

Analyse der Bindung von Gangliosid- Derivaten an das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

Vorgelegt von
So-Young Shin
aus Hamburg

Hamburg, 2005



Universität Hamburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Hans Paulsen

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Zeitraum von September 2000 bis November 2004 im Institut für Organische Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bernd Meyer angefertigt.

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. Wittko Francke

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer für die interessante Themenstellung und für die freundliche und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

*But first whom shall we send
In search of this new world, whom shall we find
Sufficient? who shall tempt with wand'ring feet
The dark unbottom'd infinite Abyss
And through the palpable obscure find out
His uncouth way, or spread his airy flight
Upbourne with indefatigable wings
Over the vast abrupt, ere he arrive
The happy Isle; what strength, what art can then
Suffice, or what evasion bear him safe
Through the strict Senteries and Stations thick
Of Angels watching round?*

Paradise Lost, Book II

John Milton

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	11
1.1	ZELLEN DES NERVENSYSTEMS	12
1.1.1	<i>Nervenzellen</i>	12
1.1.2	<i>Glia-Zellen</i>	14
1.2	DAS NERVENSYSTEM	16
1.3	DAS RÜCKENMARK	16
1.4	SPINAL CORD INJURY (SCI)	19
1.5	INHIBITION DER REGENERATION DURCH MYELIN.....	21
1.6	BIDIREKTIONALE WIRKUNG DER MYELIN-INHIBITOREN	25
1.7	THERAPIEANSÄTZE.....	26
1.7.1	<i>Neurotrophine</i>	27
1.7.2	<i>Transplantate (Grafts)</i>	27
1.7.3	<i>Probleme bei der Regeneration</i>	28
1.8	MYELIN-ASSOZIIERTES GLYCOPROTEIN (MAG)	29
1.8.1	<i>Struktur und Aufbau des Myelin-assoziierten Glycoproteins</i>	29
1.8.2	<i>Siglecs</i>	29
1.8.3	<i>Sialinsäure-Bindungsstelle des MAG</i>	30
1.8.4	<i>Inhibierende Wirkung des MAG</i>	30
1.8.5	<i>Die MAG-Chimäre: FcMAGd1-3</i>	31
2	SATURATION TRANSFER DIFFERENCE NMR	32
3	PROBLEMSTELLUNG	37

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	38
4.1	STUDIEN ZUR SÄTTIGUNG DES PROTEINS	40
4.2	ARTEFAKTE VON LIGANDEN.....	42
4.3	ÜBERSICHT DER BEARBEITETEN LIGANDEN.....	44
4.4	STD-NMR STUDIEN VON SIALOGLYCOKONJUGATEN: DIE DISSOZIATIONSKONSTANTEN.....	46
4.4.1	<i>Dissoziationskonstanten der Trisaccharide</i>	47
4.4.2	<i>Dissoziationskonstanten der Tetrasaccharide</i>	51
4.4.3	<i>Vergleich der Tri- und Tetrasaccharide</i>	54
4.4.4	<i>Evaluation der 2,6-verknüpften Sialinsäure</i>	55
4.4.5	<i>2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid</i>	59
4.4.6	<i>Vergleich der K_D-Werte mit rIP-Werten</i>	61
4.5	STD-NMR STUDIEN VON SIALOGLYCOKONJUGATEN: BESTIMMUNG DES BINDUNGSEPITOPS	64
4.5.1	<i>Bindungsepitope der Trisaccharide</i>	67
4.5.2	<i>Bindungsepitope der Tetrasaccharide</i>	70
4.5.3	<i>Vergleich der Tri- und Tetrasaccharide</i>	73
4.5.4	<i>Evaluation der 2,6-verknüpften Sialinsäure</i>	78
4.5.5	<i>2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid</i>	81
4.5.6	<i>Structure Activity Relationship (SAR)</i>	83
4.6	UNTERSUCHUNGEN ZUR PRÄPARATION VON LIPOSOMEN.....	85
4.7	GANGLIOSIDSPALTUNG	92
4.7.1	<i>Untersuchungen mit MALDI-TOF MS und ESI MS</i>	93
4.7.2	<i>Untersuchungen mit NMR</i>	94
4.8	AUSBLICK	97

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
6	SUMMARY.....	102
7	EXPERIMENTELLER TEIL.....	105
7.1	CHEMIKALIEN	105
7.2	GERÄTE.....	106
7.3	SICHERHEIT	108
7.4	PUFFER.....	108
7.5	STD NMR SPEKTREN.....	109
7.5.1	<i>Titrationen.....</i>	<i>109</i>
7.5.2	<i>Bestimmung des Bindungsepitopes</i>	<i>110</i>
7.6	LIPOSOMENPRÄPARATION	111
7.7	GANGLIOSIDSPALTUNG	112
7.8	ZUORDNUNGEN	113
7.9	ÜBERSICHT DER STD PARAMETER.....	120
7.9.1	<i>Parameter für die Titrationen</i>	<i>120</i>
7.9.2	<i>Parameter für die Bestimmung der Bindungsepitope</i>	<i>120</i>
8	LITERATUR	121
9	APPENDIX.....	129
9.1	VERWENDETE PULSPROGRAMME.....	129
9.2	LEBENS LAUF	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
Ac	Acetyl-
cAMP	<i>3'-5'-cyclic Adenosinemonophosphate</i>
CCA	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMPC	1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-phosphocholin
DMPG	2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac (1-glycerol)-Natriumsalz
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>
Gal	D-Galactose
GalNAc	2-Amino-2-desoxy-N-acetylgalactose
Glc	D-Glucose
GlcNAc	2-Amino-2-desoxy-N-acetylglucose
gp	Glycoprotein
GPI	Glycophosphatidylinositol
GTPase	Guanosin Triphosphatase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR-MAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IC50	<i>50 % inhibitory concentration</i>
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphat
K _D	Dissoziationskonstante
k _{off}	Dissoziationsrate
k _{on}	Assoziationsrate
LINGO	<i>LRR and Ig domain-containing, Nogo Receptor interacting protein</i>
LRR	<i>Leucine rich repeat</i>
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight</i>
Me	Methyl-
MS	<i>Massenspektrometrie</i>
NgR	Nogo Rezeptor
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>

NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy</i>
OMgp	Oligodendrozyten Myelin Glycoprotein
p75 ^{NTR}	Neurotrophin Rezeptor p75
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PNS	Periphäres Nervensystem
ppm	<i>parts per million</i>
rIP	<i>relative inhibitory potency</i>
RP	<i>Reversed phase</i>
S/N	Signal to Noise Ratio (Signal zu Rausch Verhältnis)
SAR	<i>Structure Activity Relationship</i>
SCI	<i>Spinal Cord Injury</i>
SDS PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
Sia	Sialinsäure
Siglec	<i>Sialic acid binding immunoglobulin-like lectin</i>
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
T	Temperatur
T ₁	longitudinale Relaxationszeit
T ₂	transversale Relaxationszeit
T _c	<i>gel-liquid crystal transition temperature</i>
TD	<i>Time Domain</i>
TFE	Trifluorethanol
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die Richtungen im Körper

dorsal	in Richtung des Rücken gelegen
kaudal	in Richtung des Steiß gelegen
kollateral	benachbart
kontralateral	auf der entgegengesetzten Seite
lateral	seitlich
parasagittal	jede Ebene parallel zur sagittalen
rostral	in Richtung des Munds gelegen
sagittal	teilt den Körper in rechts und links (Mitte)
ventral	in Richtung des Bauches gelegen

Liste der Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 EINLEITUNG

Es ist allgemein bekannt, dass Verletzungen im adulten zentralen Nervensystems (ZNS) sehr schlecht oder gar nicht heilen¹. Die beschädigten Nervenbahnen können sich nicht regenerieren, und die damit verbundene Funktion ist in der Regel irreversibel verloren. Dies gilt sowohl für das Gehirn als auch für das Rückenmark.

Die Folgen einer schweren Verletzung des Rückenmarks, in englisch: *Spinal Cord Injury* (SCI), sind in der Regel dramatisch. Es drohen ein Verlust der Kontrolle über Motorik, Blasen-, Darm- und Sexualfunktionen. Des weiteren verliert der Patient die Wahrnehmung von Schmerz, Temperatur etc. in dem gelähmten Bereich. Jährlich treten allein in den USA 11000 Fälle von traumatischer SCI auf. Verursacht werden nach einer Statistik der amerikanischen *National Spinal Cord Injury Association* (NSCIA)², etwa die Hälfte (42 %) durch Kraftfahrzeugunfälle, 24 % durch Gewalteinwirkung, 22 % durch Stürze und 8 % durch Sportunfälle³. Ferner kann es auch zu SCI durch Krankheiten wie Polio kommen.

Im Gegensatz dazu stehen Verletzungen im peripheren Nervensystem (PNS)¹. Hier kann die Funktionalität teilweise oder sogar vollständig wiederhergestellt werden. Ein wesentlicher Unterschied hierbei ist die Anwesenheit unterschiedlicher Gliazellen in den beiden Systemen. So haben z.B. die Schwann-Zellen die Aufgabe der Myelinierung der Axone im PNS und Oligodendrozyten dieselbe Aufgabe im ZNS. Dabei fördern die Schwann-Zellen die Regeneration, während die Oligodendrozyten sie inhibieren⁴.

Lange Zeit war man der Meinung, dass das ZNS inhärent keine Regenerationsfähigkeit besitzt. Durch die Arbeiten von Tello⁵ und Berry⁶ wurde jedoch gezeigt, dass ZNS Neuronen in einer vorteilhaften Umgebung durchaus in der Lage sind zu regenerieren. Daher war es klar, dass es eine aktive Inhibierung der Regeneration geben muss. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über das Nervensystem, das Rückenmark und seine Zellen gegeben.

Nervenzellen besitzen vier morphologisch definierbare Kompartimente (Siehe Abbildung 1).

