSM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden 1% (v/v) Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Pasching) sowie 0,046% (w/v) Papain (aus Papaya latex; Sigma Aldrich, Taufkirchen) gegeben und diese bei RT inkubiert. Die Hälfte der Lösung wurde nach drei, die andere Hälfte nach sechs Stunden bei -20°C eingefroren.

### **3.2.1.9 Aufreinigung des 5F4 Fab-Fragmentes mittels Affinitätschromatographie**

Ein 50ml-Aliquot der periplasmatischen Fraktion einer *E. coli*-Fermentation des 5F4 Fab-Fragmentes (Labor von Prof. Schachner) wurde über Nacht bei 4°C in einem Dialyseschlauch (MWCO: 12-14kDa; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gegen fünf Liter Waschpuffer dialysiert um einen Pufferaustausch für die anschließende Aufreinigung zu bewirken. Da das rekombinant hergestellte Fab-Fragment einen c-terminalen StrepII-tag trägt, konnte die Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin erfolgen. Dazu wurde eine *Strep-Tactin superflow high capacity* Matrix (IBA GmbH, Göttingen) in eine *gravity flow*- Chromatographiesäule (Volumen 10ml; Perbio, Bonn) gefüllt und nach Herstellerangaben mit Waschpuffer äquilibriert. Das Fab-Dialysat wurde anschließend steril gefiltert auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde gesammelt. Nach mehreren Waschschritten mit 8 x 10ml Waschpuffer erfolgte die Elution des Fab-Fragmentes mit 20ml Elutionspuffer in drei Fraktionen von 3ml bzw. einer Fraktion von 11ml am Schluss. Die Waschschrritte und Eluatfraktionen wurden einzeln abgefangen. Alle Schritte erfolgten bei einer Temperatur von 4°C.

Zur Analyse der Reinheit wurden Rohextrakt, Durchfluss, Waschfraktionen sowie Eluatfraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie-Blau angefärbt (siehe 3.2.1.3). Der Fab-Gehalt im Eluat wurde mittels BCA-Test (siehe 3.2.1.6) bestimmt.

### **3.2.1.10 Immunfärbung an histologischen Gewebeschnitten**

Objektträger mit transversalen Cerebellumschnitten von sieben Tage alten Wildtyp-Mäusen (Labor von Prof. Schachner) wurden zunächst bei 37°C aufgetaut und anschließend für 30min bei 80°C in einer Natriumcitratlösung (10mM Natriumcitrat, pH 9) inkubiert. Nach Abkühlung auf RT und kurzer Spülung mit PBS wurden die Schnitte für eine Stunde in Blocklösung gestellt. Es folgte die Inkubation mit Erstantikörper (in Verdünnungspuffer) bei RT über Nacht in einer Feuchtigkeitskammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 15min mit PBS gewaschen und für zwei Stunden bei RT mit

dem passenden Zweitantikörper (in Verdünnungspuffer) inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einer vor Licht geschützten Feuchtigkeitskammer. Anschließend wurden die Schnitte erneut drei Mal 15min mit PBS gewaschen und für 10min in ein Färbebad mit Bis-Benzimid (5µg/ml Bis-Benzimid in PBS) gestellt. Nach kurzer Spülung mit PBS (ca. 5min) wurden die Schnitte mit *Fluoromount* (Biozol GmbH, Eching) eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte am Laser Mikroskop (*Olympus Fluoview FV1000*, Olympus Europa GmbH, Hamburg) mithilfe der Software *FV10-ASW 2.1* (Olympus Europa GmbH, Hamburg).

### **3.2.1.11 Kopplung des 5F4 Antikörpers an magnetische *beads***

10mg *Dynabeads® M-270 Epoxy* (Dyna-Biotech, Oslo) wurden mithilfe eines Magneten vier Mal fünf Minuten nach Herstellerangaben gewaschen und in 300µl Natriumphosphatpuffer resuspendiert. 300µl 5F4 IgM Antikörper (~0,2mg) wurden mit einem Zentrifugationsfilter (MWCO: 30kDa; Vivaspin Ltd., Stonehouse) von ihrem Puffer getrennt, in 250µl Natriumphosphatpuffer resuspendiert und mit den gewaschenen *beads*, sowie mit 275µl Ammoniumsulfatpuffer versetzt. Zum Koppeln wurden die *beads* 24 Stunden bei 4°C und leichter Rotation inkubiert. Es folgten vier Waschschrte, anschließend wurden die gekoppelten *beads* für eine Stunde bei 4°C und leichter Rotation mit Blockpuffer geblockt. Nach dem Blocken wurden die *beads* erneut sechs Mal gewaschen, in 600µl TBS suspendiert und bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

## **3.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.2.1 Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli***

Der rekombinante *E. coli* Stamm ER2738 (*Phage Display Library Kit*, New England Biolabs Inc., Frankfurt) wurde auf Tetracyclin-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die gewachsene Stammkultur wurde bei 4°C im Dunkeln über einen Zeitraum von 8 Wochen gelagert.

Zum Anlegen einer Flüssigkultur wurde eine Einzelkolonie der Stammkultur gepickt und in 5ml LB-Medium überimpft. Die angeimpfte Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37°C und leichter Rotation inkubiert. Für die Phagenproduktion (siehe 3.2.2.2.2) wurde die Übernachtskultur auf die benötigte Menge mit LB-Medium ergänzt und bei 37°C auf eine optische Dichte von 0,4 (gemessen bei 600nm im Photometer) kultiviert.

### 3.2.2.2 Phage-display

Die Suche nach Glykomimetika für das Tn Antigen erfolgte mithilfe von randomisierten Phagenbibliotheken, wobei sowohl eine Bibliothek mit linearen (*Ph.D.-12™*, New England Biolabs Inc., Frankfurt) als auch mit cyclischen (*Ph.D.-C7C™*, New England Biolabs Inc., Frankfurt) Peptiden durchsucht wurde.

#### 3.2.2.2.1 Phagenselektion (*panning*)

15µl Phagenbibliothek wurden zu 200µl 5F4-gekoppelten *beads* (siehe 3.2.1.11) gegeben und 20 min bei RT unter ständigem Invertieren inkubiert. Ungebundene Phagen wurden anschließend durch zehnfaches Waschen mit 0,1% TBST entfernt. Die *beads* wurden dabei mithilfe eines Magneten im Reagenzgefäß zurückgehalten. Im letzten Waschvorgang wurde die Suspension in zwei gleich große Aliquots geteilt. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgte in einem Aliquot mit 5mg/ml GalNAc, in dem anderen mit 1mg/ml 5F4 IgM-Antikörper. Dazu wurden die *beads* in 100µl der Zucker- bzw. Antikörper-Lösung suspendiert und für 30min bei RT auf dem Rotor inkubiert. Für alle weiteren Schritte wurden die Ansätze getrennt behandelt. Das Eluat wurde amplifiziert und die Konzentration der Phagen mittels Titration ermittelt (siehe 3.2.2.2.2). Je  $2 \times 10^{11}$  pfu (*plaque forming unit*) wurden für ein weiteres *panning* verwendet. Dazu wurden die zucker- bzw. antikörpereluierten Phagen mit je 100µl gekoppelten *beads* wie oben beschrieben inkubiert. Nach zehnmalem Waschen mit 0,3% TBST erfolgte die Elution mit GalNAc bzw. 5F4 IgM-Antikörper, wobei jeweils das gleiche Elutionsreagenz wie im ersten *panning* verwendet wurde. Es folgte die erneute Amplifizierung und Titration der Phagen. Anschließend wurde ein drittes *panning* unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wobei 0,5% TBST als Waschpuffer verwendet wurde. Die eluierten Phagen aus dem dritten *panning* wurden direkt titriert. Je 10 Phagenklone wurden gepickt und die Basensequenz des pIII-Fusionspeptides mittels Sequenzierung bestimmt (3.2.2.2.3 bzw. 3.2.2.3).

#### 3.2.2.2.2 Amplifizierung und Titration

90µl Eluat wurden in 20ml *E. coli* Flüssigkultur gegeben und bei 37°C für viereinhalb Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Die amplifizierten Phagen wurden gemäß Herstellerprotokoll mittels Zentrifugation und Fällung durch PEG/NaCl aufgereinigt und in 200µl TBS gelöst.

Für die Titration wurden Verdünnungen des Amplifikats von  $1:10^8$  –  $1:10^{10}$  ( $1:10^5$  –  $1:10^7$  für die Titration des Eluats nach dem dritten *panning*) angesetzt und diese mit je 200µl *E. coli* Flüssigkultur für 5min bei RT inkubiert. Die infizierten Kulturen wurden mit je 3ml geschmolzenem Top-Agar (45°C) versetzt und auf vorgewärmtem IPTG/XGal Agar gleichmäßig verteilt. Nach Aushärten des Top-Agars wurden die Platten bei 37°C über Nacht kultiviert. Die blauen Kolonien wurden ausgezählt und daraus die pfu/µl ermittelt.

### **3.2.2.2.3 DNA-Isolation**

Zehn Plaques der zucker- bzw. antikörpereluierten Phagen wurden mithilfe einer Pipettenspitze von einer weniger als 100 Kolonien umfassenden Platte gepickt und in je 2ml *E. coli* Flüssigkultur überführt. Nach viereinhalbstündiger Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler wurden die Kulturen 5min bei 10.000rpm/4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut für 1min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Je 1ml Überstand wurde mit 200µl PEG/NaCl versetzt und über Nacht präzipitiert, der restliche Überstand wurde für den Phagen-ELISA (siehe 3.2.2.2.4) verwendet bzw. bei 4°C gelagert. Das Präzipitat wurde am folgenden Tag 20min bei 10.000rpm/4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die amplifizierten Phagen im Bodensatz wurden in Iodid-Puffer (je 100µl) suspendiert und anschließend mit 250µl 100%igem Ethanol versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch 15min bei 14.000rpm/4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Bodensatz wurde mit 70%igem Ethanol (200µl/Tube) gewaschen und unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde die ausgefällte DNA im Bodensatz mit *-96 gIII Primer* (New England Biolabs Inc., Frankfurt) versetzt und zur Sequenzierung gegeben (siehe 3.2.2.3).

### **3.2.2.2.4 Phagen-ELISA**

Um die Bindung der selektierten Phagen an den 5F4 IgM Antikörper näher zu charakterisieren, wurde zunächst ein ELISA durchgeführt, bei dem das unverdünnte Amplifikat verwendet wurde. Eine 96-well-Mikrotiterplatte (*Nunc-ImmunoModule F-8 Maxisorp*, NUNC, Dänemark) wurde dazu in Dreifachansätzen mit 50µl/well Amplifikat über Nacht beschichtet und anschließend für mindestens eine Stunde bei RT mit 1%igem BSA geblockt (100µl/well). Es folgte die Inkubation mit 50µl/well 5F4 IgM (10µg/ml in Blockpuffer) über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit 100µl/well PBST wurden die Phagen eine Stunde bei RT mit 50µl/well Anti-Maus-HRP inkubiert (1:5000 in Blockpuffer). Die wells wurden erneut dreimal mit PBST gewaschen bevor die Detektion erfolgte.

Die vier Phagenklone, die die höchste Absorption zeigten, wurden erneut amplifiziert und titriert (siehe 3.2.2.2.2). Es folgte ein zweiter ELISA, bei dem das Amplifikat in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt wurde. Bei den selektierten Phagen der linearen Bibliothek wurde dazu obiges Protokoll verwendet. Bei denen der cyclischen Bibliothek wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt: Die Phagenverdünnungen wurden auf die mit 10µg/ml 5F4 IgM beschichteten und geblockten *wells* gegeben; als Zweitantikörper wurde 1:5000 Anti-M13-HRP verwendet. Die übrigen Schritte erfolgten wie im obigen Protokoll.

### 3.2.2.3 Sequenzierung

Die Phagen-DNA wurde mit 10µl 0,5pM/µl *-96 gIII Primer* (in ddH<sub>2</sub>O; New England Biolabs Inc., Frankfurt) versetzt. Die Bestimmung der Basensequenz erfolgte mittels automatischer Sequenzierung im hauseigenen Sequenzierlabor.

## 3.2.3 Zellkultur

### 3.2.3.1 Beschichtung von Platten

Die Kultivierung von Primärzellen erfolgte in mit Poly-L-Lysin (PLL; Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneurone; Sigma Aldrich, Taufkirchen) oder Poly-L-Ornithin (PLO; Motoneurone; Sigma Aldrich, Taufkirchen) beschichteten 48*well*-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen). Dazu wurden die Platten mit 0,01%iger PLL- bzw. 0,001%iger PLO-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung entfernt und die Platten für eine halbe Stunde unter UV-Licht getrocknet.

Für die Neuritenwachstumsexperimente erfolgte auf einigen *wells* eine Beschichtung mit 5F4 Antikörper oder Glykomimetikum. Dazu wurden die Substanzen mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und über Nacht bei 4°C in das entsprechende PLL- bzw. PLO-beschichtete *well* gegeben. Kurz vor Aussaat der Zellen wurden die Lösungen abgesaugt. Tab. 6 zeigt die verwendeten Konzentrationen.

<b>Beschichtung</b>	<b>Konzentration</b>
Glykomimetikum (TnS)	200, 100 und 50µg/ml
5F4 IgM	10µg/ml
5F4 Fab	10µg/ml

Tab. 6: Konzentration von Glykomimetikum und Antikörper zur Beschichtung der Zellkulturplatten

### **3.2.3.2 Primärkultur von Kleinhirnneuronen**

Sechs bis sieben Tage alte Wildtyp-Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Nach Entfernung von Fell und Schädelkalotte wurden die Kleinhirne entnommen und in eiskaltes HBSS (PAA Laboratories GmbH, Pasching) gelegt. Unter einem Stereomikroskop wurden Fremdgewebe, Blutgefäße und restliche Hirnhaut entfernt und die sauber präparierten Kleinhirne mit einer feinen Schere in drei Teile geschnitten. Die Gewebestücke wurden mit HBSS (5ml HBSS/drei Kleinhirne) gewaschen und anschließend für eine viertel Stunde bei RT mit Trypsin/DNase-Lösung (1ml/drei Kleinhirne) angedaut. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit HBSS. Nach Zugabe der DNase I-Lösung (1ml/drei Kleinhirne) wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit drei abgerundeten Pasteurpipetten abnehmenden Durchmessers homogenisiert. Das Homogenat wurde in HBSS verdünnt (3ml/drei Kleinhirne) und 15min bei 100xg/4°C zentrifugiert. Die pelletierten Neurone wurden in vorgewärmtem X1-Medium (5ml/drei Kleinhirne) resuspendiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurden die Neurone je nach Experiment auf die gewünschte Zellzahl in Medium verdünnt und ausgesät.

### **3.2.3.3 Primärkultur von Motoneuronen**

Ein 14 Tage trächtiges Wildtyp-Mausweibchen wurde mittels CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Der Bauch wurde mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert und anschließend erst die Bauchhaut, dann das Peritoneum eröffnet. Beide Uterushörner wurden entnommen und in eiskaltes Ham's F12 (PAA Laboratories GmbH, Pasching) überführt. Die Embryonen wurden frei präpariert, dekapitiert und auf einer Silikonoberfläche in Ham's F12 mit der dorsalen Seite nach oben fixiert. Unter dem Stereomikroskop wurden mit einer sehr feinen Schere zwei Schnitte rechts und links des Wirbelkanals gesetzt. Die Hautschicht über dem Wirbelkanal wurde abpräpariert und der darunter liegende Rückenmarksstrang vorsichtig entnommen. Nach der Präparation aller Embryonen wurden die Rückenmarksstränge in drei Teile geschnitten. Die Gewebestücke wurden mit 5ml Ham's F12 gewaschen und anschließend für eine halbe Stunde bei 37°C mit 1ml Trypsin/Collagenase-Lösung inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 5ml Ham's F12. Nach Zugabe von 1ml DNase I-Lösung wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit drei abgerundeten Pasteurpipetten abnehmenden Durchmessers homogenisiert. Das Homogenat wurde in 5ml Ham's F12 verdünnt und zur Aufreinigung auf 4ml eines 25%igen Optiprep-Gradienten (60% Iodixanol [Progen Biotech, Heidelberg] in Ham's F12) geschichtet. Nach

20minütiger Zentrifugation bei 400xg/4°C wurden die Zellen aus der Interphase zwischen Medium und Optiprep entnommen und in 5ml Ham's F12 gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein BSA-Kissen (3,5% BSA in Ham's F12) geschichtet und für 10min bei 120xg/4°C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 5ml vorgewärmtem Motoneuron-Medium resuspendiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Neurone wurden je nach Experiment auf die gewünschte Zellzahl in Medium verdünnt und ausgesät.

#### **3.2.3.4 Primärkultur von Hinterwurzelganglienneuronen**

Sechs bis sieben Tage alte Wildtyp-Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Das Fell wurde auf der dorsalen Seite abpräpariert und das Rückgrat entnommen. Dieses wurde mit der dorsalen Seite nach oben auf einer mit Ham's F12 (PAA Laboratories GmbH, Pasching) überschichteten Silikonoberfläche fixiert und unter ein Stereomikroskop gelegt. Mit der Schere wurde ein medianer Schnitt an der Wirbelsäule gesetzt und anschließend der Wirbelkanal geöffnet ohne dabei das Rückenmark zu verletzen. Die Hinterwurzelganglien wurden mit einer feinen Pinzette gepickt und in eiskaltes Ham's F12 überführt. Es folgte ein Waschschrift mit 5ml Ham's F12, wobei zum Entfernen des Mediums jeweils eine kurze Zentrifugation (*short spin*, ca. 10sec) nötig war. Danach wurden die Neurone für eine halbe Stunde bei 37°C mit 1ml Trypsin/Collagenase-Lösung behandelt und anschließend erneut zwei Mal wie oben beschrieben gewaschen. Nach Zugabe von 1ml DNase I-Lösung wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit drei abgerundeten Pasteurpipetten abnehmenden Durchmessers homogenisiert. Das Homogenat wurde in 10ml Ham's F12 verdünnt und 5min bei 100xg/4°C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 5ml vorgewärmtem DRG-Medium gelöst und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Neurone wurden je nach Experiment auf die gewünschte Zellzahl in Medium verdünnt und ausgesät.

#### **3.2.3.5 Neuritenwachstumsexperimente**

In Neuritenwachstumsexperimenten wurde der Einfluss von Glykomimetikum, GalNAc und 5F4 Antikörper auf die Gesamtneuritenlänge von einzelnen Neuronen untersucht.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.3.2 bis 3.2.3.4 beschrieben präpariert und mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$ /ml für Kleinhirn- bzw.  $5 \times 10^4$  für Hinterwurzelganglien- und Motoneurone auf mit PLL bzw. Glykomimetikum oder Antikörper beschichtete 48well-Platten ausgesät. Es folgte die Kultivierung der Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90%iger

Luftfeuchtigkeit, wobei GalNAc in einer Endkonzentration von 100µg/ml ca. einer Stunde nach Aussaat löslich dem Medium hinzugefügt wurde. Nach 20-24 Stunden wurden die Zellen durch Zugabe von 25% Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5%) für eine Stunde bei RT fixiert, zweimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und für eine weitere Stunde mit Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zwei bis drei Mal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen um Färbereste zu entfernen. Anschließend wurden die Platten bei RT getrocknet.