1. Der Zellkörper, auch genannt Soma oder Perikaryon, umfasst den Zellkern und das Cytoplasma mit den Zellorganellen.
2. Die Dendriten empfangen die Mehrzahl aller Synapsen zur Informationsaufnahme durch das Neuron. Je nach Anzahl der primären Dendriten erfolgt eine Klassifikation der Neuronen in uni-, bi-, pseudouni- und multipolar.
3. Die Axone werden auch Neuriten genannt. Sie können das Aktionspotential, das am Initialsegment entstanden ist, in die Zielgebiete weiterleiten. In der Regel besitzt jede Nervenzelle nur ein Axon, welches aber meist viele Kollateralen ausbildet. Das Axon, oder auch Achsenzylinder, ist von einer Myelinscheide umgeben. Im PNS werden, abhängig vom Myelingehalt, markreiche und markarme Nerven unterschieden. Bei markarmen Nerven im PNS werden mehrere Axone vom Cytoplasma einer Schwann-Zelle umschlossen. Im ZNS hingegen haben markarme Nerven keine besonderen Hüllstrukturen. Bei markreichen Nerven im PNS werden jeweils Teile der Axone von einer Schwann-Zelle spiralartig umhüllt. Die Ranvierschen Schnürringe entstehen dabei jeweils zwischen zwei Schwann-Zellen. Im ZNS übernehmen die Oligodendrozyten diese Aufgabe.
4. Die Synapsen sind die besonderen Differenzierungen am Ende des Axons. Sie sind Übergangsstellen für die diskontinuierliche Erregungsübertragung. Wenn ein Aktionspotential den präsynaptischen Spalt erreicht, werden Neurotransmitter freigesetzt, die durch den synaptischen Spalt diffundieren, und auf der anderen Seite erneut ein Aktionspotential auslösen, wodurch die Reizübertragung fortgesetzt wird. Durch die Synapsen findet die Verknüpfung der Neuronen untereinander und mit den Erfolgsorganen statt. Dabei ist durch den Aufbau des synaptischen Spalts und der Nervenzelle die Richtung der Reizweiterleitung gegeben.

Kurz zusammengefasst funktioniert die Reizaufnahme und Weiterleitung auf folgende Art:

Der Reiz wird von einer Membran aufgenommen

- Die Permeabilität für Natriumionen wird durch das Öffnen von Natriumkanälen stark erhöht.
- Das Membranpotential wird positiver, und es kommt zu einer sogenannten Depolarisation.
- Überschreitet die Depolarisation einen gewissen Schwellenwert, entsteht das Aktionspotential. Dieses ist definiert als eine Veränderung der Ladungsverteilung von Ionen innerhalb und außerhalb der Membran, also einer Umladung der Membran während der Erregung.
- Schon während der Depolarisation wird der Natriumkanal wieder geschlossen, und es kommt anschließend zur Repolarisation.
- Abhängig von der Art der Nervenfaser wird der Reiz dann unterschiedlich schnell weitergeleitet.

1.1.2 Glia-Zellen

Das Wort *Glia* leitet sich von dem griechischen Wort für Leim ab, womit auch die Aufgabe der Gliazellen gut beschrieben ist. Die Gliazellen bilden das Hüll- und Stützgewebe des Nervensystems und sind damit gewissermaßen der „Leim“ zwischen den Neuronen. Im Gegensatz zu den Neuronen sind Gliazellen auch nach der Pränatalperiode noch vermehrungsfähig. Daher stammen auch fast alle Tumore des ZNS von Gliazellen ab.

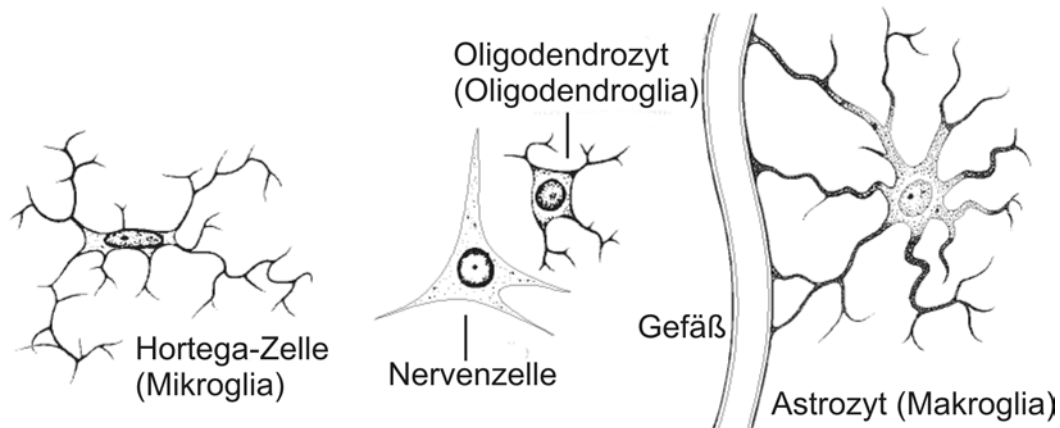


Abbildung 2: Neurogliazellen des Zentralen Nervensystems^a

Die Gliazellen des ZNS werden wie folgt unterteilt^{8,9} (siehe Abbildung 2):

1. Die Astrozyten gehören zu den Makroglia und sind große sternförmige Zellen mit vielen Zellfortsätzen, die sehr vielseitig sind. So sind sie z.B. zur Phagozytose fähig und stehen mit Nervenzellen und Blutgefäßen für einen Stoffaustausch in Verbindung. Während der Ontogenese dienen sie wandernden Neuronen als Leitstrukturen. Des weiteren sind sie am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt und setzen Wachstumsfaktoren für Neuronen frei.
2. Die Oligodendrozyten gehören ebenfalls zu den Makroglia und sind große Zellen mit vielen Fortsätzen, die im ZNS die Axone umwickeln und die Myelinscheide bilden. Eine entsprechende Aufgabe haben die Schwann-Zellen im PNS.
3. Die Hortega-Zellen gehören zu den Mikroglia und sind kleine mobile Zellen, die zur Phagozytose fähig sind. Ihre Aufgabe ist denen der Makrophagen analog.
4. Im weiteren Sinne gehört auch das Ependym, das eine epithelähnliche, einschichtige Zellauskleidung der inneren Liquorräume bewirkt, zu den Gliazellen.

^a Grafik verändert nach Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, Auflage 259, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 2002

1.2 DAS NERVENSYSTEM

Das Nervensystem ist die Gesamtheit des Nervengewebes im Körper. Es ist verantwortlich für Aufnahme, Weiterleitung, Verarbeitung und Beantwortung von Reizen. Dabei werden die Reize in den Rezeptoren aufgenommen und zum zentralen Nervensystem (ZNS) weitergeleitet, wo die Reize verarbeitet und anschließend beantwortet werden. Diese Antwort wird dann zu den Effektoren, z.B. den Muskeln, geleitet.

Das Nervensystem kann prinzipiell auf zwei Arten eingeteilt werden: topographisch in das zentrale Nervensystem (Gehirn und Rückenmark) und das periphere Nervensystem (Hirnnerven, Rückenmarksnerven und periphere Ganglien) oder funktionell in das animale Nervensystem, das die bewussten Funktionen regelt und das vegetative (autonome) Nervensystem, welches für die unbewussten Funktionen wie z.B. Regulierung der Herzfrequenz zuständig ist⁷.

1.3 DAS RÜCKENMARK

Das Rückenmark, lateinisch: *Medulla spinalis*, liegt im Wirbelkanal der Wirbelsäule und gehört zum zentralen Nervensystem. Es ist ein selbständiger nervöser Zentralapparat und dient einerseits der Ausbildung von Reflexen und verbindet gleichzeitig das Gehirn mit dem PNS. Das Rückenmark ist sehr kompliziert aufgebaut und daher wird nachfolgend nur eine stark vereinfachte Darstellung gezeigt¹⁰.

In einem Querschnitt des Rückenmarks sieht man die sogenannte graue Substanz, die die Nervenzellkörper mit ihren Verzweigungen enthält, und die weiße Substanz, die aus markhaltigen Nervenfasern besteht. Die graue Substanz ist schmetterlingsförmig und gliedert sich in die Hintersäule (*columna dorsalis* oder *cornu dorsale*), Vordersäule (*columna ventralis* oder *cornu ventrale*) und die Seitensäule (*columna lateralis*), die nur im Bereich der Wirbel C₈ bis L_{1/2}, also im Bereich der Brustwirbelsäule auftritt. Zusätzlich dazu kommt ein zentrales Verbindungsstück: die Kommissur mit dem Zentralkanal.

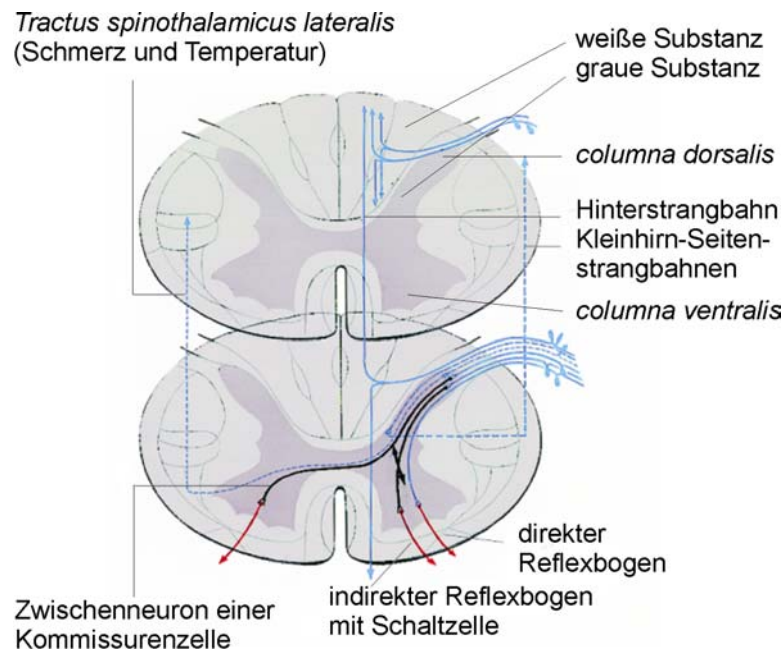


Abbildung 3: Querschnitt des Rückenmarks. Zu sehen ist die Unterteilung in graue Substanz und weiße Substanz. Der Reflexbogen ist im unteren Bereich dargestellt. Dabei werden Reflexe über das Rückenmark gesteuert. Die sensorischen Nerven sind in blau und die motorischen Nerven in rot dargestellt.^a

Die Farbe der weißen Substanz entsteht durch die Myelinscheiden der Nervenfasern, die aus einem lipidhaltigem Material bestehen. Sie wird unterteilt in Hinterstrang (*Funiculus dorsalis*), Seitenstrang (*Funiculus lateralis*) und Vorderstrang (*Funiculus ventralis*). Innerhalb dieser Funiculi sind die Fasern zu Bündeln (*Tractus*) zusammengefasst (siehe Abbildung 3).