Die Auswertung erfolgte am Kontron Mikroskop (*Axiovert 135*, Carl Zeiss AG, Oberkochen) mit der Software *Axiovision (Release 4.6*, Carl Zeiss AG, Oberkochen) wobei pro Behandlung die Gesamtneuritenlänge von ~100 Kleinhirn- oder Motoneuronzellen bzw. ~50 Hinterwurzelganglienzellen vermessen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2007.

### **3.2.3.6 Bestimmung des Zellüberlebens von Kleinhirnneuronen**

Die präparierten Kleinhirnneurone (siehe 3.2.3.2) wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml auf PLL beschichtete 48-*well*-Platten ausgesät und 20-24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am folgenden Tag wurden dem Medium in Dreifachansätzen Glykomimetikum (Endkonzentration 200µg/ml), GalNAc (Endkonzentration 100µg/ml) oder 5F4-Antikörper (Endkonzentration 10µg/ml) hinzugefügt und die Neurone für weitere 20-24 Stunden kultiviert.

Die Quantifizierung der überlebenden Zellen erfolgte mit der Neutral-Rot-Methode. Dazu wurden die Neurone für eine halbe Stunde mit 10µl/*well* 0,4% (w/v) Neutral-Rot inkubiert, anschließend das Medium vorsichtig entfernt und 200µl/*well* Fixierlösung (0,5% Glutaraldehyd in HBSS) hinzugegeben. Nach kurzer Inkubation wurde die Fixierlösung wieder entfernt und die Zellen für eine halbe Stunde bei RT mit 300µl/*well* Lysepuffer (1% Essigsäure, 50% Ethanol in dH<sub>2</sub>O) behandelt. Anschließend wurde die Absorption bei 540nm im ELISA-Reader (*µQuant*; BioTek Instruments Inc., Vermont) bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung von Glykomimetika für das Tn-Antigen

#### 4.1.1 Sequenzierte Phagenklone

Jeweils zehn Phagenklone wurden nach der dritten *panning*-Runde zur Sequenzierung gegeben, um die Basensequenz des mit dem Hüllprotein pIII fusionierten Peptids zu ermitteln. Verwendet wurde dafür der *-96 gIII Primer*, dessen Erkennungssequenz 96 Nukleotide hinter der pIII-Sequenz liegt. Die erhaltenen komplementären Sequenzen wurden in die Matrizensequenz zurück übersetzt und daraus die Aminosäuresequenz ermittelt. Tab. 7 zeigt die Aminosäuresequenzen der Peptide aus den verschiedenen Phagenklonen.

12mer lineare Peptidbibliothek		7mer cyclische Peptidbibliothek	
LA1	T H H P P G Y F A A H S	CA1	Q P H E T M R
LA2	T H H P P G Y F A A H S	CA2	F S C S H K W
LA3	H G A E C A D G C D G M	CA3	<sup>2</sup>
LA4	<sup>1</sup>	CA4	P P W P W P P
LA5	T H P G Q T N K P N Y Y	CA5	Y S P M P S A
LA6	<sup>1</sup>	CA6	P P W P W P P
LA7	S L H T D P K S Y P P F	CA7	P E P L F A F
LA8	T H H P P G Y F A A H S	CA8	L H P T P W M
LA9	H L Q L V H P Y M D F L	CA9	<sup>2</sup>
LA10	Y H G Y E M Q P A K G T	CA10	L H P T P W M
LS1	S H E Y L F L S Q P M V	CS1	L P S R V S T
LS2	<sup>1</sup>	CS2	R A A T S S L
LS3	<sup>1</sup>	CS3	<sup>2</sup>
LS4	H S G V E H P Y M S P P	CS4	<sup>2</sup>
LS5	<sup>1</sup>	CS5	<sup>2</sup>
LS6	Tn-Peptid S*	CS6	P S Y S S L P
LS7	D H T T A C A S P D C W	CS7	T E H H T R S
LS8	I S I N P L Q W Y L R T	CS8	<sup>2</sup>
LS9	A Y D Y H M P W P Y P L	CS9	F H D R L P Q
LS10	A Y D Y H M P W P Y P L	CS10	R H P T P W M

Tab. 7: Aminosäuresequenzen der pIII-Fusionspeptide aus den selektierten Phagenklonen der linearen und cyclischen Phagenbibliothek. Die Aminosäuren Histidin (H) und Prolin (P) sind farblich markiert. <sup>1</sup> Sequenz aus dem Chromatogramm nicht lesbar, <sup>2</sup> Kein pIII-Fusionspeptid vorhanden. \*Peptidsequenz entfernt, siehe Erklärung/ Vereinbarung S.72

Leider konnte durch die Sequenzierung nicht für alle untersuchten Phagenklone die Aminosäuresequenz des Peptids ermittelt werden. Die Sequenzen betroffener Phagenklone der linearen Bibliothek konnten dabei aufgrund zu geringer DNA-Mengen nicht aus dem Chromatogramm erschlossen werden. Bei betroffenen Phagenklonen der cyclischen Bibliothek konnte die Sequenz zwar ermittelt werden, dort war aber kein Kopplungspeptid ausfindig zu machen. Möglicherweise liegt hier trotz konsequenter Einhaltung des Herstellerprotokolls eine Kontamination mit Wildtyp-Phagen vor.

Unter den erfolgreich sequenzierten Peptiden zeigte sich keine eindeutige Konsensussequenz, weder in der linearen, noch in der cyclischen Bibliothek. Auffällig häufig enthielten die Peptidsequenzen die Aminosäuren Prolin und Histidin (Zur besseren Übersicht in Tab. 7 farblich markiert). Wiederholt zeigten sich die Sequenzen THHPPGYFAAHS (LA1, 2 und 8) und AYDYHMPWPYPL (LS9 und 10) unter den linearen und die Sequenzen PPWPWPP (CA4 und 6) und LHPTPWM (CA8 und 10) unter den cyclischen Peptiden.

#### 4.1.2 Sequenzierte Phagenklone im ELISA

Für eine grobe Bindungsanalyse wurde das unverdünnte Amplifikat der Phagenklone auf eine ELISA-Platte beschichtet und mit dem Tn-Antikörper 5F4 detektiert. Abb. 7 und Abb. 8 zeigen die für die verschiedenen Phagenklone gemessene Absorption im Photometer.

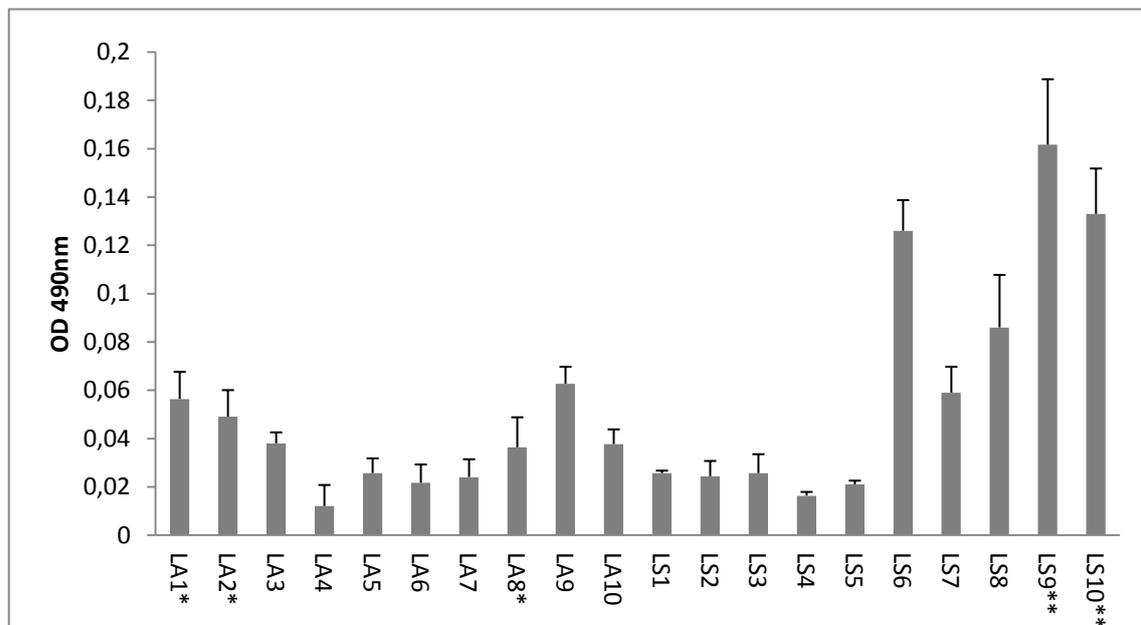
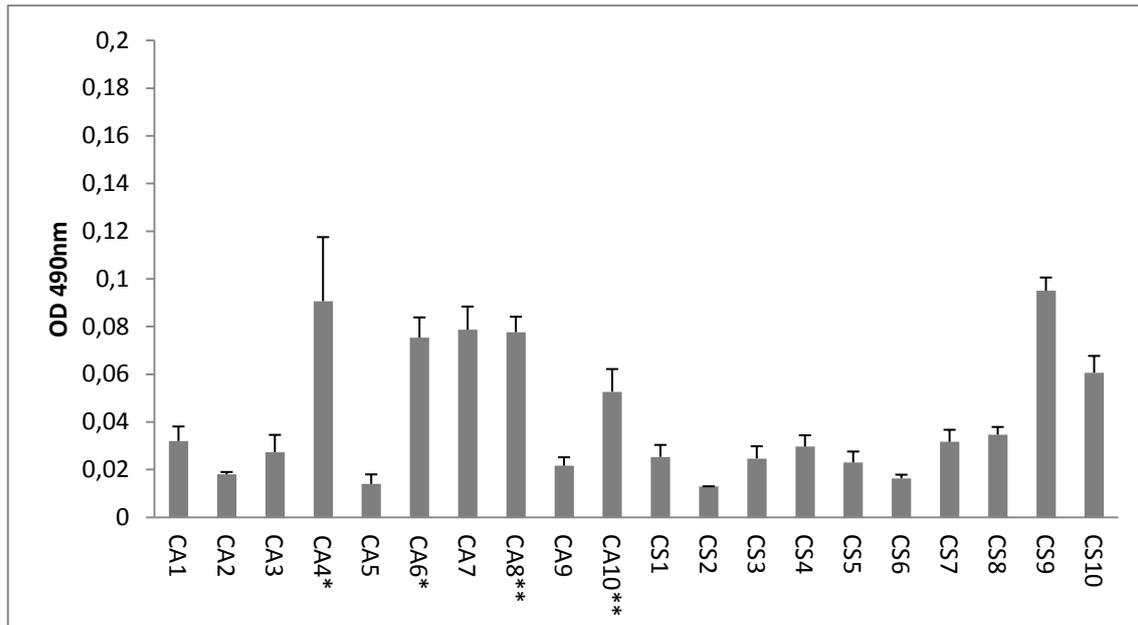


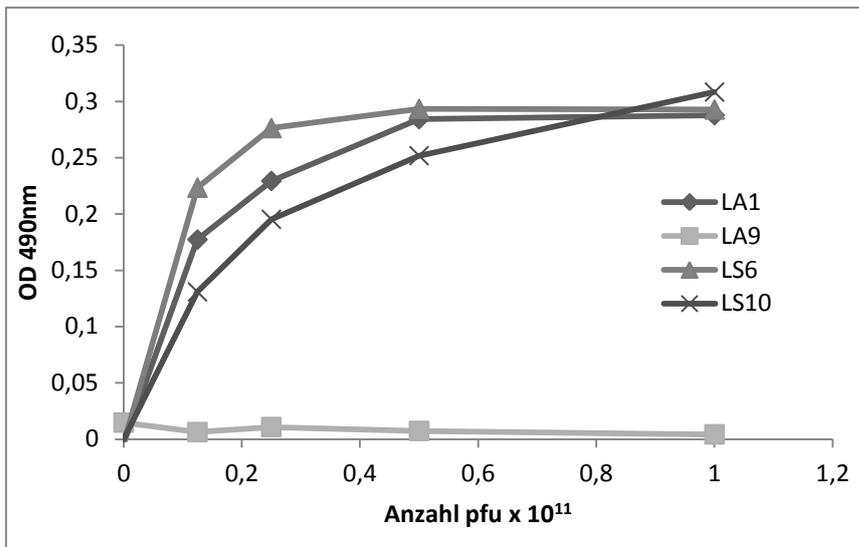
Abb. 7: Bindung von 5F4-IgM an sequenzierte Phagenklone (unverdünntes Amplifikat) der linearen Phagenbibliothek im ELISA. Eine ELISA-Platte wurde mit unverdünntem Amplifikat aus dem dritten *panning* beschichtet und dieses mit 5F4 IgM sowie Anti-Maus-HRP detektiert. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte + SD von Dreifachansätzen abzüglich PBS-Hintergrund. Die mit \* bzw. \*\* markierten Phagenklone enthalten das gleiche pIII-Fusionspeptid.



**Abb. 8: Bindung von 5F4 IgM an sequenzierte Phagenklone (unverdünntes Amplifikat) der cyclischen Phagenbibliothek im ELISA.** Eine ELISA-Platte wurde mit unverdünntem Amplifikat aus dem dritten *panning* beschichtet und dieses mit 5F4 IgM sowie Anti-Maus-HRP detektiert. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte + SD von Dreifachansätzen abzüglich PBS-Hintergrund. Die mit \* bzw. \*\* markierten Phagenklone enthalten das gleiche pIII-Fusionspeptid.

Für die Phagenklone mit der höchsten Absorption wurde trotz unbekannter Konzentration eine gute Bindung an den 5F4 Antikörper angenommen. Die Beobachtung, dass die in der Sequenzierung als gleich identifizierten Phagenklone ähnliche Absorptionswerte erzielten, spricht sogar für eine in etwa konstante Anzahl amplifizierter Phagen. Die höchsten Absorptionswerte zeigten die Phagenklone LS9/LS10 und LS6 aus der linearen, sowie CA4/CA6 und CS9 aus der cyclischen Phagenbibliothek.

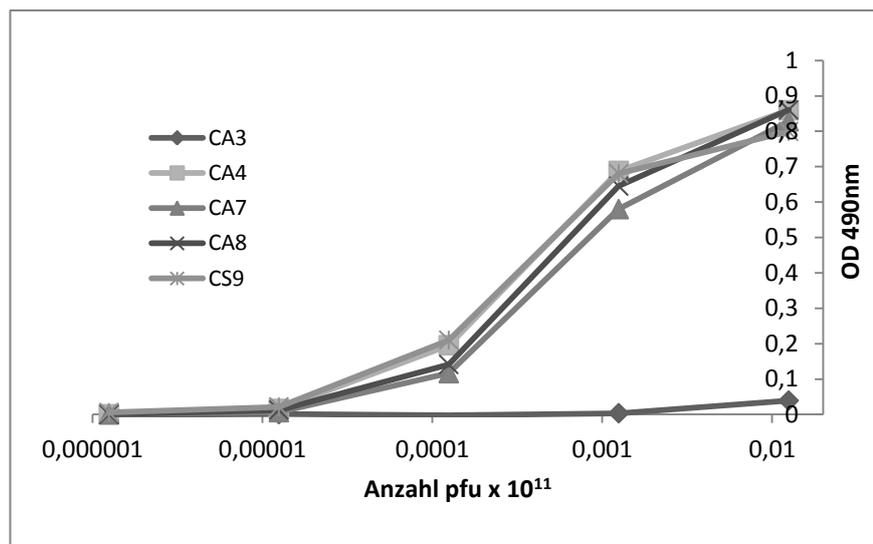
Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden je vier Phagenklone mit hohen Absorptionswerten neu amplifiziert und die pfu (plaque forming Unit) bestimmt. Verdünnungsreihen wurden angelegt und die Bindung der Klone an den 5F4 Antikörper erneut im ELISA beurteilt. Die Klone der linearen Phagenbibliothek wurden dabei mittels Standard-ELISA, die der cyclischen mittels Sandwich-ELISA untersucht. Von den Phagen mit linearem Peptid wurden die Klone LA1, LA9, LS6 und LS10 gewählt, von den Phagen mit cyclischem Peptid die Klone CA4, CA7, CA8 und CS9. Für den ELISA der cyclischen Peptide wurde zusätzlich der Phagenklon CA3 ohne pIII-Fusionspeptid (siehe Tab. 7) als Negativkontrolle amplifiziert. Abb. 9 und 10 zeigen die Bindungskurven für die ausgewählten Phagenklone.



**Abb. 9: Bindung von 5F4 IgM an selektierte Phagenklone der linearen Phagenbibliothek im ELISA.** Eine ELISA-Platte wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der Phagen beschichtet und diese mit 5F4 IgM und Anti-Maus-HRP detektiert. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus Zweifachansätzen abzüglich PBS-Hintergrund.

Unter den Klonen der linearen Phagenbibliothek konnte die Bindung von LA9 an den 5F4-IgM-Antikörper nicht reproduziert werden, alle anderen ausgewählten Phagenklone zeigten eine konzentrationsabhängige Bindungskurve. Die Affinität des Antikörpers scheint dabei für LS6 am höchsten, für LS10 am niedrigsten. Unter den Klonen der cyclischen Phagenbibliothek zeigte CA3 wie zu erwarten keine Bindung. Alle anderen Phagenklone zeigten ähnliche Bindungseigenschaften, wobei CA7 die schlechteste Affinität zu haben scheint. Die Phagen mussten für eine sinnvolle Darstellung der Bindungskurve erheblich stärker verdünnt werden, als die Phagen aus der linearen Bibliothek. Geringe Verdünnungen als die abgebildeten zeigten eine in der Sättigung befindliche Absorption.

**Abb. 10: Bindung von 5F4 IgM an selektierte Phagenklone der cyclischen Phagenbibliothek im ELISA.** Unterschiedliche Konzentrationen der Phagen wurden auf eine mit 5F4 IgM beschichtete ELISA-Platte gegeben und mit Anti-M13-HRP detektiert. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus Zweifachansätzen abzüglich PBS-Hintergrund. Die X-Achse ist logarithmisch aufgetragen.



Um eine weitere Selektion der Phagenklone zu ermöglichen, wurden die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Peptidsequenzen ermittelt. Die Homepage der Firma Schafer-N ([www.schafer-n.com](http://www.schafer-n.com)) bietet hierzu eine Eingabemaske, mit deren Hilfe eine schnelle Analyse möglich ist. Tab.8 zeigt die von dem Programm ermittelten Parameter.

Aminosäuresequenz	Phagenklon	Molekulargewicht in g/mol	Nettoladung bei pH 7	Isoelektrischer Punkt (pH bei Nettoladung 0)
THHPPGYFAAHS	LA1	1320,4	3	9,7
Tn-Peptid S*	LS6	1459,6	1	9,3
AYDYHMPWPYPL	LS10	1551,8	0	6,5
PPWPWPP	CA4	875,0	0	6,0
PEPLFAF	CA7	818,9	-1	3,3
LHPTPWM	CA8	880,1	1	9,3
FHDRLPQ	CS9	911,0	1	9,3

Tab. 8: Charakteristika der selektierten Peptidsequenzen. \*Peptidsequenz entfernt, s. Erklärung/Vereinbarung S.72

Bei der späteren Verwendung der synthetischen Peptide ist eine gute Löslichkeit in Wasser hilfreich. Unter den 5F4-bindenden Sequenzen wurden daher diejenigen mit möglichst hydrophilen Eigenschaften gesucht. Da die Sequenzen der Phagenklone LA1, LS6 und CS9 dieses Kriterium erfüllen, wurde sie für die weitere Charakterisierung ausgewählt.

#### 4.1.3 Selektierte Phagenklone im Western Blot

Im ELISA konnte eine Bindung des 5F4 IgM-Antikörpers an die Phagenklone LA1, LS6 und CS9 gezeigt werden. Aus den Ergebnissen ist jedoch nicht ersichtlich, welchen Teil des Phagenklones der Antikörper erkennt. Um eine Bindung an das pIII-Fusionspeptid zu zeigen, wurden die Phagenklone mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert.

Das pIII-Protein, an das das Peptid gekoppelt ist, umfasst etwa 70kDa (Marvin & Hohn 1969). Wie Abb.11 zeigt, konnten Banden in dieser Region für alle drei Phagenklone nachgewiesen werden. Phagenklon CA3, der kein pIII-Fusionspeptid aufweist und deshalb als Negativkontrolle verwendet wurde, zeigt keine Bande in

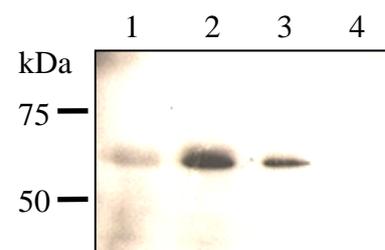


Abb. 11: Selektierte Phagenklone im Western Blot. Je 4µl des unverdünnten Amplifikats aus dem dritten *panning* wurden mit 4µl DTT-haltigem Probenpuffer und 12µl H<sub>2</sub>O versetzt, hitzedenaturiert und auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit 5F4 IgM und Anti-Maus-HRP. 1 = LS6, 2 = LA1, 3 = CS9, 4 = CA3.

entsprechender Region. Da die Phagen nicht titriert wurden, kann aus der Intensität der Banden kein Rückschluss auf die Bindungsstärke erfolgen.

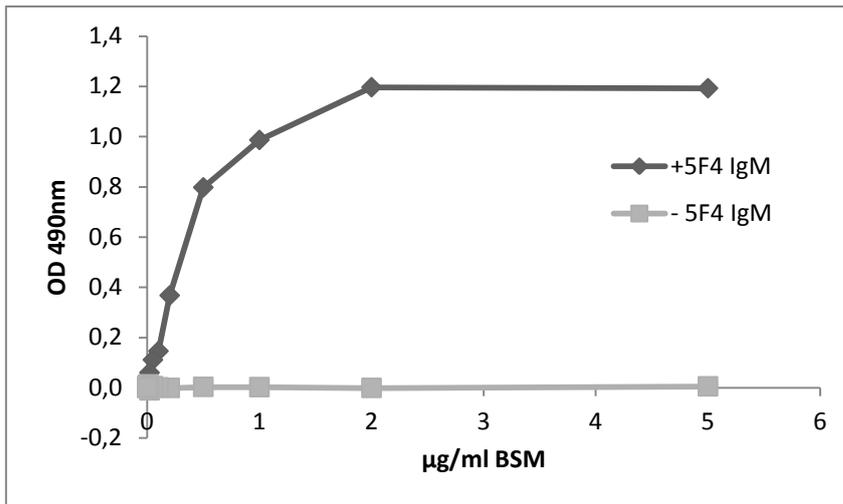
#### **4.1.4 Nachweis einer Bindung von 5F4 IgM an synthetische Peptide**

Da die Peptidsequenzen aus den Phagenklone LA1, LS6 und CS9 in ELISA und Western Blot eine gute Bindung an den 5F4 Antikörper zeigten und zudem gute Eigenschaften in Bezug auf die Löslichkeit in Wasser aufwiesen, wurden sie für eine chemische Synthese ausgewählt. Die Bestellung erfolgte bei der Firma Schafer-N. Es folgten mehrere erfolglose Versuche eine Bindung des 5F4 IgM Antikörpers an die synthetischen Peptide (im Weiteren TnA [aus Phagenklon LA1], TnS [aus Phagenklon LS6] und TnC [aus Phagenklon CS9] genannt) im Standard-ELISA nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Das Problem schien dabei weniger eine schlechte Bindung, als vielmehr die schlechte Adsorption der Peptide an die ELISA-Platte zu sein. Um einen Sandwich-ELISA zu ermöglichen wurden daher N-terminal biotinylierte Peptide bestellt. Die folgenden Versuche, die an 5F4 gebundenen Peptide mit Streptavidin-HRP nachzuweisen, brachten jedoch auch nicht die erhofften Ergebnisse, da ein starker Hintergrundeffekt auftrat (Daten nicht abgebildet). Ein Bindungsnachweis erfolgte letztendlich im kompetitiven ELISA.

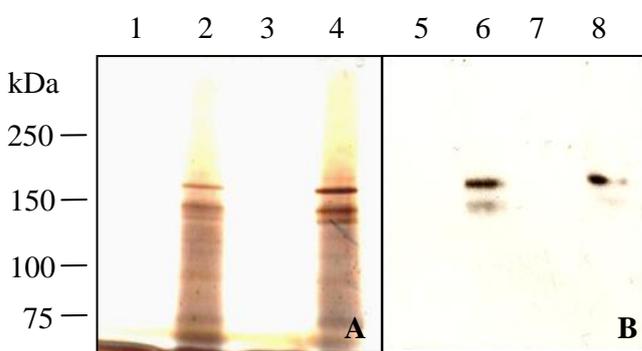
##### **4.1.4.1 BSM als Bindungspartner für 5F4 IgM**

Thurnher et al. (1993) entwickelten den 5F4 Antikörper mittels desialysiertem Schafsmucin als Immunogen und beschrieben eine allgemeine Bindung an Glykopeptide mit Tn-Epitopen. Auch das bovine submaxillare Mucin (BSM) ist als Träger zahlreicher Tn-Epitope bekannt (Tsuji & Osawa 1986). Mittels ELISA wurde die Interaktion des 5F4 Antikörpers mit BSM getestet (Abb. 12). Die Auswertung der Daten zeigte eine konzentrationsabhängige Bindung an das Mucin. Schon bei 0,2µg/ml BSM war ein deutlicher Anstieg der Absorption im Vergleich zur Negativkontrolle ohne 5F4 IgM zu vermerken.

BSM ist mit etwa 400kDa (Downs & Pigman 1969) ein relativ großes Protein. Um eine Immunodetektion mit 5F4 IgM auch im Western Blot zu ermöglichen wurde es daher zunächst enzymatisch mit Trypsin und Papain verdaut. Proben eines drei- und eines sechsständigen Verdaus wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proben wurden dabei sowohl unter reduzierenden (mit DTT) als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne DTT) untersucht. Mittels Silberfärbung wurde die Verteilung der Bruchstücke analysiert (Abb. 13A) und diese mit dem Bild der Immunodetektion (Abb. 13B) verglichen.



**Abb. 12: Bindung von 5F4 IgM an BSM im ELISA.** Eine ELISA-Platte wurde mit Rindermucin in verschiedenen Konzentrationen beschichtet und dieses mit 1:1000 5F4 IgM sowie 1:5000 Anti-Maus-HRP detektiert. Als Negativkontrolle wurde nur Anti-Maus-HRP auf BSM gegeben. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte von Dreifachansätzen abzüglich PBS-Hintergrund. Das Ergebnis konnte reproduziert werden.



**Abb. 13: Enzymverdautes BSM in Silberfärbung und Western Blot.**

Die enzymverdauten BSM-Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Probenpuffer (jeweils einmal mit und einmal ohne DTT) versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. DTT-haltige Proben wurden zuvor bei 95°C erhitzt. **A** zeigt die Verteilung der Bruchstücke im Gel, angefärbt mit einer Silberfärbung. **B** zeigt die Detektion der Bruchstücke mit 1:500 5F4 IgM und 1:5000 Anti-Maus-HRP auf einer Nitrocellulosemembran. 1 und 5 = 6Std.-Probe mit DTT; 2 und 6 = 6Std.-Probe ohne DTT; 3 und 7 = 3Std.-Probe mit DTT; 4 und 8 = 3Std.-Probe ohne DTT.

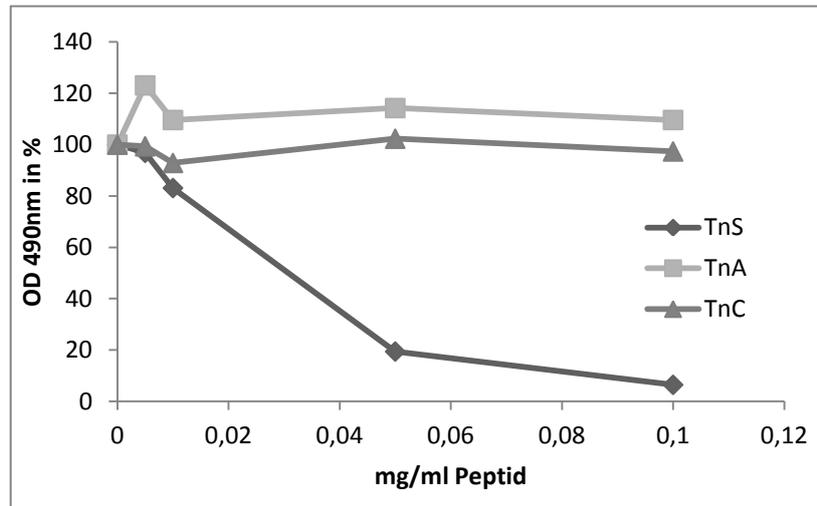
Die Silberfärbung des SDS-Gels zeigte in beiden Proben, die nicht mit DTT versetzt wurden, zwei deutliche Banden bei etwa 150kDa. In der Probe aus dem dreistündigen Verdau sind diese kräftiger ausgeprägt, als in der Probe aus dem sechsständigen Verdau. Die Proben, die mit DTT-haltigem Probenpuffer versetzt wurden, zeigten keine Banden. Hier sind die Bruchstücke vermutlich so klein, dass sie aus dem Gel ausgetreten sind. Im Immunoblot findet sich ein vergleichbares Bild. Auch hier zeigten sich in beiden Proben ohne DTT zwei Banden bei etwa 150kDa, in den DTT-haltigen Proben dagegen sind keine Banden sichtbar. Sowohl ELISA als auch Western Blot belegen somit eine Bindung des 5F4 IgM-Antikörpers an das Rindermucin BSM.

#### 4.1.4.2 Synthetische Peptide im kompetitiven ELISA

Vor dem Hintergrund der guten Bindung von 5F4 an BSM wurde ein kompetitiver ELISA mit den synthetischen Peptiden durchgeführt (Abb. 14). Der Antikörper wurde dazu mit unterschiedlichen Mengen der Peptide inkubiert und anschließend auf eine mit BSM beschichtete ELISA-Platte gegeben.

Aus den Absorptionsdaten ist ersichtlich, dass das TnS Peptid die Bindung des Antikörpers an das Tn-Epitop konzentrationsabhängig kompetieren kann. Schon bei einer

**Abb. 14: Bindung von 5F4 IgM an BSM kompetiert durch Peptide im ELISA.** 5F4 IgM 1:1000 wurde für 15min mit verschiedenen Konzentrationen Peptid inkubiert und anschließend auf je 0,5µg/ml beschichtetes BSM gegeben. Detektiert wurde mit Anti-Maus-HRP 1:5000. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte aus Zweifachansätzen eines Experimentes abzüglich PBS-Hintergrund bezogen auf den Ausgangswert ohne Konkurrenz. Das Ergebnis konnte reproduziert werden.

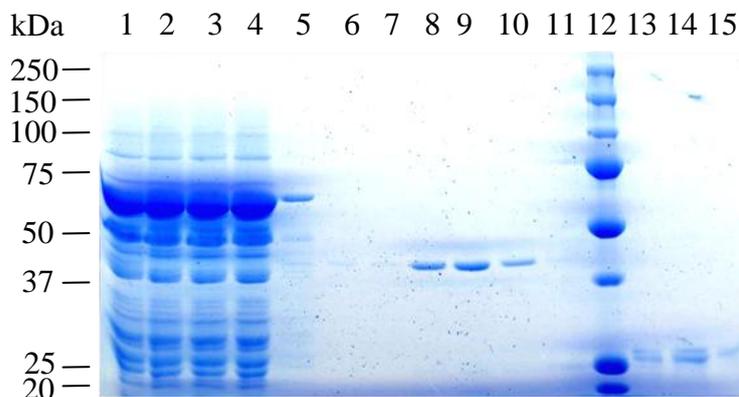


Konzentration von 0,01mg/ml TnS scheint die Bindung an BSM herabgesetzt, 0,1mg/ml TnS sind in der Lage die Bindung fast vollständig zu blockieren. Das TnS-Peptid stellt somit ein Glykomimetikum für das Tn-Antigen dar. Sowohl TnA als auch TnC sind nicht in der Lage die Bindung von 5F4 an das Tn-Antigen zu beeinflussen. Zwar zeigten die phagengebundenen Peptide eine Bindung an den Antikörper (vgl. Abb. 5), die Interaktion der synthetischen Peptide mit selbigem scheint jedoch für eine Konkurrenz nicht ausreichend zu sein. Zur Verwendung als Glykomimetikum sind sie daher nicht geeignet.

## 4.2 Aufreinigung und Charakterisierung des 5F4 Fab-Fragmentes

### 4.2.1 Aufreinigung des 5F4 Fab-Fragmentes mittels Affinitätschromatografie

Die periplasmatische Fraktion einer *E. coli* Fermentation des 5F4 Fab-Fragmentes wurde zunächst dialysiert und anschließend zur Aufreinigung auf eine Strep-Tactin-Chromatographiesäule gegeben. Rohextrakt, Durchflüsse, Waschfraktionen und Eluate wurden zur Analyse der Reinheit mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Abb. 15 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer 5F4 Fab Aufreinigung.

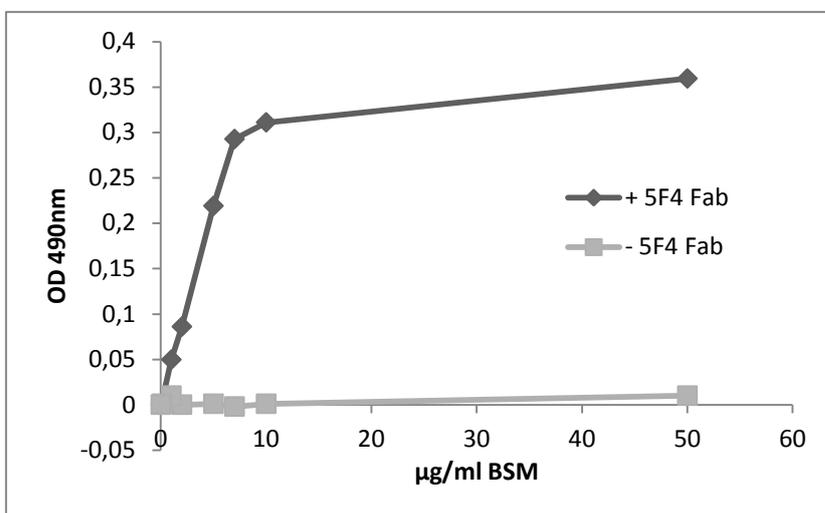


**Abb. 15: Aufreinigungsschritte der 5F4 Fab Affinitätschromatografie im SDS-Gel.** Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit SDS-Probenpuffer wenn nicht anders erwähnt ohne DTT versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. 1 = Rohextrakt (Fermenterliquot); 2-4 = Durchflüsse 1-3; 5-7 = Waschfraktionen 1-3; 8-11 = Eluate 1-4; 12 = Marker; 13-15 = Eluate 1-3, mit DTT-haltigem Probenpuffer versetzt

In den Eluaten ist eine deutliche Bande im Bereich zwischen 37kDa und 50kDa erkennbar. Hierbei handelt es sich um das 5F4 Fab-Fragment, das etwa 50kDa umfasst. Durch die Behandlung mit DTT werden die Disulfidbrücken innerhalb des Fragmentes gespalten, es resultieren zwei Teile von jeweils etwa 25kDa. Betrachtet man die Proben 13 bis 15 in Abb. 15 sind genau diese beiden Teile in Form einer Doppelbande im Gel zu erkennen. Je dicker die Bande in den Eluaten erscheint, desto höher ist die Fab-Konzentration. Der mittels BCA Test bestimmte Proteingehalt der zusammengegebenen Eluate eins bis drei betrug bei der abgebildeten Aufreinigung etwa 80µg/ml.

#### 4.2.2 5F4 Fab im ELISA

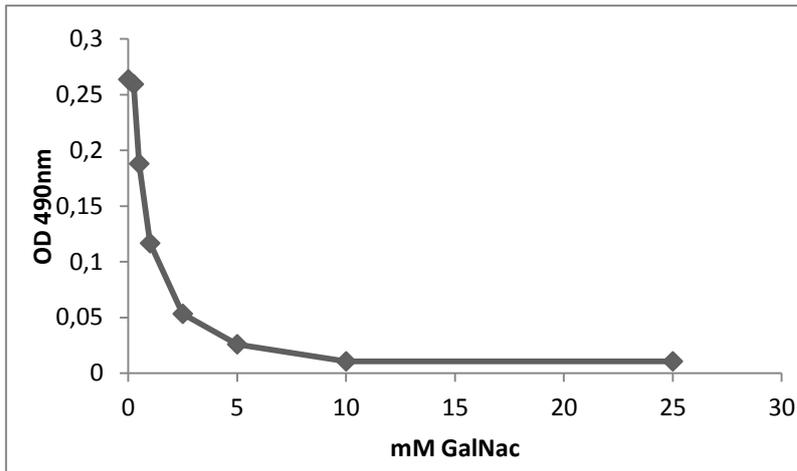
Da der 5F4 Vollantikörper eine gute Bindung an das Rindermucin BSM aufwies (vgl. 4.1.5.1), wurde dieses auch zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften des 5F4 Fab-Fragmentes herangezogen. Im ELISA nach Standardprotokoll konnte Fab mit dem Zweitantikörper nicht detektiert werden. Wurde das Fab-Fragment dagegen zeitgleich mit dem Zweitantikörper auf BSM gegeben, war eine Bindung nachzuweisen (Abb. 16). Als Zweitantikörper wurde ein Fab-spezifisches HRP-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment verwendet. Die Konzentration der beiden Antikörper wurde so gewählt, dass das Fab-Fragment in doppelter Molarität zu dem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment vorliegt.