Im Querschnitt sieht man, wie die sensorischen Nerven (blau) in die *columna dorsalis* münden während die motorischen Nerven (rot) von der *columna ventralis* abgehen. Dieses System wird auch als Reflexbogen bezeichnet, da Reflexe nicht über das Gehirn laufen, sondern die Erregung direkt von der sensorischen Bahn über sogenannte Interneurone an die motorische Bahn weitergegeben wird. Dabei befinden sich die sensorischen Bahnen dorsal und lateral, wobei sich der laterale Bereich außen befindet, während sich die motorischen Bahnen ventral und ebenfalls lateral, aber innen und somit näher an der grauen Substanz befinden.

^a Grafik verändert nach Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, Auflage 259, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 2002 und Loeb¹¹¹

Die verschiedenen Segmente des Rückenmarks werden in der Regel nach den entsprechenden Wirbeln unterteilt, in denen sie sich befinden. Insgesamt gehen vom Rückenmark 31 Nervenpaare ab, die aus den Zwischenwirbellöchern austreten. Die Wirbel werden unterteilt in sieben Halswirbel, zwölf Brustwirbel, fünf Lendenwirbel und vier Steißwirbel. Aus jedem dieser Segmente entspringt ein Paar von Rückenmarksnerven, die einen bestimmten Hautbereich, die sogenannten Dermatome versorgen. Da die Dermatome sich jedoch häufig gegenseitig überlappen, ist eine Kartografierung nicht ganz einfach. Grundsätzlich lassen sich jedoch bestimmte Gebiete zuordnen, wobei dies für den Rumpf am einfachsten ist. Auf der Rückseite des Körpers bilden die Dermatome eine lückenlose Folge. Komplizierter ist es bei den Gliedmaßen, wo sich die Dermatome stark überlappen und nicht direkt mit den Segmenten verbunden sind, sondern einen Umweg über einen sogenannten Plexus gehen.

Da das Rückenmark „seriell“ aufgebaut ist, und von unten nach oben die Funktionen zunehmen, hat eine Schädigung des Rückenmarks, abhängig von der Lage der Verletzung unterschiedliche Auswirkungen. So kommt es bei einer Verletzung oberhalb vom Brustwirbel Th1 zu einer sogenannten Tetraplegie, also einer Lähmung aller vier Gliedmaßen, Arme wie Beine. Eine Paraplegie tritt hingegen bei einer Verletzung unterhalb des zweiten Brustwirbels Th2 auf. Je nach der Lage kann es bei einer Paraplegie zu einer Lähmung des Rumpfes und der Beine kommen.

1.4 SPINAL CORD INJURY (SCI)

Bei Rückenmarksverletzungen wird prinzipiell zwischen gedeckten und offenen Rückenmarksverletzungen unterschieden. Offene Rückenmarksverletzungen kommen dabei hauptsächlich bei Schuss- und Stichverletzungen vor und stellen mit weniger als 10 % die Minderheit der Rückenmarksverletzungen dar. Zu den gedeckten Rückenmarksverletzungen kommt es durch Gewalteinwirkungen mit stumpfen Gegenständen oder durch Druckschädigungen. Die Folgen einer solchen Verletzung können dann Störungen bei der Blasenentleerung und andere autonome Ausfälle sein. Je nach Schädigungsniveau können dann verschiedene Querschnittssyndrome auftreten¹¹.

Interessanterweise reagiert das ZNS-Gewebe von Erwachsenen und Föten bzw. Neugeborenen unterschiedlich auf Verletzungen. Während sich das fötale Gewebe regenerieren kann, ist das bei einem Erwachsenen nicht mehr möglich. Bei Ratten wurde nachgewiesen, dass sich diese Veränderung in einer sehr kurzen Zeit vollzieht. Die liegt in der Regel zwischen dem ersten und dem fünften postnatalen Tag¹².

Wenn die weiße Substanz des Rückenmarks im erwachsenen Wirbeltier verletzt wird, wird das Myelin, das die Nervenfasern umgibt ebenfalls beschädigt und an der Verletzungsstelle liegt das Myelin dann in Bruchstücken vor. Dieses wirkt inhibierend für eine Regeneration der beschädigten Axone und dadurch entsteht eine aktiv inhibierende Umgebung für ein erneutes Neuritenwachstum^{13,14}.

Nach der Verletzung kommt es zu einer Änderung in der biochemischen Umgebung, so dass die Regeneration weiterhin inhibiert wird. Dies geschieht dadurch, dass die Anzahl der Chondroitinsulfat Proteoglycane¹⁵⁻¹⁷ hochreguliert wird.

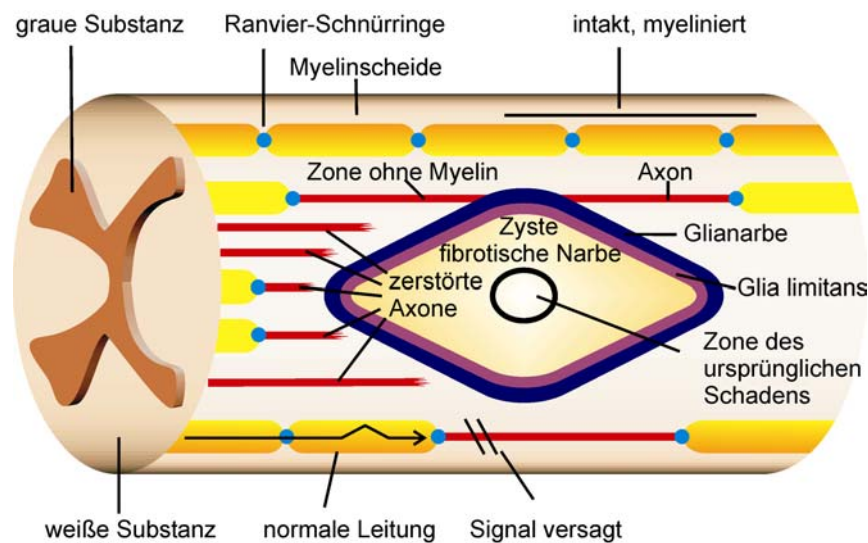


Abbildung 4: Spinal Cord Injury. Die Verletzung führt zu einer Narbenbildung die über den Bereich des ursprünglichen Schadens hinaus geht. Es bildet sich entweder eine flüssigkeitsgefüllte Zyste oder eine fibrotische Narbe, die von der sogenannten Glianarbe umgeben ist. Diese besteht aus aktiven Astrozyten, die inhibierende Substanzen ausschütten und somit ein neues Wachstum der Axone verhindern.

An der Verletzung können zwei Prozesse stattfinden. Entweder bildet sich eine Narbe aus Meningealzellen, die von einer weiteren Narbenschicht der sogenannten Glianarbe^{1,6,18-20} umgeben ist. Oder es bildet sich eine flüssigkeitsgefüllte Zyste^{7,21,22}, die ebenfalls von der Glianarbe umgeben ist. Der Aufbau der Glianarbe beginnt innerhalb von Stunden nach der Verletzung in dem umgebenden Gewebe. Diese Narbe besteht aus einem dichten Netz hochaktiver Astrozyten, die inhibierende Substanzen, die Chondroitinsulfat Proteoglycane exprimieren²³⁻²⁵. Außerdem stellt die Narbe eine physikalische Barriere dar, die wachsende Axone nicht durchdringen können (siehe Abbildung 4). Mittlerweile ist bekannt, dass die Glianarbe nicht vollständig immun gegen einen Angriff von wachsenden Neuriten ist, und dass diese sich auch einen Weg durch das Narbengewebe bahnen können²⁶⁻³¹, aber eine Therapie für SCI sollte möglichst schon vor der Narbenbildung beginnen.

1.5 INHIBITION DER REGENERATION DURCH MYELIN

Myelin ist ein komplexes Gemisch aus Lipiden mit einem 18 %igen Proteinanteil, das als Isolator für Nervenfasern dient³². Seine inhibierende Wirkung auf die Regeneration im ZNS ist schon lange bekannt. Mittlerweile ist klar, dass in dem Myelin verschiedene inhibierende Proteine vorliegen, von denen derzeit drei identifiziert worden sind: Nogo-A³³⁻³⁶, das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG)^{37,38} und das Oligodendrozyten Myelin Glycoprotein (OMgp)^{39,40}. Zu Beginn der Arbeit war jedoch nur vom MAG eine inhibierende Wirkung bekannt. Alle drei Proteine binden dabei an den sogenannten Nogo Rezeptor (NgR), der mit den Corezeptoren p75^{NTR} und LINGO-1 den Effekt ins Cytosol des Neurons vermittelt. Dort wird eine Kaskade ausgelöst, die einen *growth cone collapse* zur Folge hat, bei dem die Spitze des nachwachsenden Axons kollabiert (siehe Abbildung 5).