**Abb. 16: Bindung von 5F4 Fab an BSM im ELISA.** Eine ELISA-Platte wurde mit BSM in verschiedenen Konzentrationen beschichtet und dieses mit 40nM 5F4 Fab sowie 20nM (1:200) Anti-Human F(ab')<sub>2</sub>-HRP detektiert. Erst- und Zweitantikörper wurden zeitgleich appliziert. Als Negativkontrolle wurde nur Anti-Human F(ab')<sub>2</sub>-HRP auf BSM gegeben. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte von Dreifachansätzen eines Experimentes abzüglich PBS-Hintergrund. Das Ergebnis konnte reproduziert werden.

Im Vergleich zum Vollantikörper waren wesentlich höhere Konzentrationen BSM erforderlich um eine Bindung nachzuweisen, obwohl die Molarität von 5F4 Fab rund 50fach höher gewählt wurde als im gleichen Versuch mit 5F4 IgM. Fab bindet also an BSM, die Affinität scheint aber wesentlich geringer als beim Vollantikörper.

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde die Konkurrenzfähigkeit von GalNAc analysiert. Das Gemisch aus Fab und F(ab')<sub>2</sub> wurde dazu vor der Zugabe zum

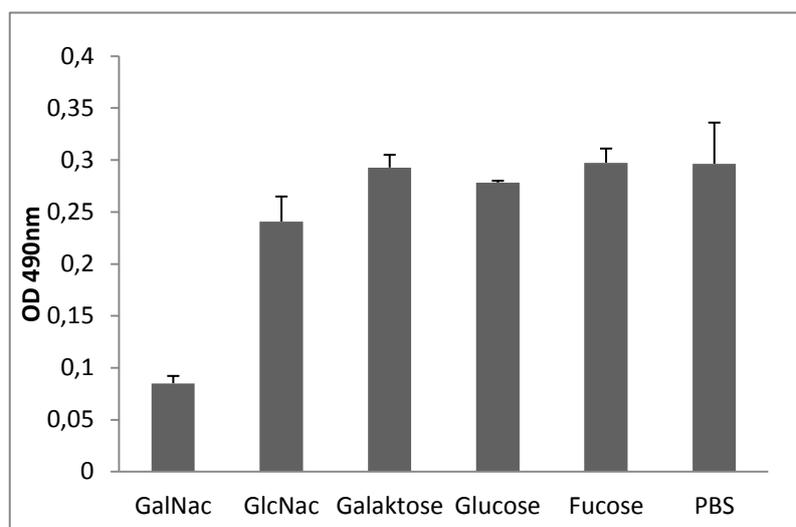


**Abb. 17: Bindung von 5F4 Fab an BSM kompetiert durch GalNAc im ELISA.** 40nM 5F4 Fab wurden für 15min mit verschiedenen Konzentrationen GalNAc inkubiert und anschließend auf 5µg/ml beschichtetes BSM gegeben. Detektiert wurde mit 20nM Anti-Human F(ab')<sub>2</sub>-HRP, wobei Erst- und Zweitantikörper zeitgleich appliziert wurden. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachansätzen eines Experimentes abzüglich PBS-Hintergrund. Das Ergebnis konnte reproduziert werden.

beschichteten BSM mit verschiedenen Konzentrationen GalNAc inkubiert. Ab einer Zugabe von 0,5mM GalNAc zeigte sich eine deutliche Abschwächung der Bindung, die bei etwa 10mM ihr Maximum erreicht (Abb. 17). GalNAc ist also in höheren Konzentrationen in der Lage, die Bindung von 5F4 Fab an BSM nahezu vollständig zu kompetieren.

Im nächsten Schritt wurde die Selektivität des 5F4 Fab-Fragmentes bezüglich verschiedener Einfachzucker untersucht. Die Kompetition der Bindung von 5F4 Fab an BSM durch GalNAc wurde dazu mit derer von GlcNAc, Glucose, Galaktose und Fucose verglichen. Da bei 5mM GalNAc bereits eine deutliche Kompetition nachzuweisen war (Abb. 11), wurde diese Molarität als Richtwert für alle untersuchten Zucker gewählt. Wie Abb. 18 zu entnehmen, kompetiert unter gegebenen Konditionen einzig GalNAc die Bindung zwischen Fab und BSM. Alle anderen untersuchten Einfachzucker zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung.

**Abb. 18: Bindung von 5F4 Fab an BSM kompetiert durch verschiedene Einfachzucker im ELISA.** 40nM 5F4 Fab wurden mit 5mM verschiedener Einfachzucker inkubiert und anschließend auf 5µg/ml beschichtetes BSM gegeben. Detektiert wurde mit 20nM Anti-Human F(ab')<sub>2</sub>-HRP, wobei Erst- und Zweitantikörper zeitgleich appliziert wurden. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus Dreifachansätzen eines Experimentes. Das Ergebnis konnte in wiederholten Versuchen reproduziert werden.

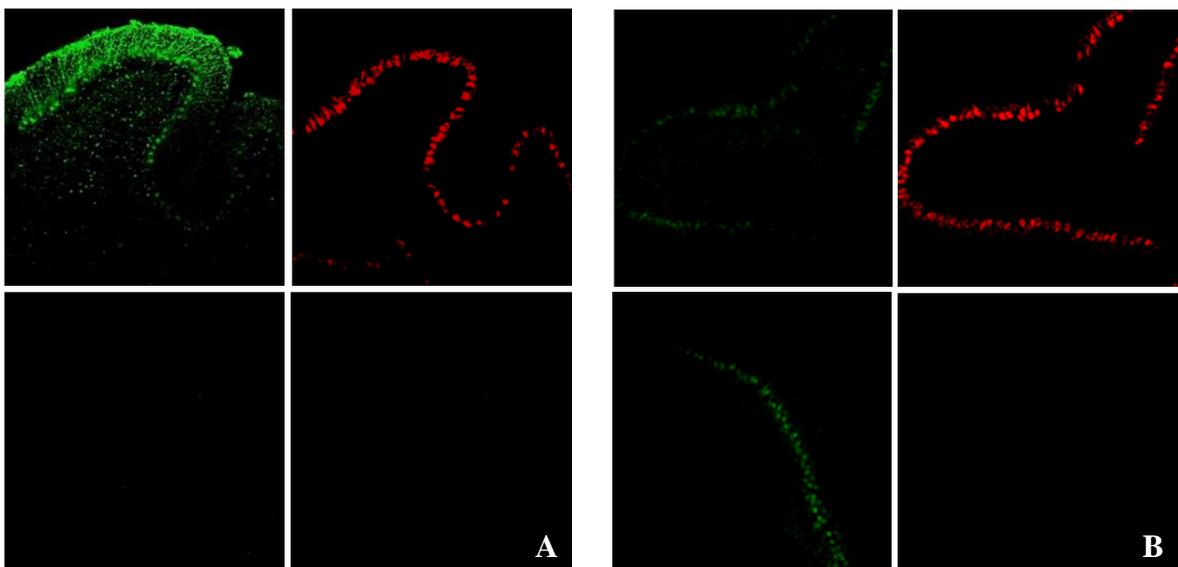


### 4.2.3 5F4 Fab im Western Blot

Eine Verwendbarkeit des 5F4 Fab-Fragmentes im Western Blot konnte trotz aller Bemühungen nicht gezeigt werden. Sowohl nach Standardprotokoll für die Immunodetektion, als auch mit abgewandeltem Protokoll, ähnlich wie im ELISA, blieben Banden für BSM oder konjugiertes Tn-Antigen, die für den Vollantikörper recht ausgeprägt waren (Daten nicht gezeigt), aus.

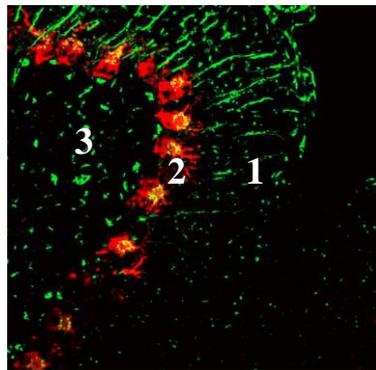
### 4.2.4 5F4 Fab in der immunhistochemischen Gewebeschnittfärbung im Vergleich zum Vollantikörper

Akita et al. (2001a) und Zhang et al. (2003) beschrieben für die Antikörper MLS 128 und HB-Tn1, die beide Tn-Epitope erkennen, eine Immunreaktivität in p7-Cerebellumschnitten von Wildtyp-Mäusen. Während MLS 128 hauptsächlich Purkinjezellen angefärbt, erkennt HB-Tn-1 neben Purkinjezellen auch Epitope in der Körnerzellschicht. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der 5F4 IgM Antikörper mittels Fluoreszenzfärbung auf Immunreaktivität in p7-Cerebellumschnitten getestet und mit dem 5F4 Fab-Fragment verglichen. 5F4 IgM wurde mit FITC detektiert, 5F4 Fab mit Anti-Human-DyLight. Bei beiden Färbungen wurde als zweiter Erstantikörper Anti-Calbindin hinzugefügt und dieser wiederum mit TRITC detektiert. Anti-Calbindin erkennt Epitope auf den Purkinjezellen und macht so eine Orientierung leichter. Als Negativkontrollen wurden Schnitte nach gleichem Protokoll, jedoch ohne Erstantikörper gefärbt.



**Abb. 19: 5F4 IgM und Fab in der immunhistochemischen Färbung von p7-Kleinhirnschnitten.** Die Schnitte wurden mit 7,2nM 5F4 IgM (A) bzw. 72nM 5F4 Fab (B) sowie 1:200 FITC bzw. 1:200 Anti-Human-Dylight (beide grün) angefärbt. Zur Orientierung wurde Anti-Calbindin 1:1000 als zusätzlicher Erstantikörper auf die Schnitte gegeben und mit TRITC (rot) 1:200 detektiert. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 20ger Objektiv. A zeigt links die Fluoreszenz von 5F4 IgM + FITC und rechts die Fluoreszenz von Calbindin + TRITC im gleichen Bildausschnitt. Oben sind Aufnahmen der Schnitte mit, unten ohne Erstantikörper (Negativkontrolle) bei gleicher Anregung durch den Laser abgebildet. B zeigt oben links die Fluoreszenz von 5F4 Fab + Anti-Human-Dylight, die restlichen Ausschnitte sind in gleicher Weise angeordnet wie in A. Insgesamt wurde in B eine wesentlich höhere Laseranregung gewählt als in A.

In der Färbung mit 5F4 IgM und FITC konnte eine Fluoreszenz in der Purkinjezellschicht, in Teilen der Körnerzellschicht und in Form von faserartigen Strukturen, die die Molekularschicht durchziehen (Abb. 19A), beobachtet werden. Da die Negativkontrolle bei gleicher Laseranregung schwarz blieb, ist von einer spezifischen Färbung auszugehen. Abb. 20 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt, in dem die Fluoreszenzen von 5F4 IgM und Anti-Calbindin übereinander gelegt sind. Hier ist das beschriebene Färbemuster deutlich zu erkennen. Wie HB-Tn1 erkennt 5F4 IgM also Tn-Epitope auf Purkinjezellen sowie in der Körnerzellschicht. Im Gegensatz zu HB-Tn1 erkennt 5F4 aber noch weitere Epitope in der Molekularschicht.



**Abb. 20: Immunhistochemisches Färbemuster von 5F4 IgM/FITC, Überlagerung mit Calbindin/TRITC.** 5F4 IgM und Calbindin wurden zusammen auf p7 Kleinhirnschnitte gegeben und mit FITC (grün) bzw. TRITC (rot) detektiert. Der Ausschnitt, der mit dem 50er Objektiv aufgenommen wurde, zeigt die überlagerte Fluoreszenz. Übereinstimmende Areale sind gelb gefärbt. 1= Molekularschicht, 2= Purkinjezellschicht, 3= Körnerzellschicht.

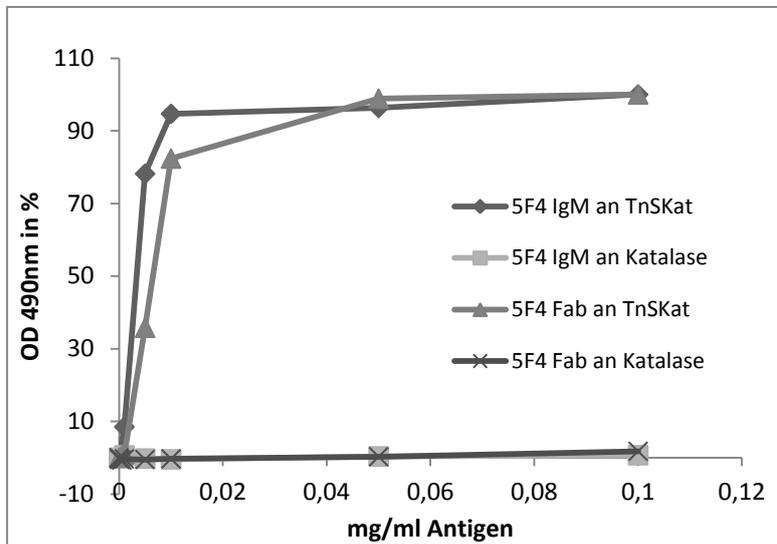
Um ein Signal in der Färbung mit 5F4 Fab/Anti-Human-DyLight (Abb. 19B) zu erhalten, musste die Anregung durch den Laser stark hochreguliert werden. Die beobachtete Fluoreszenz in der Purkinjezellschicht ist bei gleicher Anregung der Negativkontrolle ebenso zu sehen und entspricht daher der Eigenfluoreszenz der Zellen. Eine Spezifität ist nicht gegeben. 5F4 Fab ist somit für eine Immunfärbung ebenso ungeeignet wie für den Western Blot.

### **4.3. Funktionelle Charakterisierung des Tn-Glykomimetikums**

#### **4.3.1 Gekoppeltes Glykomimetikum in ELISA und Western Blot**

Vorangegangene Experimente zeigten, dass TnS aufgrund seiner schlechten Adsorption im ELISA nach Standardprotokoll nicht einsetzbar ist (Daten nicht abgebildet). Der Nachweis einer Bindung an 5F4 IgM erfolgte indirekt im kompetitiven ELISA (vgl. 4.1.5.1). Für eine bessere Verwendbarkeit bei der weiteren Bindungsanalyse wurde TnS an Katalase gekoppelt. Da Katalase relativ gut an die ELISA-Platte adsorbiert, konnte die Bindung des 5F4 Antikörpers an das Glykomimetikum (im Weiteren TnSKat genannt) nun auch mittels Standard-ELISA beurteilt werden. TnSKat wurde dazu in unterschiedlicher Konzentration beschichtet und mit 5F4 IgM und Anti-Maus-HRP detektiert. Selbiger Versuch wurde zum

Vergleich auch mit 5F4 Fab und Anti-Human F(ab')<sub>2</sub>-HRP durchgeführt. Wie schon in den Experimenten zuvor wurde dazu das abgewandelte Standardprotokoll (Gleichzeitige Applikation von Erst- und Zweitantikörper) verwendet.

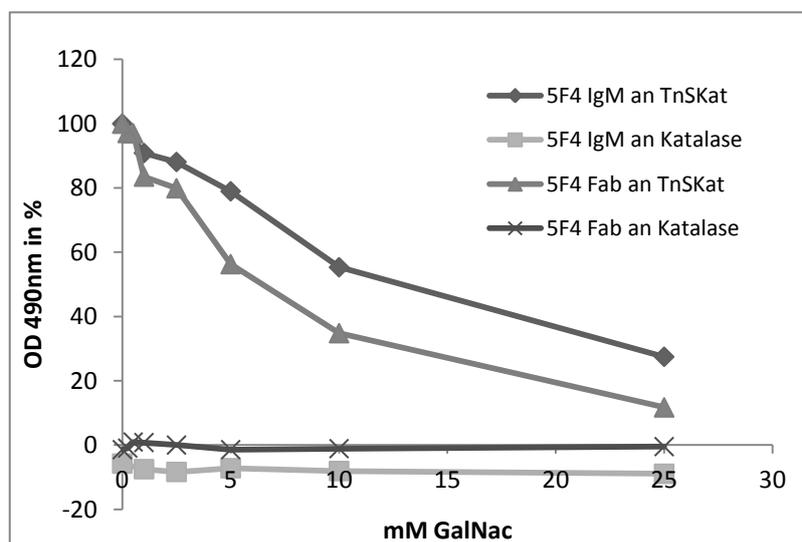


**Abb. 21: Bindung von 5F4 IgM bzw. Fab an TnSKat im ELISA.** TnSKat wurde in unterschiedlicher Konzentration beschichtet und mit 20µg/ml 5F4 IgM bzw. 2µg/ml Fab sowie 1:5000 Anti-Maus-HRP bzw. 1:200 Anti-Human F(ab')<sub>2</sub>-HRP detektiert. Als Negativkontrolle wurde Katalase in gleichen Konzentrationen verwendet. Bei der Verwendung von Fab wurden Erst- und Zweitantikörper gleichzeitig appliziert. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Abgebildet sind die prozentualen Mittelwerte von Dreifachansätzen eines Experimentes bezogen auf die Absorption bei der höchsten Konzentration. Das Ergebnis konnte in wiederholten Versuchen reproduziert werden.

Sowohl für 5F4 IgM als auch für 5F4 Fab konnte eine Bindung an TnSKat gezeigt werden (Abb. 21). Die Bindungskurve für 5F4 IgM verläuft dabei geringfügig steiler als die von 5F4 Fab, was erneut auf eine höhere Affinität zum Epitop hindeutet. In der Negativkontrolle mit ungekoppelter Katalase zeigen weder der Vollantikörper, noch das Fab-Fragment eine Reaktion.

In einem weiteren Versuch wurde die Kompetitionsfähigkeit von GalNAc auf die oben beschriebene Bindung untersucht. Dazu wurde eine ELISA-Platte mit TnS-Kat in konstanter Konzentration beschichtet. Die Detektion erfolgte wie im obigen Protokoll, wobei der Erstantikörper (im Falle von Fab das Erst- und Zweitantikörpergemisch) zunächst mit verschiedenen Mengen GalNAc inkubiert wurde.

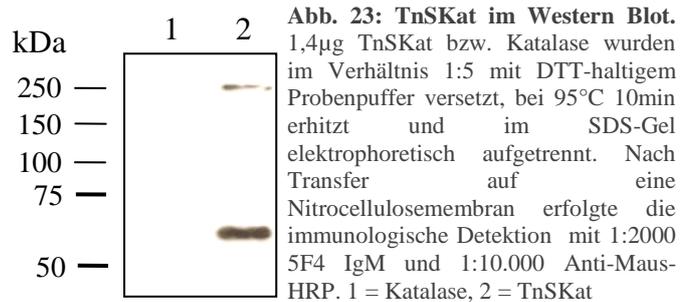
**Abb. 22: Bindung von 5F4 IgM bzw. Fab an TnSKat kompetiert durch GalNAc im ELISA.** 5F4 IgM bzw. Fab wurden für 15min mit GalNAc in unterschiedlicher Konzentration inkubiert und anschließend auf 0,005 bzw. 0,01 mg/ml beschichtetes TnSKat gegeben. Detektiert wurde mit Anti-Maus-HRP bzw. Anti-Human F(ab')<sub>2</sub>-HRP. Als Negativkontrolle wurde Katalase verwendet. Im Photometer wurde die Absorption bei 490nm gemessen. Abgebildet sind die prozentualen Mittelwerte von Dreifachansätzen eines Experimentes bezogen auf die Absorption ohne Konkurrenz. Das Ergebnis konnte in wiederholten Versuchen reproduziert werden.



Sowohl die Bindung von 5F4 IgM als auch von 5F4 Fab an das gekoppelte Peptid konnten durch GalNAc kompetiert werden (Abb. 22). Der Vollantikörper besitzt im Gegensatz zum Fab-Fragment zehnmal mehr Antigenbindestellen. Für eine Kompetition werden daher wesentlich größere Mengen GalNAc benötigt als bei Fab. Die IC50 (Konzentration, bei der eine 50%ige Kompetition besteht) liegt für IgM bei etwa 13mM GalNAc und ist damit mehr als doppelt so hoch wie für Fab mit etwa 6mM GalNAc.

Neben der Bindungsanalyse mittels ELISA erfolgte die Immuno-

detektion von TnSKat im Western Blot. Das gekoppelte Glykomimetikum wurde dazu auf eine SDS-PAGE aufgetragen, elektro-



phoretisch aufgetrennt und nach anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit 5F4 IgM und Anti-Maus-HRP detektiert. Als Negativkontrolle wurde ungekoppelte Katalase verwendet. TnSKat zeigte zwei Banden, eine dicke Bande bei 60kDa und eine etwas dünnere bei 250kDa (Abb. 23). Die für die Kopplung verwendete Rinderkatalase ist ein 250kDa großer Tetramer, dessen Untereinheiten etwa 60kDa umfassen (Sund et al. 1967). Die Banden entsprechen also der Größe des Gesamtproteins bzw. dessen Untereinheiten. In der Negativkontrolle waren wie zu erwarten keine Banden sichtbar.

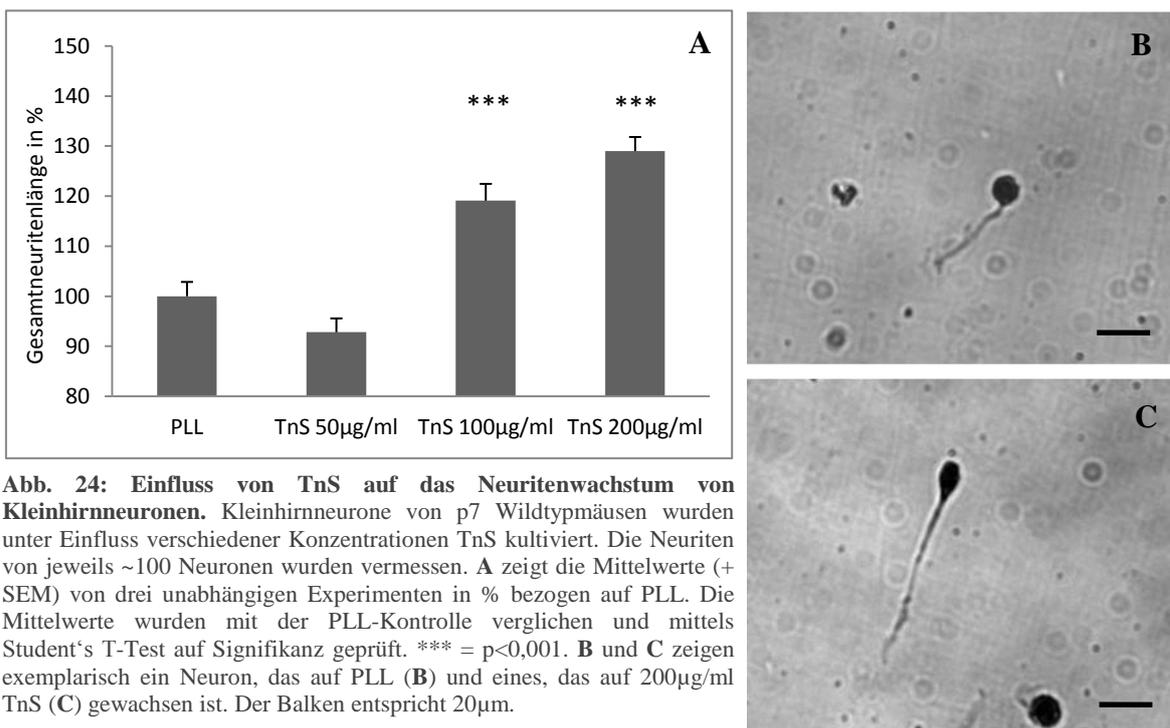
#### 4.3.2 Neuritenwachstumsexperimente

In pränatalem und frühem postnatalen zentralen Nervengewebe der Maus kommt es zu einem zeitlich und räumlich begrenzten Auftreten des Tn-Antigens (Akita et al. 2001a). Über die Funktion des Tn-Antigens im Nervensystem ist wenig bekannt, eine zentrale Rolle bei der Neuritenentwicklung wird vermutet. Vor diesem Hintergrund wurde das Tn-Glykomimetikum bezüglich eines möglichen Einflusses auf das Neuritenwachstum von Kleinhirn-, Hinterwurzelganglien- und Motoneuronen untersucht.

Die Versuche erfolgten auf PLL-beschichteten Zellkulturplatten (PLO bei Motoneuronen), die mit dem Glykomimetikum beschichtet wurden. Parallel dazu wurden auch GalNAc und der 5F4 Antikörper untersucht. TnS wurde in Konzentrationen von 200, 100 und 50µg/ml beschichtet, 5F4 IgM und Fab mit jeweils 10µg/ml. Da GalNAc für eine Beschichtung zu klein ist, wurde es eine Stunde nach der Zellaussaat löslich in einer Endkonzentration von 100µg/ml hinzugefügt. Die Experimente wurden, wenn nicht anders erwähnt, unter gleichen Bedingungen drei Mal durchgeführt.

### 4.3.2.1 Kleinhirnneurone

Das Glykomimetikum zeigte in allen drei Experimenten im Vergleich zur PLL-Kontrolle eine Stimulation der Gesamtneuritenlänge (Abb. 24). Bei einer Konzentration von 200µg/ml TnS waren die Neuriten im Durchschnitt etwa 30%, bei 100µg/ml immer noch 20% länger als auf PLL. 50µg/ml zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtneuritenlänge. Ebenso war weder nach Zugabe von GalNAc, noch von 5F4 IgM oder Fab ein Unterschied zur PLL-Kontrolle zu vermerken.

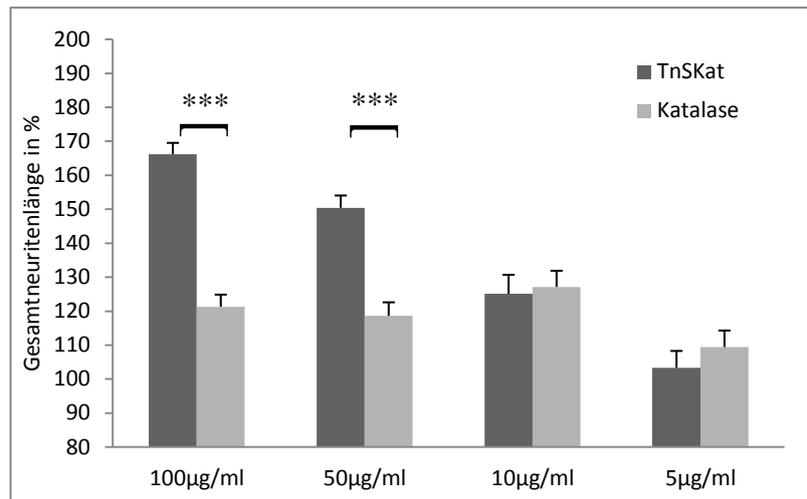


**Abb. 24: Einfluss von TnS auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen.** Kleinhirnneurone von p7 Wildtypmäusen wurden unter Einfluss verschiedener Konzentrationen TnS kultiviert. Die Neuriten von jeweils ~100 Neuronen wurden vermessen. **A** zeigt die Mittelwerte (+ SEM) von drei unabhängigen Experimenten in % bezogen auf PLL. Die Mittelwerte wurden mit der PLL-Kontrolle verglichen und mittels Student's T-Test auf Signifikanz geprüft. \*\*\* =  $p < 0,001$ . **B** und **C** zeigen exemplarisch ein Neuron, das auf PLL (**B**) und eines, das auf 200µg/ml TnS (**C**) gewachsen ist. Der Balken entspricht 20µm.

Im Organismus ist das Tn-Antigen in der Regel an ein Trägerprotein gebunden. Im ZNS von Mäusehirnen z.B. konnte *Syndecan-3* als ein solches Protein identifiziert werden (Akita et al. 2001b). Auf dem Trägerprotein werden Tn-Epitope in großer Anzahl und Dichte exprimiert. Auch bei der Kopplung des Tn-Glykomimetikums an Katalase wurden mehrere Peptide an ein Katalasemolekül gebunden. Es imitiert also in gewisser Weise die im Organismus herrschende Multivalenz des Tn-Antigens. In einem weiteren Neuritenwachstums-Experiment wurde der Einfluss des gekoppelten Glykomimetikums (TnSKat) auf Kleinhirnneurone untersucht. Der Versuch erfolgte unter gleichen Bedingungen wie zuvor. TnSKat wurde in den Konzentrationen 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml und 5µg/ml beschichtet. Zum Vergleich wurden Neurone auf gleichen Konzentrationen ungekoppelter Katalase beurteilt.

**Abb. 25: Einfluss von TnSKat auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen.**

Kleinhirnneurone von p7 Wildtypmäusen wurden unter Einfluss verschiedener Konzentrationen TnSKat kultiviert. Die Neuriten von jeweils ~100 Neuronen wurden vermessen. Als Negativkontrolle wurden gleiche Konzentrationen Katalase verwendet. Abgebildet sind die Mittelwerte (+ SEM) eines Experimentes in % bezogen auf PLL. Die Mittelwerte wurden mit der Katalase-Kontrolle verglichen und mittels Student's T-Test auf Signifikanz geprüft. \*\*\* =  $p < 0,001$



Die Stimulation des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen konnte mit dem gekoppelten Glykomimetikum reproduziert werden (Abb. 25). Bei einer Konzentration von 100 µg/ml TnSKat waren die Neuriten etwa 45% länger, als bei gleicher Konzentration ungekoppelter Katalase. 50 µg/ml bewirkten immer noch eine etwa 30%ige Stimulation. Bei 10 und 5 µg/ml war die Neuritenlänge vergleichbar mit der in der Katalaseprobe.

#### 4.3.2.1 Motoneurone

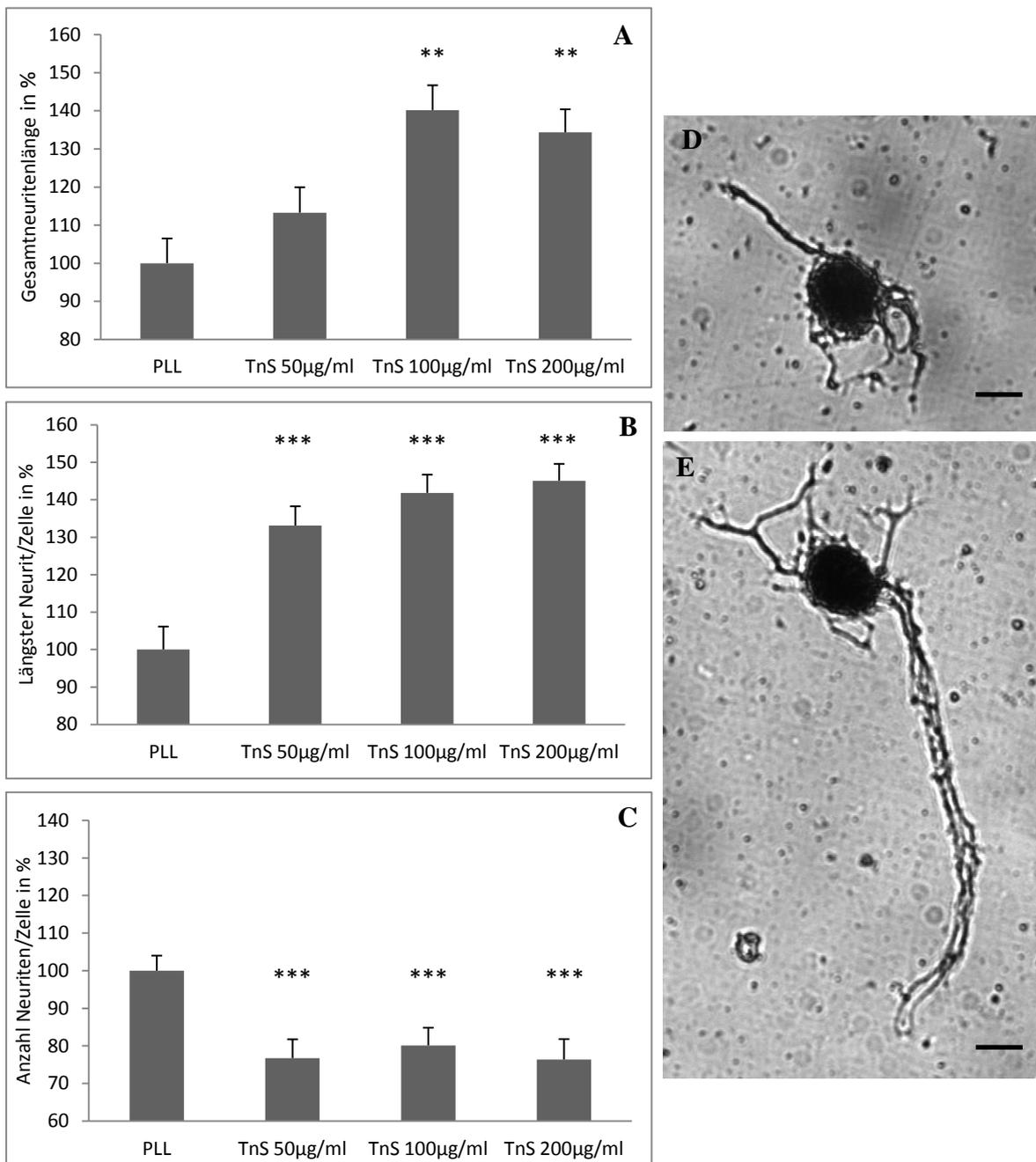
Weder das Glykomimetikum noch GalNAc, 5F4 IgM, oder 5F4 Fab zeigten im Durchschnitt der drei Versuche einen Unterschied zur PLL Kontrolle. Es liegt offensichtlich keine Beeinflussung des Neuritenwachstums bei Motoneuronen vor.

#### 4.3.2.2 Hinterwurzelganglienneurone

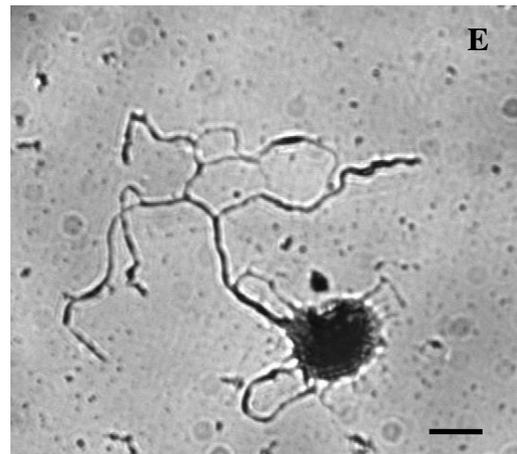
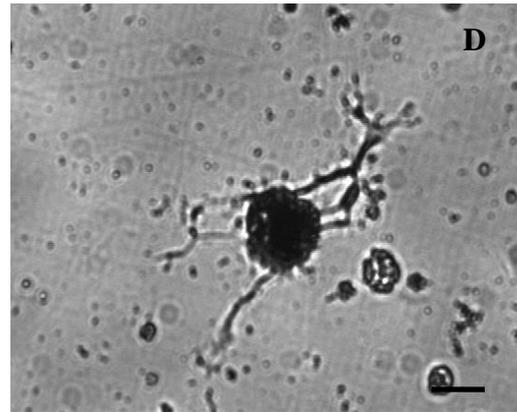
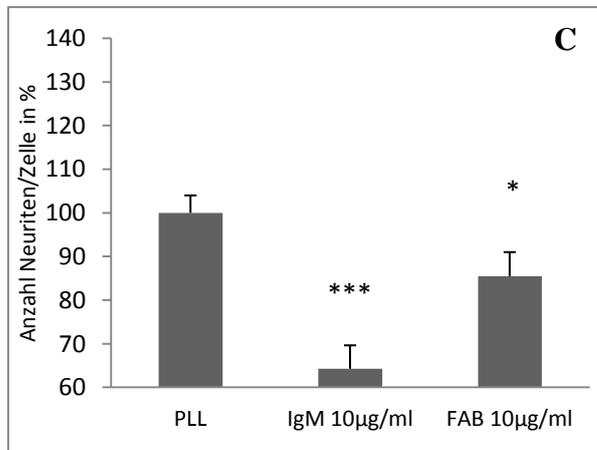
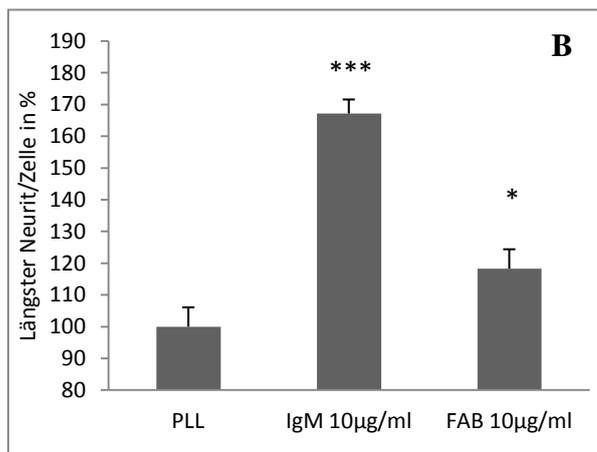
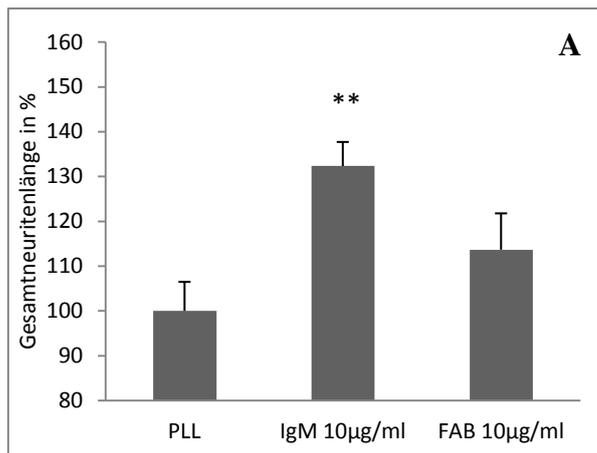
Da Hinterwurzelganglienneurone in der Regel mehrere Neuritenauswüchse haben, wurde bei der Auswertung der Experimente nicht nur die Gesamtlänge vermessen, sondern auch der längste Neurit, sowie die Anzahl der aus einer Zelle wachsenden Neuriten beurteilt. Im Vergleich der drei Versuche zeigte sich ein zum Teil recht uneinheitliches Bild. Die Messwerte unterlagen einer wesentlich größeren Streuung als bei den Kleinhirn- und Motoneuronen. Zudem konnten statt 100 meist höchstens 50 Neurone vermessen werden.