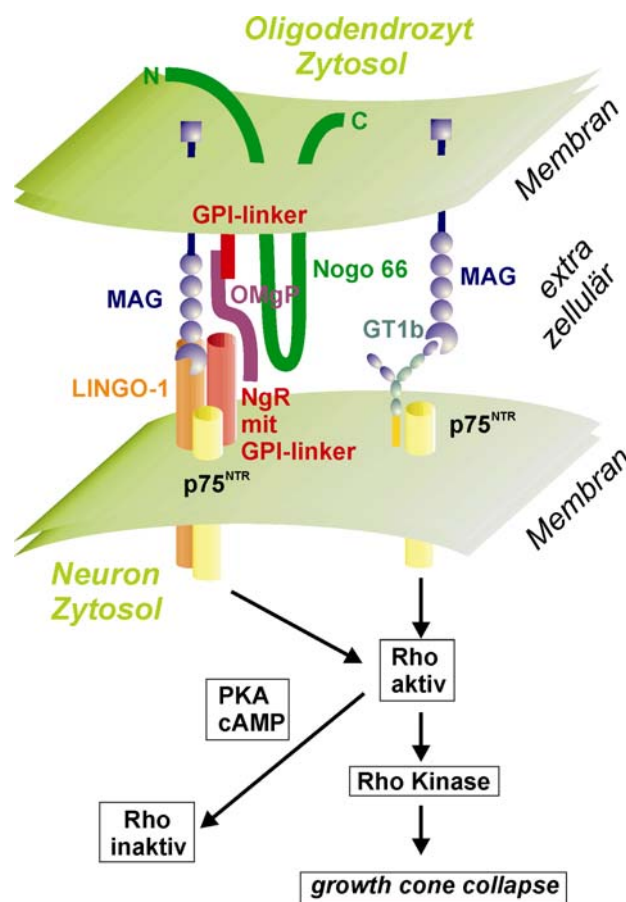


Abbildung 5: Der hypothetische Pfad der Inhibition. Durch die Bindung von Nogo-A, MAG und OMgp an den Nogo-Rezeptor NgR wird eine Kaskade ausgelöst, die im *growth cone collapse* endet.

Die Bildung von Axonen aus dem Zellkörper beginnt mit dem Wachstum sogenannter *growth cones* an den Spitzen des auswachsenden Körpers⁴¹. Der *growth cone* interagiert mit der Umwelt, um die Richtung und Geschwindigkeit der Axonverlängerung festzustellen. Die Bewegung des *growth cones* geschieht durch ein Cytoskelettgitter, das die Motor-Proteine Aktin und Myosin enthält. Während der Neurit wächst, wird das Microtubuli-Rückgrat durch Tubulinmoleküle konstruiert. Der *growth cone* hat viele Fortsätze, die sogenannten Filopodia, die sich in alle Richtungen (3D) ausstrecken und wieder zurückziehen, um die Umwelt zu analysieren. Rezeptorproteine sind in die Membran eingebettet, um die richtige Richtung zu steuern, in die sich der *growth cone* bewegt. Wenn der *growth cone* mit ZNS Myelin oder Oligodendrozyten in Kontakt kommt, wird seine Cytoskelett Struktur so verändert, dass er kollabiert⁴². Abbildung 6 zeigt einen *growth cone* an der Spitze eines Neuriten. Bei dieser Mikroskopaufnahme sind die Filopodia, die den Bereich um den *growth cone* „abtasten“, gut zu erkennen.

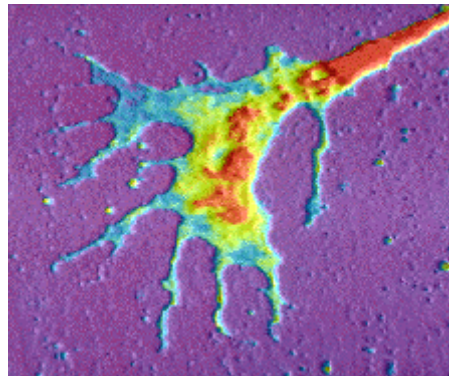


Abbildung 6: Ein *growth cone* mit Filopodia^a.

Im folgenden werden die einzelnen interagierenden Komponenten beschrieben (siehe Abbildung 5), die diesen Kollaps auslösen.

^a <http://electron.mit.edu/~gsteele/mirrors/elchem.kaist.ac.kr/jhkwak/TopometrixWeb/hipprat1.htm>

Nogo-A

Nogo-A³³⁻³⁶ wurde 1988 von der Gruppe von Schwab und Caroni aus dem Myelin isoliert. Die Anwendung eines monoklonalen Antikörpers genannt IN-1 zeigte ein Axonwachstum in vitro und in vivo. 5–10 % der Axone zeigten dabei wieder Wachstum, und in einigen Fällen kam es auch zu einer teilweisen Wiederherstellung der Funktion.

Nogo-A ist ein Mitglied der sogenannten Reticulon Familie der Proteine. Es hat zwei inhibierende Domänen: das sogenannte Nogo 66³⁶, eine 66 Aminosäuren lange Sequenz, die extrazellulär gelagert ist, und die lange aminoterminal Region^{35,43}, von der noch unklar ist, ob sie cytoplasmisch platziert ist. Wäre dies der Fall, dann würde diese Region erst inhibierend wirken, wenn das Myelin zerstört wird. Der Rezeptor für diese Domäne ist jedoch noch unbekannt.

Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG)

Das Myelin-assoziierte Glycoprotein ist eines von den bislang bekannten drei Proteinen des Myelins, das inhibierend wirkt. Da es Gegenstand der Arbeit ist, wird es genauer im Kapitel 1.8 beschrieben.

Oligodendrozyten Myelin Glycoprotein (OMgp)

Das Oligodendrozyten Myelin Glycoprotein (OMgp)^{39,40} wurde gefunden, als Proteine untersucht wurden, die vom Myelin durch Phospholipase Behandlung freigesetzt wurden. OMgp ist ein GPI verankertes Protein und besitzt ebenfalls inhibierende Eigenschaften und induziert *growth cone collapse*.

Der Nogo-Rezeptor (NgR)

Der Nogo Rezeptor (NgR)⁴⁴ ist ein *leucine-rich repeat* Protein, das an die extrazelluläre Oberfläche von neuronalen Membranen durch einen Glycophosphatidylinositol-Anker (GPI) gebunden ist. Nogo, MAG und OMgp binden an ihn mit hoher Affinität. Die Bindungsstelle für Nogo 66 und OMgp scheint sich dabei zu überlappen, während die Bindungsstelle von

MAG und Nogo 66 kontrovers diskutiert wird. So berichtet die Gruppe von Filbin⁴⁵, dass die Bindungsstelle für MAG und Nogo 66 identisch ist, während die Gruppe von Strittmatter⁴⁶ aussagt, dass die Bindungsstellen verschieden sind.

Wie oben beschrieben ist der Nogo-Rezeptor nur durch einen GPI-Anker mit der neuronalen Membran verbunden. Er hat keine Transmembran- und keine intrazelluläre Domäne, so dass er die inhibierende Wirkung nicht alleine ins Zellinnere vermitteln kann. Als Corezeptoren agieren daher p75^{NTR} und der Rezeptor LINGO-1.

Der Neurotrophin-Rezeptor p75 (p75^{NTR})

Der Neurotrophin Rezeptor p75 ist ein Transmembran-Glycoprotein, das alle bisher bekannten Neurotrophine bindet. Wie oben beschrieben agiert der p75^{NTR} als Corezeptor^{47,48} für den Nogo-Rezeptor. Die inhibierende Wirkung wird damit ins Cytosol des Neurons geleitet und man vermutet, dass das nächste Ziel dieser Kaskade die GTPase Rho ist.

LINGO-1

Lingo-1 ist eine Abkürzung für *Leucine Rich Repeat and Ig domain-containing, Nogo Receptor interacting protein*⁴⁹. Lingo hat 12 LRR-Motive, eine Ig-Domäne, eine Transmembran-Domäne und einen kurzen cytoplasmischen Schwanz. Es wirkt als zweiter Corezeptor für den Nogo Rezeptor.

Rho und die Rho-Kinase

Rho ist eine kleine membrangebundene monomere Guanosin Triphosphatase (GTPase)⁵⁰, von der schon seit längerem bekannt ist, dass sie wichtig für den *growth cone collapse* und den neuralen Rückzug ist⁵¹⁻⁵³. Wenn Rho aktiviert wird, aktiviert sie nun ihrerseits die Rho-Kinase, die wiederum mit dem Aktin-Cytoskelett des *growth cones* interagiert und damit den Kollaps bewirkt⁵⁴⁻⁵⁶. Umgekehrt ist auch ein Wachstum der Neuriten wieder möglich wenn Rho inaktiviert wird⁵⁷.

3',5'-cyclic Adenosinemonophosphate (cAMP)

cAMP ist ein Schlüssel für die *growth cone* Signalkaskade und ist verantwortlich für eine positive, attraktive Antwort⁵⁸. cAMP blockiert eine MAG-induzierte Inhibition durch die Aktivierung der Protein Kinase A (PKA), die wiederum Rho durch eine Phosphorylierung inaktiviert⁵⁹.

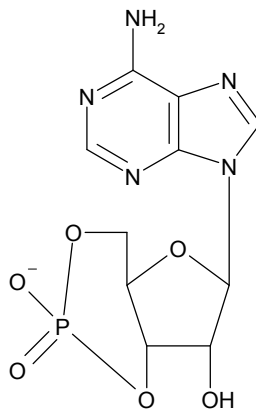


Abbildung 7: Struktur von cAMP

1.6 BIDIREKTIONALE WIRKUNG DER MYELIN-INHIBITOREN

Interessanterweise zeigen die Proteine Nogo-A und MAG eine bidirektionale Wirkung auf das Neuritenwachstums. Bei embryonalen Nervenzellen bewirken sie eine Promotion des Neuritenwachstums und bei adulten Nervenzellen eine Inhibition. Bei MAG ist bekannt, dass das Umschalten von Promotion zur Inhibition am vierten postnatalen Tag bei Ratten stattfindet^{38,60}. Die Steuerung der Promotion oder Inhibition wird dabei vermutlich über zwei verschiedene Wege in der gleichen Kaskade erreicht. Demnach wird bei einer Bindung von MAG oder Nogo-66 an den NgR/p75^{NTR} – Komplex das G_i, ein G-Protein, aktiviert, das wiederum die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Von dort aus teilt sich die Signalkaskade und entweder wird der Protein Kinase C (PKC) Weg aktiviert, und es kommt zu einer Inhibition des Neuritenwachstums und *growth cone collapse*, oder der Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃) Weg wird aktiviert, und es kommt zu einer Promotion des Neuritenwachstums⁶¹ (siehe Abbildung 8).