In der Zusammenstellung aller drei Versuche, zeigte sich eine Stimulation der Gesamtneuritenlänge durch das Glykomimetikum (Abb. 26). Bei Konzentrationen von 200 µg/ml und 100 µg/ml TnS waren die Neuriten im Mittel etwa 40% länger als auf PLL. 50 µg/ml zeigten im Mittel etwa 15% längere Neurite, der Messwert erwies sich aber im Vergleich zur PLL-Kontrolle mittels Student's T-Test nicht signifikant. Der längste Neurit war unter Einfluss von 200 µg/ml und 100 µg/ml TnS durchschnittlich etwa 45%, bei 50 µg/ml immer noch 35% länger als in der PLL-Kontrolle. Bei der durchschnittlichen

Anzahl an Neuriten pro Zelle waren in allen drei Konzentrationen des Glykomimetikums ca. 20% (etwa ein Neurit pro Zelle) weniger Neuriten als in der PLL-Kontrolle zu beobachten. Im Vergleich zum Glykomimetikum war in 100µg/ml GalNAc keine Stimulation der Gesamtneuritenlänge zu vermerken. Eine Größenzunahme des längsten Neuriten (ca. 20%), sowie eine Abnahme der Neuritenzahl (etwa ein Neurit weniger als auf PLL) zeigten sich jedoch auch hier (Daten nicht abgebildet).



**Abb. 26: Einfluss von TnS auf das Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen.** Hinterwurzelganglienneurone von p7 Wildtypmäusen wurden unter Einfluss verschiedener Konzentrationen TnS kultiviert. Die Neuriten von jeweils ~50 Neuronen wurden vermessen, wobei zwischen Gesamtlänge (A), längstem Neurit (B) und Anzahl Neuriten (C) differenziert wurde. A, B und C zeigen die Mittelwerte (+ SEM) von drei unabhängigen Experimenten in % bezogen auf PLL. Die Mittelwerte wurden mit der PLL-Kontrolle verglichen und mittels Student's T-Test auf Signifikanz geprüft. \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ . D und E zeigen exemplarisch ein Neuron auf PLL (D) und auf 200µg/ml TnS (E). Der Maßstab entspricht 20µm.



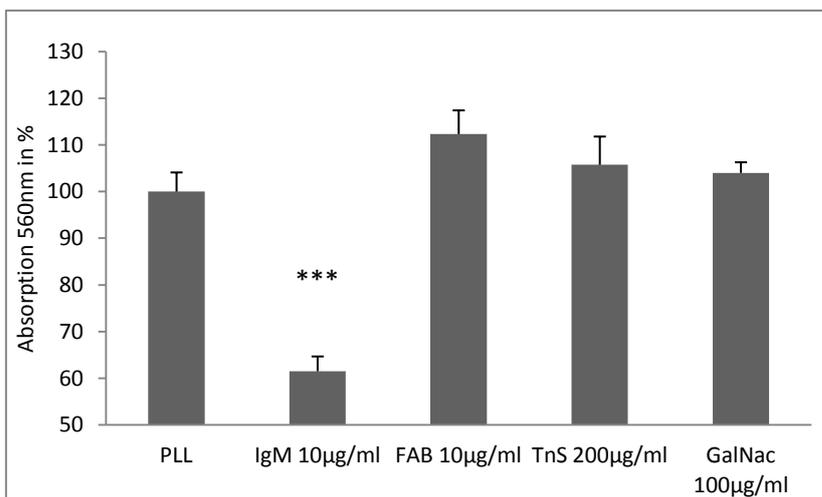
**Abb. 27: Einfluss des 5F4 Tn-Antikörpers auf das Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen.** Hinterwurzelganglienneurone von p7 Wildtypmäusen wurden unter Einfluss von 10µg/ml 5F4 IgM bzw. 10µg/ml 5F4 Fab kultiviert. Die Neuriten von jeweils ~50 Neuronen wurden vermessen, wobei zwischen Gesamtlänge (A), längstem Neurit (B) und Anzahl Neuriten (C) differenziert wurde. A, B und C zeigen die Mittelwerte (+ SEM) von drei unabhängigen Experimenten in % bezogen auf PLL. Die Mittelwerte wurden mit der PLL-Kontrolle verglichen und mittels Student's T-Test auf Signifikanz geprüft. \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ . D und E zeigen exemplarisch ein Neuron auf PLL (E) und eines auf 10µg/ml IgM (D). Der Maßstab entspricht 20µm.

Erstaunlicherweise war eine Stimulation der Gesamtneuritenlänge nicht nur durch das Glykomimetikum sondern auch durch den 5F4 Antikörper zu beobachten (Abb. 27). Die Neuriten waren unter Einfluss von 5F4 IgM im Durchschnitt etwa 30% länger als in der PLL-Kontrolle. Auch auf 5F4 Fab war eine leichte Stimulation zu vermerken, diese erwies sich jedoch nicht als signifikant. Der längste Neurit war auf IgM durchschnittlich etwa 70% länger als auf PLL, auf Fab etwa 20%. Im Vergleich der Neuritenanzahl zeigten sich auf IgM durchschnittlich etwa 35% (etwa 1,8 Neuriten pro Zelle), auf Fab etwa 15% (etwa 0,8 Neuriten pro Zelle) weniger Neuriten als auf PLL.

### 4.3.3 Zellüberleben von Kleinhirnneuronen

Glykomimetikum, GalNac und 5F4 Antikörper (IgM und Fab) wurden auf eine Beeinflussung des Zellüberlebens von Kleinhirnneuronen getestet. Kultivierte Zellen wurden dazu für eine Nacht mit den verschiedenen Substanzen inkubiert. Mittels Neutralrot-Methode wurden anschließend die überlebenden Zellen quantifiziert. Da Neutralrot nur in den Lysosomen lebender Zellen aufgenommen wird, deutet ein Abfall der Absorption bei 560nm gemessen im Photometer auf einen vermehrten Zelltod hin.

Unter Einfluss von 5F4 IgM zeigte sich eine deutlich niedrigere Absorption als in der PLL-Kontrolle. Durchschnittlich überlebten etwa 40% weniger Zellen (Abb. 28). Der Tn-Antikörper scheint das Zellüberleben also in negativer Weise zu beeinflussen. Im Vergleich dazu zeigten weder 5F4 Fab, noch Glykomimetikum oder GalNac eine signifikante Veränderung zur Negativkontrolle auf PLL.



**Abb. 28: Zellüberleben von Kleinhirnneuronen unter Einfluss von GalNac, Glykomimetikum und 5F4 Antikörper.** Kleinhirnneurone wurden unter Einfluss der genannten Substanzen kultiviert. Mittels Neutral-Rot-Methode wurden die überlebenden Zellen quantifiziert. Im Photometer wurde die Absorption bei 560nm gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte (+ SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte wurden mit der PLL-Kontrolle verglichen und mittels Student T-Test auf Signifikanz geprüft; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Identifizierung von Glykomimetika für das Tn-Antigen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die funktionelle Rolle des Tn-Antigens im Nervensystem mithilfe von Glykomimetika näher charakterisiert werden. Zur Identifizierung der Glykomimetika wurde die *Phage-display*-Technik verwendet. Bei dieser Technik werden mithilfe eines speziellen Selektionsprozesses aus einer großen Anzahl verschiedener Peptide diejenigen eluiert, die die beste Bindung an eine Zielstruktur aufweisen. Idealerweise zeigt ein Peptid eine so starke Bindung an die verwendete Zielstruktur, dass nach drei Selektionsrunden am Ende nur noch Phagen, die genau dieses Peptid auf ihrer Oberfläche präsentieren, übrig bleiben. Je nach Spezifität der Zielstruktur ist es aber auch möglich, dass mehrere Peptidsequenzen den Selektionsprozess überstehen. Als Zielstruktur wurde der monoklonale Antikörper 5F4 gewählt. Er weist eine spezifische Bindung an das Tn-Antigen auf und zeigt keine Kreuzreaktion mit terminalem GalNAc des Blutgruppe A-Antigens (Thurnher et al. 1993). Das genaue Epitop des Antikörpers ist nicht bekannt, eine Reaktion mit Proteinstrukturen unterhalb des Kohlenhydratrestes wird vermutet. Tatsächlich konnte mittlerweile für einige Tn-spezifische Antikörper eine Erkennung des Tn-Antigens innerhalb eines bestimmten Peptidmotivs nachgewiesen werden (Brooks et al. 2010; Tarp et al. 2007).

Nach drei Selektionsrunden im *Phage-display* konnte keine dominierende Übereinstimmungssequenz gefunden werden. Möglicherweise ist das vom Tn-Antikörper erkannte Epitop innerhalb der Peptide sehr klein, was zu einer breiteren Spezifität und damit der Selektion mehrerer verschiedener Peptidsequenzen geführt haben könnte. Denkbar ist auch eine für die Bindung notwendige Sekundär-, oder Tertiärstruktur des Peptids, die aus den linearen Sequenzen nicht ersichtlich ist. Auffällig häufig zeigten sich die Aminosäuren Prolin und Histidin, sowohl in den sequenzierten Peptiden der linearen, als auch in denen der cyclischen Phagenbibliothek. Beide Aminosäuren beinhalten eine Fünfringstruktur mit einem bzw. zwei Stickstoffatomen. Histidin zählt zu den aromatischen Aminosäuren, Prolin ist aufgrund seiner sterischen Ausrichtung für die Beeinflussung der Faltung von Proteinen bekannt. Das gehäufte Auftreten lässt eine Beteiligung bei der Bindung an den 5F4 Antikörper vermuten. Möglicherweise spielt gerade die Ringstruktur dabei eine entscheidende Rolle.

Trotz des relativ heterogenen Bildes der Peptidsequenzen zeigte sich für einige Phagenklone im Immunoassay eine gute Bindung an den 5F4 Antikörper. Die Sequenzen THHPPGYFAAHS (TnA) und Tn-Peptid S\* (TnS) aus der linearen und FHDRLPQ (TnC) aus der cyclischen Phagenbibliothek, deren Bindung im ELISA und Western Blot bestätigt werden konnte und die zudem gute Eigenschaften in Bezug auf die Wasserlöslichkeit aufwiesen, wurden in Form von synthetischen Peptiden weiter charakterisiert. Eine Kompetitionsfähigkeit der Bindung zwischen 5F4 und Tn-Antigen zeigte dabei nur das TnS-Peptid. TnA und TnC konnten die Interaktion nicht beeinflussen. Verschiedene Faktoren könnten hier einen Unterschied in der Affinität zur Zielstruktur zwischen phagengebundenem und freiem Peptid bewirkt haben. Während des Selektionsprozesses sind die Peptide C-terminal über einen *Spacer* mit dem Phagenhüllprotein pIII verbunden. Möglicherweise hat der 5F4 Antikörper bei der Bindung an das phagengekoppelte TnA- bzw. TnC- Peptid Teile des *Spacers* oder des pIII-Proteins erkannt. Da diese Strukturen im synthetischen Peptid fehlen, wäre eine Bindung nur noch schwach bis nicht mehr möglich. Ein weiterer Erklärungsansatz ist die C- und N-terminale Veränderung der Peptide. Während das C-terminale Ende in den phagengekoppelten Peptiden an den *Spacer* gebunden war, steht es in den synthetischen Peptiden frei. Durch die freistehende Carboxylgruppe kommt es zu einer Negativladung, die die Bindung an die Zielstruktur verschlechtern kann. Im Kompetitionsversuch wurden N-terminal biotinylierte Peptide eingesetzt, was eine Veränderung gegenüber den phagengebundenen Peptiden darstellt (das N-terminale Ende ist hier frei). Diese Veränderung könnte die Affinität zum Antikörper ebenso herabgesetzt haben. Durch die N- und C-terminalen Modifizierungen wurde möglicherweise die räumliche Ausrichtung des Peptids beeinflusst. Sekundär- oder Tertiärstruktur könnten in einer Weise verändert worden sein, die eine Bindung an den Antikörper unmöglich macht. Das synthetische TnS-Peptid konnte trotz aller Veränderungen so gut an den Antikörper binden, dass eine Konkurrenz des Tn-Antigens erfolgreich war. An Katalase gekoppelt gelang in ELISA und Western Blot auch eine direkte Detektion des Peptides mit dem 5F4 Antikörper. Es erfüllt somit die Bedingungen für ein Tn-Glykomimetikum.

Mit dem TnS-Peptid konnte erstmals eine unsubstituierte Peptidstruktur als Glykomimetikum für das Tn-Antigen identifiziert werden. Bisherige Ansätze zur Herstellung von Tn-Glykomimetika beruhten auf rationalem Design, die Glykanstruktur des N-Acetylgalaktosamins blieb dabei stets erhalten (Geraci et al. 2008; Miller et al.

---

\* Peptidsequenz entfernt, siehe Erklärung/Vereinbarung S. 72

2009; Corzana et al. 2011). Die Synthese erfolgte größtenteils vor dem Hintergrund der Entwicklung von Tumorimpfstoffen. Peptidische Glykomimetika bieten eine elegante Alternative zu den nach rationalem Design erstellten Glykomimetika, da sie funktionell den gleichen Zweck erfüllen, ihre chemische Synthese aber sehr viel einfacher ist. Ihre schnelle Verfügbarkeit und die Möglichkeit der N- oder C-terminalen Modifikation für Bindungsanalysen machen sie zu einem hilfreichen Element in der Kohlehydrat-Forschung. Dass Peptide in der Lage sind Glykanstrukturen auch funktionell zu imitieren, konnte in der Vergangenheit gezeigt werden (Katagihallimath et al. 2010; Bächle et al. 2006). Das TnS-Peptid könnte in Zukunft nicht nur dabei helfen, die physiologische Funktion des Tn-Antigens näher aufzudecken, sondern möglicherweise auch in der Diagnostik und Therapie von Erkrankungen, die auf einer Fehlregulation des Tn-Antigens beruhen, zum Einsatz kommen.

## **5.2 Funktionelle Charakterisierung des TnS-Glykomimetikums**

In pränatalem und frühem postnatalen zentralen Nervengewebe der Maus wird das Tn-Antigen auf *Syndecan-3* exprimiert (Akita et al. 2001a; Akita et al. 2001b). Welche Funktion es im Nervensystem hat ist nicht bekannt, aufgrund der streng zeitlich und räumlich limitierten Expression wird eine Beeinflussung der Nervenzellentwicklung vermutet. Mithilfe des Tn-Glykomimetikums sollte die funktionelle Rolle des Tn-Antigens im Nervensystem näher charakterisiert werden. In Zellkulturexperimenten wurde eine Beeinflussung des Neuritenwachstums von Kleinhirn-, DRG- und Motoneuronen untersucht. Außerdem wurde die Auswirkung des Glykomimetikums auf das Zellüberleben von Kleinhirnneuronen getestet.

Die Neuriten von Kleinhirnneuronen zeigten sich unter Einfluss des Glykomimetikums deutlich verlängert. Eine konzentrationsabhängige Stimulation konnte sowohl mit der unveränderten, als auch mit der katalasegekoppelten Peptidsequenz beobachtet werden. Diese Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, das Tn-Antigen könne einen Einfluss auf die Neuritenentwicklung haben. Im Nervengewebe der Maus ist eine starke Expression des Tn-Antigens im prä- und postnatalen Kleinhirn beschrieben (Akita et al. 2001a; Zhang et al. 2003). Auch mit dem 5F4 Antikörper konnten im Rahmen dieser Arbeit Tn-Epitope auf p7 Kleinhirnschnitten detektiert werden. Die Lokalisation in der Körnerzellschicht passt zu den beobachteten Ergebnissen aus den Neuritenwachstumsexperimenten. Welcher Mechanismus auf zellulärer Ebene zu einer Wachstumsstimulation durch das Glykomimetikum führt, kann man nur mutmaßen. Möglich ist eine direkte Interaktion des

Glykomimetikums mit Rezeptoren an der Nervenzelle. Auch eine Beeinflussung von Proteinen, die über eine Bindung an das Tn-Antigen das Neuritenwachstum regulieren, ist denkbar. Für das Tn-Trägerprotein *Syndecan-3* sind zahlreiche Interaktionen beschrieben, die eine Stimulation des Neuritenwachstums bewirken (Bespalov et al. 2011; Akita et al. 2004; Nolo et al. 1995). Das Glykomimetikum ist möglicherweise in der Lage diese Interaktion zu beeinflussen. Im Gegensatz zum Glykomimetikum bewirkte freies N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) in den Experimenten keine signifikante Veränderung der Neuritenlänge. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass bei der Bindung des Tn-Epitops an den entsprechenden Rezeptor nicht nur die terminale Kohlehydratstruktur, sondern auch unterliegende Strukturen der Peptidkette von Bedeutung sind. Durch die sterische Ausrichtung der Aminosäuren ist das Glykomimetikum möglicherweise in der Lage beides zu imitieren und somit besser zu interagieren als der freie Zucker. In den Experimenten konnte GalNAc aufgrund der geringen Größe nicht wie das Glykomimetikum auf die Zellkulturplatten beschichtet werden, sondern musste löslich zu den Zellen hinzugegeben werden. Der dadurch bedingte Unterschied in der Verteilung der Moleküle könnte die Wirkung des Zuckers zusätzlich negativ beeinflusst haben.

Eine Auswirkung des 5F4 Antikörpers auf das Wachstum von Kleinhirneuriten war nicht zu vermerken, allerdings bewirkte der Antikörper im Vergleich zur Kontrolle ein deutlich herabgesetztes Zellüberleben. Da die Versuche ohne Zugabe von Komplement erfolgten, ist von einer direkten zytotoxischen Wirkung auszugehen. Ähnliche Effekte wurden bereits bei Tumorzellen beobachtet. Unter Einfluss Tn-spezifischer monoklonaler Antikörper ist die Überlebensrate verschiedener Tumor-Zelllinien mit Tn-Expression komplementunabhängig deutlich herabgesetzt (Avichezer et al. 1997). Dieser Zusammenhang lässt eine Expression des Tn-Antigens auf Kleinhirnneuronen vermuten. Dazu passt auch die Identifikation einer membrangebundenen Unterform des Tn-Trägerproteins *Syndecan-3* (Akita et al. 2001b). Das Glykomimetikum zeigte in den Versuchen keinen Einfluss auf das Zellüberleben. Zwar sind Fälle mucininduzierter Apoptose beschrieben, diese beschränken sich jedoch auf Zellen des Immunsystems (Ishida et al. 2008).