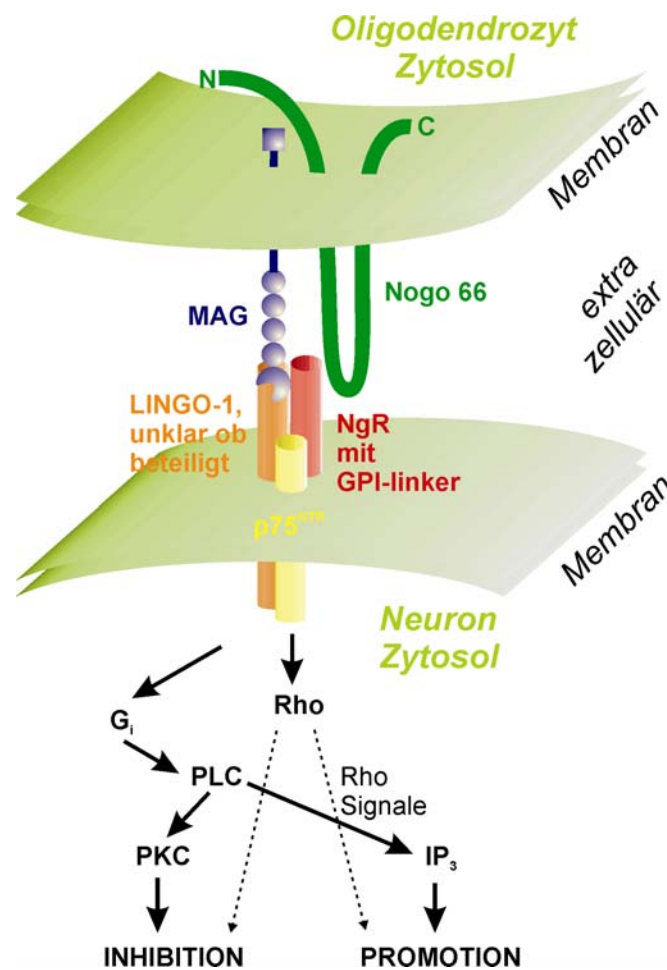


Abbildung 8: Modell der bidirektionalen Wirkung von MAG und Nogo. Parallel zu Rho wird G_i aktiviert und dadurch PLC. Dort trennt sich die Kaskade auf, und die Wirkung verläuft entweder über Protein Kinase C (PKC) und Inhibition (adult) oder Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃) und Promotion (embryonal).

1.7 THERAPIEANSÄTZE

In der Literatur wird über viele Ansätze für die Überwindung von SCI debattiert. Einige behandeln eine elektrische Stimulierung der Muskulatur unter Umgehung der üblichen neuronalen Wege, während andere sich mit der Regeneration im beschädigten Rückenmark beschäftigen. Im folgenden werden einige Therapieansätze zur Regeneration gezeigt.

Nach dem Auftreten von SCI gibt es mehrere Prozesse, die eine Regeneration verhindern. Zuerst die Myelin-Inhibition, dann die Chondroitinsulfat-Proteoglycan-Inhibition und zuletzt die Vernarbung des Gewebes.

Theoretisch gibt es daher zwei Möglichkeiten für eine Regeneration

1. Wenn die Neuronen so verändert werden könnten, dass sie sich wie im fötalen Gewebe verhalten, dann würde sie die regenerationsfeindliche Umgebung im adulten ZNS nicht mehr stören.
2. Wenn die Umwelt so modifiziert werden könnte, dass sie nicht mehr inhibierend wirkt, dann könnten die Axone wieder wachsen.

1.7.1 Neurotrophine

Neurotrophine sind Regulatorproteine des Nervensystems. Sie regulieren das neuronale Überleben, Axonwachstum und Neurotransmissionen. Daher ist es naheliegend, sie als Therapeutikum bei SCI anzuwenden^{62,63}.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Neurotrophine anzuwenden. Sie können direkt in die Verletzungsstelle injiziert werden⁶⁴, oder es kann eine permanente Infusion⁶⁵ stattfinden. Beide Verfahren sind jedoch nicht dazu geeignet, um an der Verletzung eine lokale permanent hohe Konzentration von Neurotrophinen zu erreichen⁶². Dies ist jedoch wichtig, weil viele Neurotrophine einen chemotropen Effekt haben. Sie dirigieren die Axonpopulationen zu der Region mit der höchsten Neurotrophin-Konzentration⁶².

1.7.2 Transplantate (Grafts)

1911 berichtete Tello⁵, Gewebe aus dem PNS in das verletzte ZNS transplantiert zu haben. Dabei wurde ein Axonwachstum beobachtet. Später wurde entdeckt, dass Schwann-Zellen der Hauptgrund für die permissive Natur des PNS sind. Wie schon in Kapitel 1.1.2 berichtet ist die Hauptaufgabe von Schwann-Zellen die Myelinierung von Nervenfasern des PNS. Im ZNS sind die Oligodendrozyten für diese Aufgabe verantwortlich. Man nimmt an, dass die Abwesenheit von Schwann-Zellen einer der Gründe für das mangelnde Wachstum der verletzten Axone ist, da diese Zellen eine Reihe von Neurotrophinen exprimieren und Führungskanäle ausbilden, an denen die verletzten PNS-Axone wachsen können⁶². Alternativ

wird auch fötales ZNS-Gewebe verwendet, weil dieses Gewebe ebenfalls für Axonwachstum permissiv ist.

Eine Kombination von Neurotrophen und Transplantaten kann durch die Verwendung der *ex vivo* Gentherapie erreicht werden. Dabei werden die Zellen dem Wirtskörper entnommen und genetisch modifiziert, so dass das gewünschte Neurotrophin exprimiert wird. Anschließend werden die Zellen in die Verletzungsstelle implantiert⁶².

1.7.3 Probleme bei der Regeneration

Während der Entwicklung des Nervensystems wird ein wachsendes Axon durch Signalmoleküle gesteuert. Diese beeinflussen die Richtung durch eine chemische Anziehung oder Abstoßung. Durch einen Gradienten dieser Signalstoffe findet das Axon den richtigen Weg. Diese komplexe Umgebung ist jedoch nötig, damit regenerierende Axone das korrekte Ziel finden. Dafür ist es notwendig, die Produktion dieser Signalstoffe zur richtigen Zeit hochzuregulieren.

Daher versteht es sich, dass nur die Anregung zum Axonwachstum nicht genug ist. Denn die Axone müssen den Weg zu ihrem ursprünglichen Ziel finden und das vorzugsweise entlang des korrekten Pfades. Dann muss es ein Stop-Signal geben, wenn das Zielneuron gefunden wurde. Die Leitung der Nervensignale über korrekte Synapsen muss gewährleistet werden und schlussendlich, damit die Funktion wiederhergestellt werden kann, muss die topographische Organisationsstruktur wieder hergestellt werden, und die Axone müssen myelinisiert werden. Häufig treten funktionelle Defizite erst nach einem Verlust von 90 % der Axone auf. Umgekehrt ist daher auch ein Gewinn an Funktion möglich, wenn wenige Axone regeneriert werden. Hinzu kommt, dass sich das Gehirn anpassen kann, so dass eine Kompensation über Lernprozesse möglich ist.

1.8 MYELIN-ASSOZIIERTES GLYCOPROTEIN (MAG)

Das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG)^{37,38} ist ein Transmembranprotein der Oligodendrozytenmembran und des Myelins. Hierbei macht MAG aber einen relativ kleinen Anteil (unter 1 %) an den Myelinproteinen aus⁶⁶. Es gehört zu den drei bislang bekannten Proteinen des Myelins, die ein Axonwachstum im adulten ZNS inhibieren (siehe Kapitel 1.5). Eine weitere Funktion des MAGs ist die Erhaltung der Myelinscheiden⁶⁷. So wurde bei Knockout Mäusen mit defektem MAG beobachtet, dass sich das Gewebe des Nervensystems weniger stabil verhält. MAG gehört zu den am höchsten konservierten Proteinen und hat sich evolutionsgeschichtlich kaum verändert⁶⁸. Das lässt auf einen gewissen Selektionsdruck für diese Funktion schließen.

1.8.1 Struktur und Aufbau des Myelin-assoziierten Glycoproteins

Das Myelin-assoziierte Glycoprotein ist ein Transmembranprotein mit fünf extrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne und zwei intrazellulären Domänen⁶⁹. Als Polypeptid kommt es in zwei Formen mit 67 und 72 kDa Gewicht vor, dem S-MAG und dem L-MAG^{66,70}, wobei sich die beiden Formen am C-Terminus unterscheiden. Die Glycostrukturen machen ca. 30 % des Gewichtes von MAG aus und seine Gesamtmasse liegt bei ca. 100 kDa⁶⁶. Es ist vom MAG keine Struktur veröffentlicht worden, daher ist genaueres über die 3D Struktur des Proteins nicht bekannt.

1.8.2 Siglecs

MAG gehört zu der Gruppe der sogenannten Siglecs (*Sialic acid binding Immunglobulin-like lectins*)⁷¹. Die Siglecs sind, wie ihr Name sagt, Sialinsäure bindende Lektine. Derzeit sind 11 Siglecs bekannt. Die einzelnen Siglecs sprechen dabei auf unterschiedliche Sialinsäuremotive an. So bevorzugt MAG das α -Sia-2,3- β -Gal Motiv und bindet daher gut an Ganglioside mit diesem Motiv⁷². Die Sialinsäure-Bindungsstelle liegt dabei in der ersten Domäne im sogenannten *v-set*⁷¹.