Das Wachstum von Hinterwurzelganglienneuronen (DRG-Neurone) konnte durch das Glykomimetikum ebenso stimuliert werden wie das der Kleinhirnneurone. Die konzentrationsabhängige Stimulation äußerte sich in einer Zunahme der Gesamtneuritenlänge, sowie in einer Verlängerung des längsten Neuriten bei gleichzeitiger

Abnahme der Neuritenanzahl. Letztgenannte Parameter waren auch in einer Konzentration, die auf die Gesamneuritenlänge kaum mehr Einfluss zeigte, noch signifikant verändert. Dies lässt vermuten, dass sich die Stimulation vor allem auf das Längenwachstum eines Axons auswirkt. Im Gegensatz zum Kleinhirngewebe wurde in Hinterwurzelganglien fast keine Expression des Tn-Antigens beobachtet (Akita et al. 2001a). Ein starkes Signal ist dagegen in der Eingangszone der Hinterwurzel im Rückenmark beschrieben. Das Tn-Antigen könnte hier einen Einfluss auf die Axone der DRG-Neurone haben. Zeitlich betrachtet ist die Expression im Neuralrohr viel früher wieder rückläufig als im Kleinhirn, was einen Unterschied in der Wirkung des Tn-Antigens vermuten lässt. Wie schon bei den Kleinhirnneuronen war freies GalNAc nicht in der Lage die gleichen Effekte wie das Glykomimetikum zu erzielen, dennoch war eine geringe Stimulation des längsten Neuriten bei herabgesetzter Neuritenzahl zu beobachten. Der freie Zucker scheint also nicht gänzlich unwirksam, aber wesentlich weniger effektiv als das Glykomimetikum zu sein.

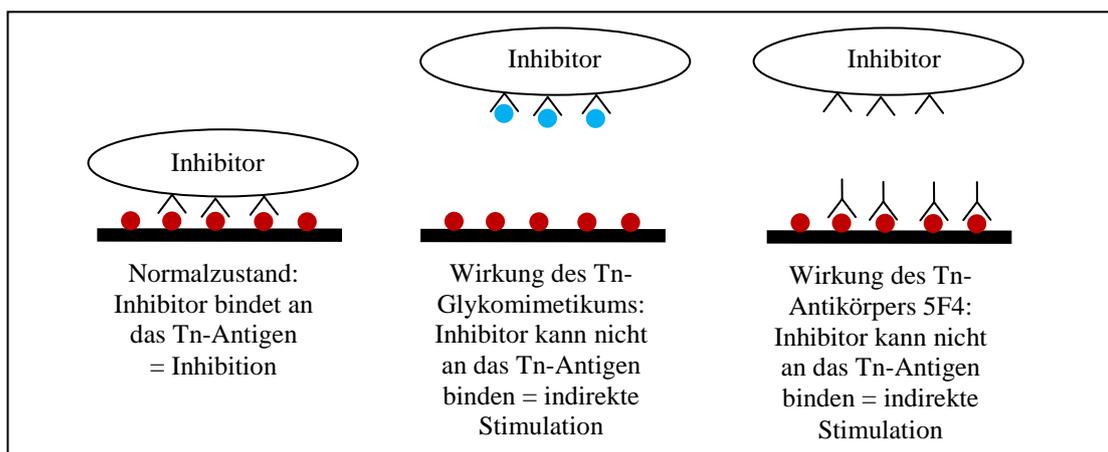


Abb. 29: Erklärungsmodell für die Stimulation des Neuritenwachstums von DRG-Neuronen. ● Tn-Antigen auf DRG-Neurit, ● Tn-Glykomimetikum, ʌ Tn-Antikörper 5F4

Überraschenderweise zeigte sich eine Wachstumsstimulation von DRG-Neuriten auch unter Einfluss des 5F4 Antikörpers. Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da Antikörper und Antigen somit die gleiche Auswirkung haben. Dass eine Beeinflussung des Wachstums durch den Antikörper bei den Kleinhirnneuronen nicht zu beobachten war, bekräftigt die Vermutung, der Wirkmechanismus des Tn-Antigens könne sich bei den Neurontypen unterscheiden. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre eine indirekte Stimulation durch die Ausschaltung eines Wachstumsinhibitors: Das Glykomimetikum besetzt die Tn-Erkennungsstellen des Inhibitors, der Antikörper die Tn-Epitope auf dem Neuron. In beiden Fällen wäre die Bindung des Inhibitors an das Neuron blockiert und eine volle Wirkungsentfaltung nicht mehr möglich (Abb. 29). Als ein solcher Inhibitor könnte z.B. das extrazelluläre Matrixprotein *Versican* fungieren. Die Isoform V2 wird

gewebespezifisch im Gehirn, vor allem in myelinisierten Fasersträngen exprimiert. Sie inhibiert konzentrationsabhängig das Neuritenwachstum von retinalen und DRG-Neuronen (Schmalfeldt et al. 2000). Die Lectin-Domäne des Moleküls ist möglicherweise in der Lage Tn-Epitope auf Syndecan-3 zu erkennen und eine Bindung einzugehen (Gould et al. 1992). Voraussetzung für das beschriebene Modell ist eine tatsächliche Expression des Tn-Epitops. Die Präparation der DRG-Neurone erfolgte aus postnatalen Mäusen (P6/P7). Nach Akita et al. (2001a) ist die Expression im Neuralrohr jedoch schon in der Embryonalphase wieder rückläufig. Ob das Tn-Antigen postnatal überhaupt auf den Axonen von DRG-Neuronen exprimiert wird, bleibt also zu klären. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch, ob das Zellüberleben von DRG-Neuronen ähnlich wie bei den Kleinhirnneuronen durch den 5F4 Antikörper herabgesetzt ist.

Eine Veränderung der Neuritenlänge von Motoneuronen bewirkte weder das Glykomimetikum noch der Tn-Antikörper. Diese Beobachtung ist erstaunlich, da eine Expression des Tn-Antigens auch in der ventralen Zone des Neuralrohrs beschrieben ist (Akita et al. 2001a). In Bezug auf die bereits diskutierten Ergebnisse wäre daher eigentlich eine Stimulation durch das Glykomimetikum zu erwarten gewesen. Möglicherweise ist die vorwiegend in der Mantelzone des Neuralrohrs beschriebene Expression aber auch nicht mit Motoneuronen assoziiert. Die gleichmäßige Ausprägung entlang neuraler Projektion lässt ebenso an eine Assoziation mit Gliazellen denken. Ob eine Beeinflussung von Oligodendrozyten vorliegt, sollte im Rahmen weiterer Experimente geklärt werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den untersuchten Neurontypen verdeutlichen erneut die Komplexität des Tn-Antigens. Zwar konnte mit den durchgeführten Experimenten eine Beteiligung an der Nervenzellentwicklung bestätigt werden, um einen tieferen Einblick in die Funktion im embryonalen Wachstum zu erhalten, sind jedoch weitere Nachforschungen anzustellen.

### **5.3 Funktionelle Charakterisierung des 5F4-Fab Fragmentes**

Fab-Fragmente stellen die antigenbindende Domäne eines Antikörpers dar. Sie werden durch enzymatische Spaltung aus dem Vollantikörper gewonnen. Nach Sequenzierung und Vektorklonierung können die Fragmente mittels bakterieller Fermentation in großem Maße gentechnisch produziert werden. Da Fab-Fragmenten der komplementaktivierende Fc-Teil fehlt, können auf diese Weise in fremden Spezies produzierte Antikörper im menschlichen Organismus für Diagnostik und Therapie zum Einsatz kommen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Fab-Fragment des 5F4 Antikörpers näher charakterisiert um eine mögliche

Verwendung im menschlichen Organismus zu beurteilen. Die Bindungseigenschaften des Fab-Fragmentes wurden dazu mit denen des Vollantikörpers verglichen.

Eine Verwendung in biochemische Methoden, die mehrere Waschschriffe erfordern, erwies sich als äußerst schwierig. Weder im Western Blot, noch in der immunhistochemischen Färbung von Gewebeschnitten konnten mit dem Fab-Fragment ähnliche Ergebnisse erzielt werden, wie mit dem Vollantikörper. Im ELISA konnte Fab nur mit abgewandeltem Standardprotokoll, wobei die Anzahl der Waschschriffe um die Hälfte reduziert wurde, verwendet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine sehr schlechte Affinität des Fab-Fragmentes hin, was aufgrund der Gewinnung aus einem IgM-Vollantikörper wenig überrascht. Antikörper vom Immunglobulin M-Typ haben naturgemäß eine eher geringe Affinität der einzelnen Bindungsstellen. In der Pentamerstruktur mit insgesamt 10 Bindestellen wird dieser Nachteil durch eine multivalente Bindung, also hohe Avidität, ausgeglichen (Boes 2000). Fab weist nur eine einzige Bindestelle auf und kann daher z.B. durch Waschvorgänge leicht vom Antigen gelöst werden. Bei der Verwendung im ELISA nach abgewandeltem Protokoll wurde das Fab-Fragment vor der Zugabe zum Antigen mit dem Zweitantikörper zusammengegeben. Der Zweitantikörper ist als  $F(ab')_2$  Fragment in der Lage zwei 5F4 Fab zu binden und erhöht so geringfügig die Avidität. Erst durch diese Veränderung des ELISA-Standardprotokolls konnte 5F4 Fab auf BSM oder dem Glykomimetikum detektiert werden. Die im Vergleich zum Vollantikörper wesentlich höheren Konzentrationen von Antigen und Antikörper betonen jedoch die schwache Interaktion. Im Gegensatz zur Affinität erwies sich die Spezifität des Fab-Fragmentes als gut. Unter fünf getesteten Zuckern konnte nur GalNAc die Bindung von Fab an das Tn-Antigen kompetieren.

Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften zwischen Vollantikörper und Fab-Fragment spiegeln sich auch in den Ergebnissen der Neuritenwachstumsexperimente wieder. Während der Vollantikörper eine deutliche Stimulation des Wachstums von DRG-Neuriten bewirkte, zeigte Fab, obwohl in einer wesentlich höheren Molarität verwendet, eine viel weniger ausgeprägte, zum Teil kaum signifikante Stimulation. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich der Einsatz des 5F4 Fab Fragmentes im Organismus als schwierig erweisen könnte. Um eine Wirkung zu erzielen müssten sehr hohe Konzentrationen verwendet werden, die sich auf den Organismus möglicherweise negativ auswirken. Es müsste daher zunächst ein Weg gefunden werden, die Affinität des Fragmentes zu verbessern.

## 5.4 Ausblick

Mit dem TnS Peptid konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein potentes Glykomimetikum für das Tn-Antigen identifiziert werden. Es wird durch den 5F4 Antikörper erkannt und ist in der Lage die Bindung an das Tn-Antigen zu kompetieren. Da im *Phage-display* keine Konsensussequenz gefunden werden konnte, bleibt der Interaktionsmechanismus mit dem Antikörper unklar. Inwiefern Prolin und Histidin bei der Bindung entscheidend sind, könnte mittels Röntgenstrukturanalyse geklärt werden. In diesem Zusammenhang könnte auch das genaue Epitop des Antikörpers bzw. die Frage nach der Erkennung des Tn-Antigens innerhalb einer bestimmten Peptidsequenz geklärt werden. Für verschiedene Tn spezifische Antikörper sind zum Teil unterschiedliche Epitope beschrieben (Li et al. 2009). Ob diese Antikörper ebenso gut an das Glykomimetikum binden, wie 5F4, bleibt noch zu überprüfen.

In Neuritenwachstumsexperimenten konnte eine Stimulation verschiedener Neurontypen durch das Glykomimetikum nachgewiesen werden. Eine Beteiligung des Tn-Antigens an der Nervenzellentwicklung wurde somit bestätigt. Ob auch die Neuritenwanderung durch das Glykomimetikum beeinflusst wird, könnte in weiteren Experimenten geklärt werden. Aufgrund der Ergebnisse aus den Wachstumsexperimenten ist eine Interaktion des Glykomimetikums mit spezifischen Rezeptoren anzunehmen. Es könnte daher zur Identifikation von Bindungspartnern des Tn-Antigens genutzt werden. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf Proteinen der extrazellulären Matrix, die auch als Interaktionspartner für das Tn-Trägerprotein *Syndecan-3* bekannt sind. Auf diese Weise könnten weitere physiologische Funktionen des Tn-Antigens aufgedeckt werden.

Langfristig ist ein Einsatz des Glykomimetikums auch in der Diagnostik und Therapie von Erkrankungen, die auf einer Fehlregulation des Tn-Antigens beruhen, denkbar. N- oder C-terminale Modifikationen hatten auf die Bindung an den Tn-spezifischen Antikörper 5F4 keinen signifikanten Einfluss. Das TnS-Peptid kann also an beiden Enden modifiziert werden, ohne seine Fähigkeit als Glykomimetikum zu verlieren. Diese Tatsache eröffnet ein breites Spektrum an Behandlungsmöglichkeiten und verleiht dem Glykomimetikum einen entscheidenden Vorteil gegenüber der eigentlichen Glykanstruktur. Bevor es aber zu einer Anwendung im menschlichen Organismus kommen kann, sollten weitere Nachforschungen angestellt werden, um die physiologische Funktion des Tn-Antigens besser zu verstehen.

## 6 Zusammenfassung

Kohlenhydratstrukturen sind ein entscheidender Bestandteil des menschlichen Organismus. Sie sind vielfach involviert in Prozesse der Zellerkennung und Signaltransduktion, vermitteln aber auch die Entstehung von Tumoren und Infektionserkrankungen. Im Nervensystem sind verschiedene Glykane an Zellmigration, Neuritenwachstum und Synapsenbildung beteiligt. Das Tn-Antigen (CD 175) ist ein mit Serin oder Threonin O-glykosidisch verknüpfter N-Acetylgalaktosamin-Rest, der während des embryonalen Wachstums zeitlich und räumlich begrenzt im zentralen Nervensystem exprimiert wird. Zur physiologischen Bedeutung des Tn-Antigens ist bislang wenig bekannt, wohingegen es im adulten Organismus ein etablierter Tumormarker ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologische Funktion des Tn-Antigens im Nervensystem mithilfe von Glykomimetika näher zu untersuchen. Mit der *Phage-display*-Technik konnte das Peptid mit der Aminosäuresequenz H-Tn-Peptid S<sup>\*</sup>-OH als Bindungspartner für den Tn-spezifischen Antikörper 5F4 identifiziert werden. Es ist in der Lage die Bindung des Antikörpers an das Tn-Antigen zu kompetieren und stellt somit ein Glykomimetikum für das Tn-Antigen dar. In Zellkulturversuchen bewirkte das Glykomimetikum eine Wachstumsstimulation der Neuriten von Kleinhirn- und DRG-Neuronen, Motoneurone zeigten sich unverändert. Aufgrund der zeitlich und räumlich begrenzten Expression wurde schon länger eine Funktion des Tn-Antigens bei der Nervenzellentwicklung vermutet. Diese Vermutung konnte mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Auf das Zellüberleben hatte das Glykomimetikum keinen Einfluss, da aber der 5F4 Antikörper das Zellüberleben deutlich herabsetzte, ist auch hier von einer Beteiligung des Tn-Antigens auszugehen.

Da in Diagnostik und Therapie von Erkrankungen häufig Fab-Fragmente zum Einsatz kommen, sollte der 5F4 Antikörper als rekombinantes Fab-Fragment ebenfalls in in-vitro Studien untersucht werden. Hier konnte zwar eine relativ gute Spezifität gezeigt werden, bedingt durch die niedrige Affinität konnte das Fab-Fragment jedoch lange nicht die Effekte erzielen, die mit dem Vollantikörper zu beobachten waren. Der Einsatz im menschlichen Organismus könnte sich daher als schwierig erweisen.

---

\* Peptidsequenz entfernt, siehe Erklärung/Vereinbarung S. 72

## 7 Literaturverzeichnis

- Akita, K, Fushiki, S, Fujimoto, T, Inoue, M, Oguri, K, Okayama, M, Yamashina, I & Nakada, H (2001a). Developmental expression of a unique carbohydrate antigen, Tn antigen, in mouse central nervous tissues. *Journal of Neuroscience Research*, 65(6), pp.595-603.
- Akita, K, Fushiki, S, Fujimoto, T, Munesue, S, Inoue, M, Oguri, K, Okayama, M, Yamashina, I & Nakada, H (2001b). Identification of the core protein carrying the Tn antigen in mouse brain: specific expression on syndecan-3. *Cell Structure and Function*, 26(5), pp.271-278.
- Akita, K, Toda, M, Hosoki, Y, Inoue, M, Fushiki, S, Oohira, A, Okayama, M, Yamashina, I & Nakada, H (2004). Heparan sulphate proteoglycans interact with neurocan and promote neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *The Biochemical Journal*, 383(Pt 1), pp.129-138.
- Alavi, A & Axford, JS (2008). Sweet and sour: the impact of sugars on disease. *Rheumatology (Oxford, England)*, 47(6), pp.760-770.
- Alvarez Errico, D, Medeiros, A, Míguez, M, Casaravilla, C, Malgor, R, Carmona, C, Nieto, A & Osinaga, E (2001). O-glycosylation in *Echinococcus granulosus*: identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Experimental Parasitology*, 98(2), pp.100-109.
- Astronomo, RD & Burton, DR (2010). Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(4), pp.308-324.
- Avichezer, D, Springer, GF, Schechter, B & Arnon, R (1997). Immunoreactivities of polyclonal and monoclonal anti-T and anti-Tn antibodies with human carcinoma cells, grown in vitro and in a xenograft model. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 72(1), pp.119-127.
- Bandtlow, CE & Zimmermann, DR (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiological Reviews*, 80(4), pp.1267-1290.
- Barr, N, Taylor, CR, Young, T & Springer, GF (1989). Are pancarcinoma T and Tn differentiation antigens? *Cancer*, 64(4), pp.834-841.
- Bartolozzi, A & Seeberger, PH (2001). New approaches to the chemical synthesis of bioactive oligosaccharides. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5), pp.587-592.
- Berger, EG (1999). Tn-syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1455(2-3), pp.255-268.
- Bespalov, MM, Sidorova, YA, Tumova, S, Ahonen-Bishopp, A, Magalhães, AC, Kuleskiy, E, Paveliev, M, Rivera, C, Rauvala, Heikki & Saarna, M (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *The Journal of Cell Biology*, 192(1), pp.153-169.
- Björk, I & Lindahl, U (1982). Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 48(3), pp.161-182.