1.8.3 Sialinsäure-Bindungsstelle des MAG

Die Bindungsstelle für die sialylierten Liganden des MAGs befindet sich in der ersten extrazellulären Domäne, dem *v-set*. Da die Konformation des Proteins nicht bekannt ist, gibt es nicht viele Informationen über die Bindungstasche. Es wurde jedoch eine Kristallstruktur von einem verwandten Protein, dem Sialoadhesin, auch ein Siglec, zusammen mit Sialyllactose veröffentlicht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Aminosäure Arginin 97 zentral für die Bindung des Liganden ist⁷³⁻⁷⁵. Die Carboxygruppe der Sialinsäure bildet eine Salzbrücke mit der Guanidingruppe des Arginins. Im MAG entspricht dies dem Arginin 118 und Mutationsstudien belegen, dass diese Aminosäure kritisch für die Bindung der sialylierten Liganden ist⁷⁶.

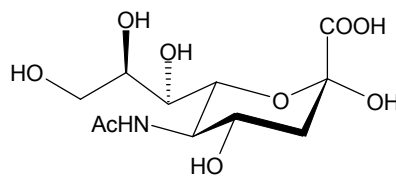


Abbildung 9: Sialinsäure

1.8.4 Inhibierende Wirkung des MAG

MAG übt wie Nogo und OMgp eine inhibierende Wirkung auf die Axonregeneration aus. Wie im Kapitel 1.5 behandelt, inhibiert MAG durch die Bindung an den Nogo Rezeptor. Über die Corezeptoren des NgR wird dann eine Kaskade ausgelöst, die den growth cone collapse zur Folge hat. Interessanterweise ist für MAG auch ein zweiter Weg nachgewiesen worden. Dabei bindet MAG an das Gangliosid GT1b einem komplexen Gangliosid^{77,78}, das auf der Neuronenoberfläche vorhanden ist und mit dem Ceramidrest in die Membran eingebettet ist. Zusammen mit dem Corezeptor p75^{NTR} löst es die gleiche Kaskade aus⁷⁹. Es ist derzeit unbekannt, ob diese beiden Kaskaden unabhängig voneinander agieren, oder ob sie einander bedingen (siehe Abbildung 5).

MAG bindet die Ganglioside über das *v-set*, aber die Bindungsstelle für den Nogo-Rezeptor ist bislang noch nicht gefunden worden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie sich in der vierten oder fünften extrazellulären Domäne befindet⁷⁶. Um die Wirkung des

MAGs zu unterdrücken und eine Regeneration der zerstörten Axone zu ermöglichen blockierten DeBellard *et. al.* MAG mit Sialinsäure und Sialyllactose⁸⁰. Hierfür verwendeten sie einen Neuritenwachstumsassay, bei dem die Längen der Neuriten in Gegenwart von MAG mit unterschiedlichen Saccharidkonzentrationen gemessen wurden. Dabei war eine Abhängigkeit der Neuritenlängen von der Konzentration der Saccharide zu erkennen. So zeigten z.B. Neuriten ein Wachstum um 64 % bei einer Zugabe von 20 mM Sialinsäure.

1.8.5 Die MAG-Chimäre: FcMAGd1-3

Da MAG ein Transmembranprotein ist, und sich diese nicht gut in wässrigen Lösungen handhaben lassen, wurde in dieser Arbeit eine Chimäre verwendet. In der Literatur wird dieses Konstrukt, das FcMAGd1-3 besonders häufig verwendet⁷¹. Diese Chimäre ist ein Dimer aus den ersten drei N-terminalen MAG-Domänen fusioniert mit dem Fc-Anteil eines Immunglobulins^a. In der Hinge-Region ist das Protein über zwei Disulfidbrücken dimerisiert. Dieses Protein ist gut wasserlöslich und konnte daher ohne Probleme für NMR Studien verwendet werden. Da es sich bei diesem Protein um ein Dimer handelt, hat es zwei Rezeptorbindungsstellen. FcMAGd1-3 wurde in *Chinese Hamster Ovary* Zellen (CHO) exprimiert und ist an vier Stellen N-Typ glycosyliert, wobei die Glycosylierung ausschließlich vom *High Mannose* Typ ist, da diese Zellen eine andere Prozessierung nicht leisten.

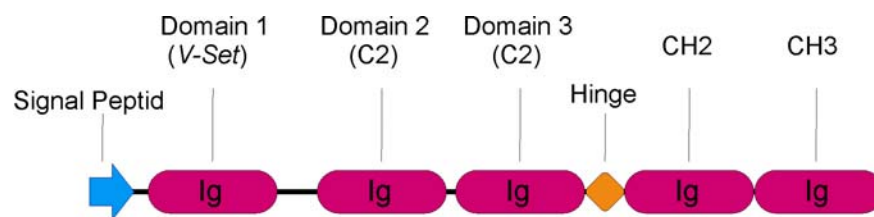


Abbildung 10: Verwendetes MAG Konstrukt: FcMAGd1-3 bestehend aus 561 Aminosäuren. N-terminal ist das V-Set, die erste extrazelluläre Domäne. Gefolgt von zwei weiteren Domänen, die an den Fc-Teil eines Antikörpers gekoppelt sind.

^a Dieses Protein wurde von Heiko Gäthje aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Soerge Kelm exprimiert.

2 SATURATION TRANSFER DIFFERENCE NMR

Die *Saturation Transfer Difference* NMR (STD NMR) ist eine Methode, die für die Untersuchung der Bindung von Liganden an größere Proteine gut eingesetzt werden kann, wenn Protein und Ligand im schnellen Austausch stehen⁸¹⁻⁸³. Dabei kann sie so verschiedenes wie Screening nach Liganden, die Bestimmung von K_D -Werten und Bindungs epitopen leisten. Das Prinzip der STD NMR beruht dabei auf der Übertragung der Sättigung vom Protein auf den gebundenen Liganden. Nicht-bindende Moleküle werden hierbei nicht angeregt und sind damit im Spektrum nicht sichtbar.

Benutzt wird hierbei ein Effekt, der bei größeren Molekülen mit einer molaren Masse von $M > 10$ kDa auftritt: die Spindiffusion. Wird bei einem kleinen Molekül eine Resonanz spezifisch gesättigt, so wird nur dieser bestimmte Übergang nicht beobachtet. Bei größeren Molekülen, wo Spindiffusion eintritt, kommt es jedoch zu einer Verteilung der Sättigung auf das ganze Molekül und zu einer Übertragung auf einen gebundenen Liganden. Dabei korreliert die Sättigungsübertragungseffizienz mit dem Abstand des Liganden zum Protein.

NMR-technisch kann man sich diesen Effekt zunutze machen, indem ein sogenanntes Differenzspektrum aufgenommen wird. Dafür werden zwei Spektren aufgenommen, das *off-resonance* Spektrum, das als Referenz dient, und das eigentlich interessante *on-resonance* Spektrum. Beim *off-resonance* Spektrum wird der Sättigungspuls (*shaped pulse*) außerhalb des spektralen Fensters der Protein- oder Ligandresonanzen, z.B. bei 40 ppm eingestrahlt. Die Aufnahme des *off-resonance* Spektrum ist hierbei nötig, weil es bei der Anwendung des Sättigungspulses zu thermischen Effekten in der Probe kommt. Diese müssen im Referenzspektrum berücksichtigt werden. Beim *on-resonance* Spektrum wird der Sättigungspuls dort eingestrahlt, wo sich Proteinresonanzen, aber keine Ligandresonanzen befinden (siehe Abbildung 11). Dies ist möglich, da diese großen Moleküle breite Signale erzeugen, die sich außerhalb des normalen spektralen Fensters zwischen 0 und 10 ppm befinden. Weiterhin kann es zu Anisotropieeffekten in Teilen des Proteins kommen, die somit Signale mit extremen Verschiebungen erzeugen können. Durch die Sättigungsübertragung auf den gebundenen Liganden werden die Ligandsignale im *on-resonance* Spektrum in ihrer Intensität erniedrigt. Werden abschließend die beiden Spektren von einander subtrahiert, sind im Differenzspektrum nur die Signale des bindenden Liganden sichtbar. Innerhalb des Ligandspektrums kann auch weiter zwischen Atomen, die sich nahe am Protein aufhalten und

damit eine höhere Intensität zeigen und Atomen, die weiter entfernt sind differenziert werden. Damit ist eine Aussage über das Bindungsepitop möglich.

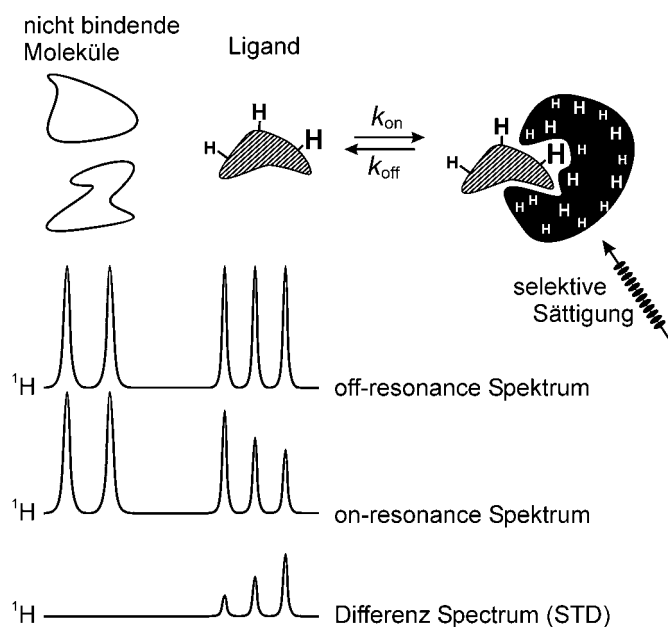


Abbildung 11: STD NMR Spektroskopie. Es liegt eine Mischung verschiedener Substanzen zusammen mit einem Protein vor. Durch die Einstrahlung eines *on-resonance shaped pulse* auf die Proteinresonanzen wird das Protein gesättigt und überträgt durch intermolekulare Spindiffusion die Sättigung auf den bindenden Liganden. Im nächsten Schritt tritt der Ligand aus der Bindungstasche und wird in der freien Lösung detektiert. Durch die Sättigung des Liganden treten seine Resonanzen im *on-resonance* Spektrum mit verringerter Intensität auf. Beim *off-resonance* Spektrum wird außerhalb des spektralen Fensters des Proteins eingestrahlt, so dass die Intensitäten der Ligandsignale denen im nicht STD Spektrum entsprechen. Durch eine Differenzbildung erscheinen im STD Spektrum nur noch die Resonanzen des bindenden Liganden, wobei die Intensität der Signale die Nähe der Ligandprotonen zum Protein anzeigen.

Die Intensität des STD-Effekts für ein gegebenes Proton hängt von vielen Faktoren ab. Wichtig sind dabei die Parameter die sich aus der Kinetik und Thermodynamik der Protein-Ligand Interaktion und den Relaxationszeiten der beteiligten Protonen ergeben^{83,84}. In Eq. 1 wird die Veränderung der Konzentration an nicht gesättigtem Ligand $c_{L(unsat)}$ mit der Sättigungszeit t_{sat} in einem rekursiven Ansatz zusammengefasst⁸⁵.

$$\text{Eq. 1} \quad c_{L(unsat)}(t+1) = c_{L(unsat)}(t) - \frac{c_{L(unsat)}(t)c_{PL}}{c_{L(tot)}} Sat + [c_{L(tot)} - c_{L(unsat)}(t)] (1 - Rel)$$

als Randbedingung für die Zeit $t=0$ gilt:

$$c_{L(unsat)}(0) = c_{L(tot)}$$

Weiterhin gilt

$$c_{PL} = \frac{1}{2} \left[K_D + c_{L(\text{tot})} + c_{P(\text{tot})} - \sqrt{K_D^2 + 2K_D c_{L(\text{tot})} + 2K_D c_{P(\text{tot})} + c_{L(\text{tot})}^2 - 2c_{P(\text{tot})} c_{L(\text{tot})} + c_{P(\text{tot})}^2} \right]$$

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad \text{u.} \quad \text{Sat} = 1 - e^{-\frac{R_{\text{sat}} \ln 2}{k_{\text{off}}}} \quad \text{u.} \quad \text{Rel} = e^{-\frac{R_1 \ln 2}{k_{\text{off}}}}$$

mit: $c_{L(\text{unsat})(t+1)}$, Konzentration an ungesättigtem Liganden zur inkrementierten Sättigungszeit $t+1$; $c_{L(\text{unsat})(t)}$, entsprechend für die Zeit t ; c_{PL} , Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes; $c_{L(\text{tot})}$, Gesamtkonzentration an Ligand; $c_{P(\text{tot})}$, Gesamtkonzentration an Protein; K_D , Dissoziationskonstante; k_{off} , Dissoziationsrate; k_{on} , Assoziationsrate; R_{sat} , Sättigungsrate; R_1 , longitudinale Relaxationszeit.

Hierbei wird der Aufbau der Sättigung (Sat) in Zeitintervalle unterteilt, die der mittleren Aufenthaltsdauer des Liganden in der Bindungstasche entsprechen ($\ln 2/k_{\text{off}}$). Die Menge der sättigbaren Liganden ergibt sich aus c_{PL} und hängt damit von der Dissoziationskonstante der Reaktion und den Konzentrationen von Protein und Ligand ab. Als Randbedingung gilt, dass vor der Sättigung des Proteins bei $t=0$ alle Ligandmoleküle ungesättigt vorliegen.

Mit Beginn der Einstrahlung auf das Protein wird Sättigung vom Protein auf die Liganden übertragen, die an das Protein gebunden sind (2. Summand von Eq. 1). Die Sättigung strebt mit der Zeitkonstante $1/R_{\text{sat}}$ ihrem Maximum zu, wobei die Geschwindigkeit dieses Prozesses mit der Stärke der dipolaren Kopplung zwischen Proteinproton und Ligandproton korreliert. Nach Ablauf des Zeitintervalls verlassen die gesättigten Liganden die Bindungstasche, und diese wird aufs neue mit Ligandmolekülen besetzt. In Eq. 1 wird durch den Faktor $c_{L(\text{unsat})(t)}/c_{L(\text{tot})}$ berücksichtigt, dass zur Zeit des Sättigungsprozesses auch schon Ligandmoleküle vorliegen, die partiell oder vollständig gesättigt sind, und daher nicht mehr so effizient am Sättigungstransfer teilnehmen können wie ungesättigte Liganden. Durch die Erhöhung des Ligand-Überschusses gegenüber dem Protein kann die Wahrscheinlichkeit für ein *Rebinding*, also eine mehrfache Bindung eines bestimmten Ligandmoleküls an das Protein während einer Sättigungsphase gesenkt werden, und damit die Empfindlichkeit des STD Experiments gesteigert werden.

Gesättigte Liganden streben wieder der Gleichgewichtsmagnetisierung zu, wenn sie nicht mehr an das Protein gebunden sind (3. Summand von Eq. 1). Dieser Prozess hängt von der Relaxationsrate ab, so dass er bei einer kurzen longitudinalen Relaxationszeit T_1 schneller

abläuft. Eine rekursive Analyse von Eq. 1 führt zu Eq. 2, die die Abhängigkeit des STD-Effektes von den kinetischen Parametern der Bindungsreaktion und den NMR Relaxationsparametern beschreibt.

$$\text{Eq. 2} \quad c_{L(\text{sat})} = c_{L(\text{tot})} \left[1 - \frac{- \left[\frac{-c_{\text{PL Sat}} + c_{L(\text{tot})} \text{Rel}}{c_{L(\text{tot})}} \right]^{\frac{t_{\text{sat}} k_{\text{off}}}{\ln 2}} c_{\text{PL Sat}} + c_{L(\text{tot})} (\text{Rel} - 1)}{-c_{\text{PL Sat}} + c_{L(\text{tot})} (\text{Rel} - 1)} \right]$$

Mit $c_{L(\text{sat})}$ als Konzentration an gesättigtem Liganden und t_{sat} als Sättigungszeit.

Durch die Anpassung von Eq. 2 an die STD-Amplifikationsfaktoren (siehe Eq. 4), die für verschiedene Ligandkonzentration ermittelt werden, lässt sich die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion ermitteln. Dies ist jedoch relativ aufwändig, da sich die Parameter, wie z.B. Relaxationraten und kinetische Konstanten nicht ohne weiteres ermitteln lassen, und da die Berechnungen anhand von Eq. 2 nicht einfach sind.

Für die Auswertung von STD Spektren ist immer auch die Aufnahme eines Referenzspektrums nötig. Bildet man den Quotienten aus der Intensität des STD Spektrums $I_0 - I_{\text{sat}}$ und des Referenzspektrums I_0 so ergeben sich die STD Werte in Prozent (siehe Eq. 3).

$$\text{Eq. 3} \quad \text{STD} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0}$$

$$\text{Eq. 4} \quad \text{STD Amplifikationsfaktor} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} * \text{Ligand Überschuss}$$

$$\text{Eq. 5} \quad \text{STD Amplifikationsfaktor} = \frac{\text{STD Amplifikationsfaktor}_{\text{max}} * c}{K_D + c}$$

Durch die Aufnahme von STD NMR Spektren bei verschiedenen Konzentrationen kann auch die Dissoziationskonstante ermittelt werden. Näherungsweise kann man diese über eine Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentration mit einem anschließenden Fit entsprechend des *one site bindings* Modells berechnen (siehe Eq. 5). Der STD-Amplifikationsfaktor ist dabei das Produkt aus STD Wert und dem Ligand-Überschuss.

STD kann mit den verschiedensten Pulsprogramme kombiniert werden und bei dieser Arbeit fanden auch STD HSQC Spektren Anwendung, da sie eine größere spektrale

Dispersion bieten. Dafür wurden das *on-resonance* und das *off-resonance* Spektrum separat aufgenommen, wobei immer nach einem Inkrement zwischen den Spektren gewechselt wurde. Nach Abschluss der Akquisition wurden beide Spektren identisch prozessiert, phasenkorrigiert und von einander subtrahiert. Das resultierende Differenzspektrum wurde mit dem Programm Sparky⁸⁶ ausgewertet, wobei die Signale über den Fit einer Lorentzkurve integriert wurden. Der höchste Integralwert wurde als 100 % gesetzt und alle anderen Werte zu ihm in Relation gesetzt.

3 PROBLEMSTELLUNG

Das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) ist ein Protein des Myelins und der Oligodendrozytenmembran im zentralen Nervensystem und ist für die Inhibierung des Neuritenwachstums im adulten ZNS verantwortlich. Es gehört zu der Klasse der sogenannten Siglecs und ist ein Sialinsäure-bindendes Lektin, wobei ein Schwerpunkt auf der Erkennung eines α -Sia-2,3- β -Gal Motivs liegt.

In dieser Arbeit sollte die Bindung verschiedener komplexer sialylierter Kohlenhydrate an das MAG untersucht werden. Diese Liganden sind synthetische Derivate der natürlichen Liganden von MAG, den Gangliosiden. Sie könnten potentiell als Therapeutika für Patienten mit *Spinal Cord Injury* eingesetzt werden, indem sie MAG inhibieren und somit ein neues Neuritenwachstum und damit möglicherweise eine Wiederherstellung der Funktion des Rückenmarks erzeugen. Das Ziel sollte dabei die Bestimmung der Dissoziationskonstanten dieser Interaktionen und der Ligand-Bindungsepitope mittels *Saturation Transfer Difference* NMR (STD NMR) sein. Die Bestimmung der Bindungsepitope sollte eine Optimierung der Ligandenstruktur bezüglich ihrer Bindungsaffinität ermöglichen.

Von den bekannten Liganden für MAG zeigt das Gangliosid GQ1b α die höchste Affinität. Eine zentrale Rolle nimmt dabei eine Sialinsäure ein, die 2,6 an ein N-Acetylgalactosamin verknüpft ist. Es wurde vermutet, dass diese Sialinsäure eine Salzbrücke zum Protein ausbildet. Daher sollte ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung des Einflusses dieser Sialinsäure auf die Dissoziationskonstante und das Bindungsepitop liegen. Dafür sollten verschiedene Saccharide mit 2,6-verknüpfter Sialinsäure, ein Milchsäure-Derivat dieser Saccharide und eine Mutante des MAGs, bei der die kritische Aminosäure ausgetauscht wurde, eingesetzt werden.