- Blumenkrantz, N, Rosenbloom, J & Prockop, DJ (1969). Sequential steps in the synthesis of hydroxylysine and the glycosylation of hydroxylysine during the biosynthesis of collagen. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 192(1), pp.81-89.
- Boes, M (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology*, 37(18), pp.1141-1149.
- Bradbury, ARM (2010). The use of phage display in neurobiology. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al]*, Chapter 5, p.Unit 5.12.
- Brooks, CL, Schietinger, A, Borisova, SN, Kufer, P, Okon, M, Hiram, T, Mackenzie, CR, Wang, L-X, Schreiber, H & Evans, SV (2010). Antibody recognition of a unique tumor-specific glycopeptide antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), pp.10056-10061.
- Bächle, D, Loers, G, Guthöhrlein, EW, Schachner, M & Sewald, N (2006). Glycomimetic cyclic peptides stimulate neurite outgrowth. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45(39), pp.6582-6585.
- Cao, Y, Stosiek, P, Springer, GF & Karsten, U (1996). Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochemistry and Cell Biology*, 106(2), pp.197-207.
- Collins, J & Bönnemann, CG (2010). Congenital muscular dystrophies: toward molecular therapeutic interventions. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10(2), pp.83-91.
- Corzana, F, Busto, JH, Marcelo, F, de Luis, MG, Asensio, JL, Martín-Santamaría, S, Sáenz, Y, Torres, C, Jiménez-Barbero, J, Avenoza, A & Peregrina, JM (2011). Rational design of a Tn antigen mimic. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 47(18), pp.5319-5321.
- Dalziel, M, Whitehouse, C, McFarlane, I, Brockhausen, I, Gschmeissner, S, Schwientek, T, Clausen, H, Burchell, JM & Taylor-Papadimitriou, J (2001). The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), pp.11007-11015.
- Dausset, J, Moullec, J & Bernard, J (1959). Acquired hemolytic anemia with polyagglutinability of red blood cells due to a new factor present in normal human serum (Anti-Tn). *Blood*, 14, pp.1079-1093.
- Desai, PR (2000). Immunoreactive T and Tn antigens in malignancy: role in carcinoma diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Transfusion Medicine Reviews*, 14(4), pp.312-325.
- Downs, F & Pigman, W (1969). Preparation of glycopeptides from bovine submaxillary mucin by chemical degradation. *Biochemistry*, 8(4), pp.1760-1766.
- Fiedler, K & Simons, K (1995). The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell*, 81(3), pp.309-312.
- Geraci, C, Consoli, GML, Galante, E, Bousquet, E, Pappalardo, M & Spadaro, A (2008).

- Calix[4]arene decorated with four Tn antigen glycomimetic units and P3CS immunoadjuvant: synthesis, characterization, and anticancer immunological evaluation. *Bioconjugate Chemistry*, 19(3), pp.751-758.
- Gill, DJ, Clausen, H & Bard, F (2011). Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends in Cell Biology*, 21(3), pp.149-158.
- Gould, SE, Upholt, WB & Kosher, RA (1992). Syndecan 3: a member of the syndecan family of membrane-intercalated proteoglycans that is expressed in high amounts at the onset of chicken limb cartilage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), pp.3271-3275.
- Hansen, JE, Nielsen, C, Arendrup, M, Olofsson, S, Mathiesen, L, Nielsen, JO & Clausen, H (1991). Broadly neutralizing antibodies targeted to mucin-type carbohydrate epitopes of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 65(12), pp.6461-6467.
- Hart, GW, Haltiwanger, RS, Holt, GD & Kelly, WG (1989). Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annual Review of Biochemistry*, 58, pp.841-874.
- Hofsteenge, J, Müller, DR, de Beer, T, Löffler, A, Richter, WJ & Vliegthart, JF (1994). New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase U. *Biochemistry*, 33(46), pp.13524-13530.
- Ishida, A, Ohta, M, Toda, M, Murata, T, Usui, T, Akita, K, Inoue, M & Nakada, H (2008). Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation. *Proteomics*, 8(16), pp.3342-3349.
- Jaeken, J & Matthijs, G (2007). Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 8, pp.261-278.
- Johnson, MA & Pinto, BM (2002). Molecular Mimicry of Carbohydrates by Peptides. *Aust. J. Chem.*, 55(2), pp.13-25.
- Ju, T & Cummings, RD (2005). Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature*, 437(7063), p.1252.
- Ju, T, Aryal, RP, Stowell, CJ & Cummings, RD (2008a). Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc. *The Journal of Cell Biology*, 182(3), pp.531-542.
- Ju, T, Lanneau, GS, Gautam, T, Wang, Y, Xia, B, Stowell, SR, Willard, MT, Wang, W, Xia, JY, Zuna, RE, Laszik, Z, Benbrook, DM, Hanigan, MH & Cummings, RD (2008b). Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Research*, 68(6), pp.1636-1646.
- Ju, T, Otto, VI & Cummings, RD (2011). The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(8), pp.1770-1791.
- Julian, BA & Novak, J (2004). IgA nephropathy: an update. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 13(2), pp.171-179.
- Kaila, N & Thomas, BE (2002). Design and synthesis of sialyl Lewis(x) mimics as E- and

- P-selectin inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 22(6), pp.566-601.
- Katagihallimath, N, Mehanna, A, Guseva, D, Kleene, R & Schachner, M (2010). Identification and validation of a Lewis x glycomimetic peptide. *European Journal of Cell Biology*, 89(1), pp.77-86.
- Kleene, R & Schachner, M (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(3), pp.195-208.
- Li, Q, Anver, MR, Butcher, DO & Gildersleeve, JC (2009). Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer vaccines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(4), pp.971-979.
- von der Lieth, CW, Frank, M & Lindhorst, TK (2002). Molecular dynamics simulations of glycoclusters and glycodendrimers. *Journal of Biotechnology*, 90(3-4), pp.311-337.
- Lowe, JB & Marth, JD (2003). A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annual Review of Biochemistry*, 72, pp.643-691.
- Marvin, DA & Hohn, B (1969). Filamentous bacterial viruses. *Bacteriological Reviews*, 33(2), pp.172-209.
- Marvin, DA & Wachtel, EJ (1976). Structure and assembly of filamentous bacterial viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 276(943), pp.81-98.
- Mehanna, A, Jakovcevski, I, Acar, A, Xiao, M, Loers, G, Rougon, G, Irintchev, A & Schachner, M (2010). Polysialic acid glycomimetic promotes functional recovery and plasticity after spinal cord injury in mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(1), pp.34-43.
- Miller, N, Williams, GM & Brimble, MA (2009). Synthesis of fish antifreeze neoglycopeptides using microwave-assisted "click chemistry." *Organic Letters*, 11(11), pp.2409-2412.
- Nolo, R, Kaksonen, M, Raulo, E & Rauvala, H (1995). Co-expression of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) and N-syndecan (syndecan-3) in developing rat brain. *Neuroscience Letters*, 191(1-2), pp.39-42.
- Oldenburg, KR, Loganathan, D, Goldstein, IJ, Schultz, PG & Gallop, MA (1992). Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), pp.5393 -5397.
- O'Connor, RM, Kim, K, Khan, F & Ward, HD (2003). Expression of Cpgp40/15 in *Toxoplasma gondii*: a surrogate system for the study of *Cryptosporidium* glycoprotein antigens. *Infection and Immunity*, 71(10), pp.6027-6034.
- Peacocke, M & Siminovitch, KA (1992). Wiskott-Aldrich syndrome: new molecular and biochemical insights. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 27(4), pp.507-519.
- Pratt, MR, Hang, HC, Ten Hagen, KG, Rarick, J, Gerken, TA, Tabak, LA & Bertozzi, CR (2004). Deconvoluting the functions of polypeptide N-alpha-acetylgalactosaminyltransferase family members by glycopeptide substrate

- profiling. *Chemistry & Biology*, 11(7), pp.1009-1016.
- Saeland, E, van Vliet, SJ, Bäckström, M, van den Berg, VCM, Geijtenbeek, TBH, Meijer, GA & van Kooyk, Y (2007). The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 56(8), pp.1225-1236.
- Schmalfeldt, M, Bandtlow, CE, Dours-Zimmermann, MT, Winterhalter, KH & Zimmermann, DR (2000). Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 5), pp.807-816.
- Scott, JK, Loganathan, D, Easley, RB, Gong, X & Goldstein, IJ (1992). A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), pp.5398-5402.
- Sears, P & Wong, CH (1999). Carbohydrate Mimetics: A New Strategy for Tackling the Problem of Carbohydrate-Mediated Biological Recognition. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 38(16), pp.2300-2324.
- Sharon, N (1996). Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 408, pp.1-8.
- Smith, GP (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), pp.1315-1317.
- Springer, GF (1997). Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 75(8), pp.594-602.
- Springer, GF & Tegtmeyer, H (1981). Origin of anti-Thomsen-Friedenreich (T) and Tn agglutinins in man and in White Leghorn chicks. *British Journal of Haematology*, 47(3), pp.453-460.
- Springer, GF, Desai, PR & Banatwala, I (1974). Blood group MN specific substances and precursors in normal and malignant human breast tissues. *Die Naturwissenschaften*, 61(10), pp.457-458.
- Stanley, P, Sund, H & Taniguchi, N (2009). Essentials of Glycobiology, Chapter 8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch8> [Accessed July 28, 2010].
- Van den Steen, P, Rudd, PM, Dwek, RA & Opdenakker, G (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33(3), pp.151-208.
- Sund, H, Weber, K & Mölbert, E (1967). Dissoziation der Rinderleber-Katalase in ihre Untereinheiten. *European Journal of Biochemistry*, 1(4), pp.400-410.
- Tarp, MA, Sørensen, AL, Mandel, U, Paulsen, H, Burchell, J, Taylor-Papadimitriou, J & Clausen, H (2007). Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat. *Glycobiology*, 17(2), pp.197-209.

- Thurnher, M, Clausen, H, Sharon, N & Berger, EG (1993). Use of O-glycosylation-defective human lymphoid cell lines and flow cytometry to delineate the specificity of Moluccella laevis lectin and monoclonal antibody 5F4 for the Tn antigen (GalNAc alpha 1-O-Ser/Thr). *Immunology Letters*, 36(3), pp.239-243.
- Tian, E & Ten Hagen, KG (2007). O-linked glycan expression during Drosophila development. *Glycobiology*, 17(8), pp.820-827.
- Tsuji, T & Osawa, T (1986). Carbohydrate structures of bovine submaxillary mucin. *Carbohydrate Research*, 151, pp.391-402.
- Varki, A (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), pp.97-130.
- Varki, A (2006). Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution. *Cell*, 126(5), pp.841-845.
- Venter, JC, Adams, MD, Myers, EW, Li, PW, Mural, RJ, Sutton, GG, Smith, HO, Yandell, M, Evans, CA, Holt, RA u.a. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), pp.1304-1351.
- Voynow, JA & Rubin, BK (2009). Mucins, mucus, and sputum. *Chest*, 135(2), pp.505-512.
- Weis, W, Brown, JH, Cusack, S, Paulson, JC, Skehel, JJ & Wiley, DC (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 333(6172), pp.426-431.
- Wopereis, S, Lefeber, DJ, Morava, E & Wevers, RA (2006). Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clinical Chemistry*, 52(4), pp.574-600.
- Zarschler, K, Janesch, B, Pabst, M, Altmann, F, Messner, P & Schäffer, C (2010). Protein tyrosine O-glycosylation--a rather unexplored prokaryotic glycosylation system. *Glycobiology*, 20(6), pp.787-798.
- Zhang, Y, Iwasaki, H, Wang, H, Kudo, T, Kalka, TB, Hennes, T, Kubota, T, Cheng, L, Inaba, N, Gotoh, M, Togayachi, A, Guo, J, Hisatomi, H, Nakajima, K, Nishihara, S, Nakamura, M, Marth, JD & Narimatsu, H (2003). Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc alpha-serine/threonine antigen. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(1), pp.573-584.
- Zhou, M & O'Doherty, G (2008). The de novo synthesis of oligosaccharides: application to the medicinal chemistry SAR-study of digitoxin. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(2), pp.114-125.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APS	Ammonium persulfat
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
BSM	Bovines submaxilläres Mucin
dH <sub>2</sub> O	Wasser, destilliert
ddH <sub>2</sub> O	Wasser, doppelt destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRG	Dorsal Root Ganglion
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Fragment antigen binding
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
gp	Glycoprotein
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimid Ester
MWCO	Molecular weight cut off
OPD	Ortho-Phenylendiamin
p7	Postnatahtag 7

PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline + Tween
pfu	plaque forming unit
PLL	Poly-L-Lysin
PLO	Poly-L-Ornithin
ppGalNAcT	$\alpha$ -N-acetylgalaktosaminyltransferase
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
Ser	Serin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline + Tween
Thr	Threonin
UDP	Uridindiphosphat
XGal	5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

**Aminosäuren:**

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Kernstrukturen der GalNAc-O-Glykane (Schema).....	4
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Zellmembran.....	5
Abb. 3:	Biochemische Struktur des Tn-Antigens.....	7
Abb. 4:	Biosynthese des Tn-Antigens (Schema).....	8
Abb. 5:	Struktur eines filamentösen Phagen (Schema).....	12
Abb. 6:	Ablauf der Selektion von Peptiden/Proteinen aus Phagenbibliotheken mittels <i>Phage-display</i> .....	13
Abb. 7:	Bindung von 5F4-IgM an sequenzierte Phagenklone (unverdünntes Amplifikat) der linearen Phagenbibliothek im ELISA.....	35
Abb. 8:	Bindung von 5F4 IgM an sequenzierte Phagenklone (unverdünntes Amplifikat) der cyclischen Phagenbibliothek im ELISA.....	36
Abb. 9:	Bindung von 5F4 IgM an selektierte Phagenklone der linearen Phagenbibliothek im ELISA.....	37
Abb. 10:	Bindung von 5F4 IgM an selektierte Phagenklone der cyclischen Phagenbibliothek im ELISA.....	37
Abb. 11:	Selektierte Phagenklone im Western Blot.....	38
Abb. 12:	Bindung von 5F4 IgM an BSM im ELISA.....	40
Abb. 13:	Enzymverdautes BSM in Silberfärbung und Western Blot.....	40
Abb. 14:	Bindung von 5F4 IgM an BSM kompetiert durch Peptide im ELISA.....	41
Abb. 15:	Aufreinigungsschritte der 5F4 Fab Affinitätschromatografie im SDS-Gel.....	41
Abb. 16:	Bindung von 5F4 Fab an BSM im ELISA.....	42
Abb. 17:	Bindung von 5F4 Fab an BSM kompetiert durch GalNAc im ELISA.....	43
Abb. 18:	Bindung von 5F4 Fab an BSM kompetiert durch verschiedene Einfachzucker im ELISA.....	43
Abb. 19:	5F4 IgM und Fab in der immunhistochemischen Färbung von p7-Kleinhirn- schnitten.....	44
Abb. 20:	Immunhistochemisches Färbemuster von 5F4 IgM/FITC, Überlagerung mit Calbindin/TRITC.....	45
Abb. 21:	Bindung von 5F4 IgM bzw. Fab an TnSKat im ELISA.....	46
Abb. 22:	Bindung von 5F4 IgM bzw. Fab an TnSKat kompetiert durch GalNAc im ELISA.....	46
Abb. 23:	TnSKat im Western Blot.....	47
Abb. 24:	Einfluss von TnS auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen.....	48

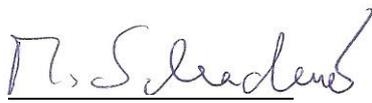
Abb. 25: Einfluss von TnSKat auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen.....	49
Abb. 26: Einfluss von TnS auf das Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglien- neuronen .....	50
Abb. 27: Einfluss des 5F4 Tn-Antikörpers auf das Neuritenwachstum von Hinterwurzel- ganglienneuronen .....	51
Abb. 28 Zellüberleben von Kleinhirnneuronen unter Einfluss von GalNAc, Glykomimetikum und 5F4 Antikörper .....	52
Abb. 29: Erklärungsmodell für die Stimulation des Neuritenwachstum von DRG- Neuronen .....	57

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Herkunft verwendeter Chemikalien .....	15
Tab. 2: Primäre Antikörper .....	21
Tab. 3: Sekundäre Antikörper, fluoreszierend.....	21
Tab. 4: Sekundäre Antikörper, HRP-konjugiert .....	21
Tab. 5: Peptidsequenzen .....	22
Tab. 6: Konzentration von Glykomimetikum und Antikörpern zur Beschichtung der Zellkulturplatten .....	30
Tab. 7: Aminosäuresequenzen der pIII-Fusionspeptide aus den selektierten Phagen- klonen der linearen und cyclischen Phagenbibliothek .....	34
Tab. 8: Charakteristika der selektierten Peptidsequenzen .....	38

#### 8.4 Erklärung/Vereinbarung

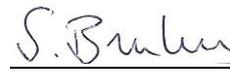
Die Aminosäuresequenz des Peptids, das im Rahmen der Doktorarbeit von Sandra Bruhn als Mimetikum des Tn-Zuckerepitops identifiziert und charakterisiert wurde, ist den Unterzeichnern dieser Vereinbarung/Erklärung bekannt. Zur Wahrung bzw. Sicherung einer möglichen späteren Verwertung bzw. Patentierung, wird die Sequenz in der Doktorarbeit nicht veröffentlicht. Die Sequenz wurde aus den Tabellen entfernt und mit einer Fußnote mit dem Verweis auf diese Erklärung versehen und im Text durch „Tn-Peptid S“ ersetzt.



Melitta Schachner



Ralf Kleene



Sandra Bruhn

## 9 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Melitta Schachner für die Überlassung des Themas und dafür, dass ich diese Arbeit an Ihrem Institut durchführen konnte. Dr. habil. Ralf Kleene danke ich für die intensive Betreuung der Arbeit. Vielen Dank für viele hilfreiche Tipps und anregende Diskussionen. Danke auch an Dr. Gabriele Loers für die Einführung in die Zellkultur und für die Beantwortung zahlreicher Fragen.

Shiwei Wang danke ich für die Einarbeitung in die *Phage-Display*-Technik. Michael Knepper danke ich für die Überlassung des rekombinanten Fab-Fragmentes, sowie für die intensive Zusammenarbeit bei der Charakterisierung desselbigen. Danke für zahlreiche Verbesserungsvorschläge und für die Motivationsarbeit nach Rückschlägen.

Vielen Dank an Igor Jakovcevski für die Hilfe bei der immunhistochemischen Färbung und der anschließenden Auswertung am Mikroskop. Danke auch an Emanuela Szpotowicz für die Überlassung der histologischen Schnitte.

Ein großer Dank geht an Dr. Iris Oezen und Norman Rusche für die Zusammenarbeit in der Zellkultur. Mit euch wurde es dort nie langweilig. Danke auch an Thomas Theis für viele hilfreiche Tipps bei der statistischen Auswertung.

Allen Mitarbeitern aus der AG Schachner, die bislang namentlich unerwähnt sind, danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Dank euch habe ich mich immer sehr wohl gefühlt.

Ich danke meinen Eltern für die ständige Motivationsarbeit beim Schreiben dieser Arbeit. Patrick Sauppe danke ich für sein immerwährendes Verständnis und für viele aufbauende Worte. Ihr habt in vielen Dingen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

## **10 Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....  .....