Da Ganglioside schlecht wasserlöslich und damit für NMR Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen nicht zugänglich sind, sollten weiterhin Ganglioside in Liposomen eingebettet werden. Mit diesen wasserlöslichen Vesikeln sollte somit ein System für STD NMR Untersuchungen mit amphiphilen Molekülen geschaffen werden. Ergänzend dazu sollte der komplexe Saccharidteil der Ganglioside mit dem Enzym Endoglycoceramidase II abgespalten werden und dann für STD Untersuchungen mit MAG eingesetzt werden.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) ist ein Transmembranprotein des Myelins und der Oligodendrozytenmembranen im zentralen Nervensystem. Es besteht aus fünf extrazellulären, einer Transmembran- und zwei cytosolischen Domänen. Glycostrukturen machen ca. 30 % des Gewichts aus und das voll glycosylierte Protein hat eine Masse von ca. 100 kDa⁶⁶. Eine der Aufgaben von MAG ist die Inhibierung des axonalen Wachstums im adulten ZNS, so dass als negative Konsequenz Neuriten, die z. B. durch einen Unfall zerstört wurden, nicht mehr regeneriert werden können.

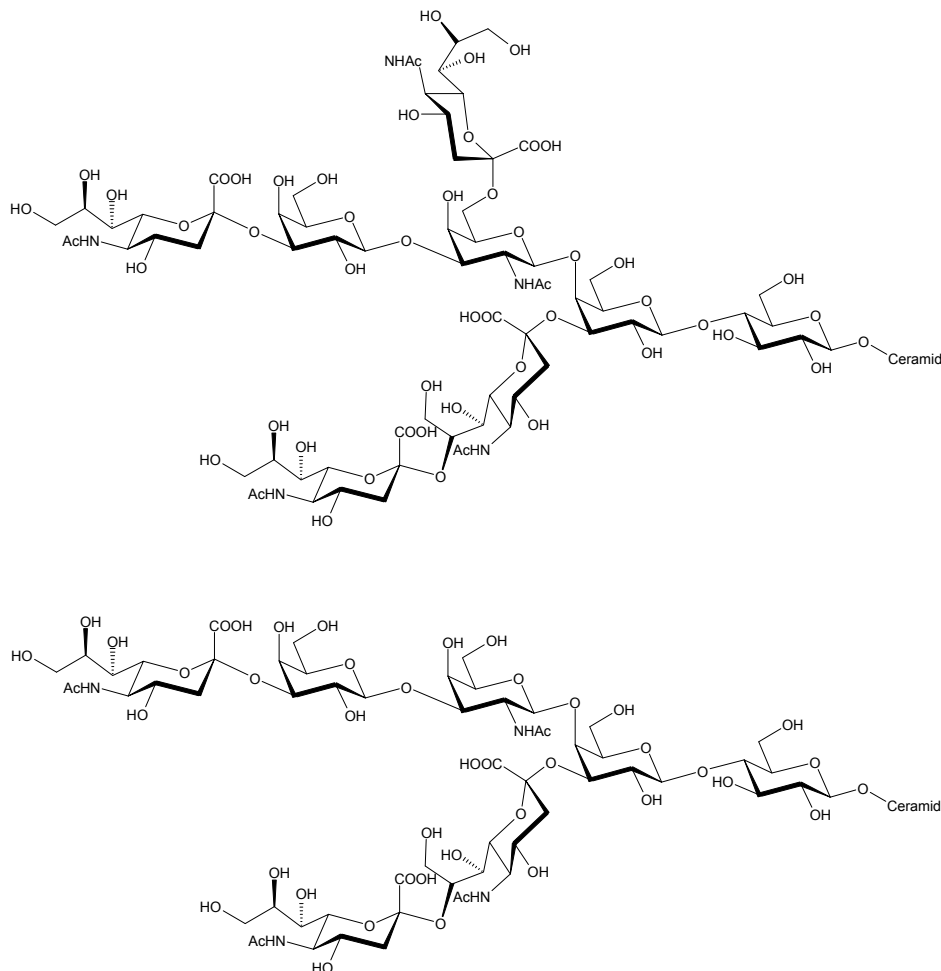


Abbildung 12: Struktur des Gangliosids GQ1b α (oben) und des Gangliosids GT1b (unten). Der Saccharidteil besteht für GQ1b α aus acht Kohlenhydraten mit insgesamt vier Sialinsäuren und für GT1b aus sieben Kohlenhydraten. Dabei hat GT1b dieselbe Struktur wie GQ1b α ohne die 2,6-verknüpfte Sialinsäure. Am reduzierenden Ende der Glucose ist ein Ceramidrest geknüpft.

MAG gehört zu der Gruppe der Siglecs und bindet Sialinsäuren, wobei der Schwerpunkt auf einem α -Sia-2,3-Gal Motiv liegt. Für die Sialinsäure-Bindungsstelle spielt das Arginin 118 eine zentrale Rolle, da es vermutlich eine Salzbrücke zum Carboxylat der Sialinsäure ausbildet (Siehe Kapitel 1.8)⁷⁶. Da Transmembranproteine in der Regel schlecht in wässrigen Lösungen zu handhaben sind, wurde in dieser Arbeit mit einem Fusionsprotein gearbeitet. Dieses Protein enthält die ersten drei Domänen des MAG zusammen mit dem Fc-Fragment eines Immunglobulins⁷¹. Zwei dieser Einheiten sind analog zu den Immunglobulinen über zwei Disulfidbrücken zu einem Dimer verbunden (Siehe Kapitel 1.8). Dieser Hybrid ist wasserlöslich und konnte daher ohne Probleme gehandhabt werden.

Es ist bekannt, dass das Gangliosid GQ1b α die höchste Affinität zu MAG zeigt⁸⁷. GQ1b α ist ein Octasaccharidgangliosid mit vier Sialinsäuren (siehe Abbildung 12). Es dient vermutlich nicht als funktioneller Ligand von MAG, da es nicht sehr häufig im neuronalen Gewebe vorkommt. Es wird stattdessen postuliert, dass der Funktionsträger das Gangliosid GT1b ist⁷⁸, das eine ähnliche Struktur wie GQ1b α aufweist, nur ohne die 2,6-verknüpfte Sialinsäure am GalNAc. Um den Effekt dieser Sialinsäure zu evaluieren, sollten verschiedene Liganden mit und ohne 2,6-verknüpfte Sialinsäuren untersucht werden^a und ihre Bindung an MAG bewertet werden. Zur Untersuchung dieser Interaktionen wurde STD NMR verwendet. Als Medium für die NMR Proben diente ein D₂O/PBS-Puffer, der nahe an den physiologischen Bedingungen ist.

^a Die Liganden wurden von Oliver Schwardt, Ganpan Gao und Sachin Shelke von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Ernst der Universität Basel synthetisiert.

4.1 STUDIEN ZUR SÄTTIGUNG DES PROTEINS

Wie bereits in Kapitel 2 dargestellt, wird das Protein bei STD Untersuchungen für das *on-resonance* Spektrum durch einen *shaped pulse* gesättigt. Von der Effizienz, mit der das Protein gesättigt wird, hängt natürlich auch der Sättigungstransfer zum gebundenen Liganden ab. Daher sollte eine Einstrahlfrequenz gefunden werden, bei der das MAG möglichst gut gesättigt wird. Aufgrund der breiten Linien von Makromolekülen im NMR Spektrum sind die einzelnen Resonanzen der Protonen nicht sichtbar. Stattdessen beobachtet man nur eine Hüllkurve (siehe Abbildung 13).

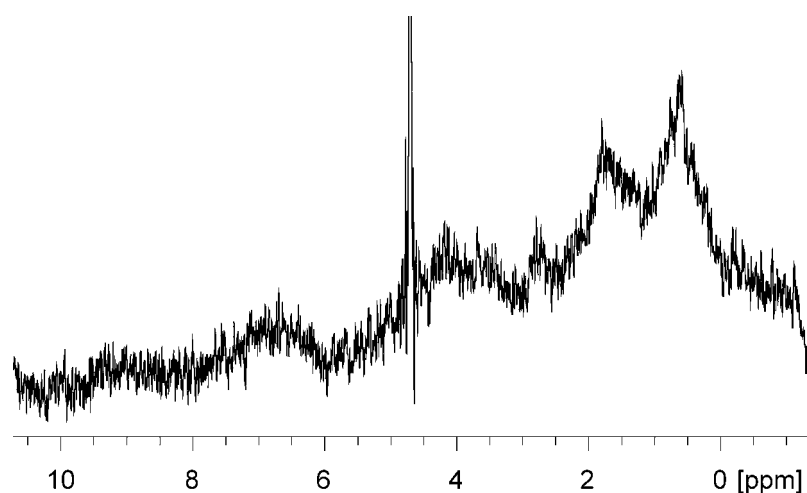


Abbildung 13: STD Spektrum (stdsp, siehe Appendix) einer MAG Probe in D_2O /PBS Puffer, $c(\text{FcMAGd1-3}) = 8.33 \mu\text{M}$ bei einer Temperatur von 285 K mit der Intensität des *shaped pulse* $sp1=55 \text{ dB}$ (500 MHz Spektrometer) und einer Sättigungszeit von 2.04 s. Das Spektrum wurde vor der Fourier Transformation mit einer linienverbreitenden Exponentialfunktion von 3 Hz multipliziert. Die Einstrahlfrequenzen waren für *off resonance* bei 40 ppm und für *on resonance* bei -2 ppm. Durch einen Vergleich mit einem Referenzspektrum konnte die Sättigungseffizienz bestimmt werden. Deutlich sind die breiten Resonanzen des Proteins zu sehen.

Um die höchste Sättigungseffizienz zu ermitteln, wurden STD Spektren von dem Protein mit verschiedenen Einstrahlfrequenzen aufgenommen und mit den Referenzspektren verglichen. Die Hüllkurven von beiden Spektren wurden zur Deckung gebracht und dann der Skalierungsfaktor ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Sättigungseffizienz abnahm, sobald sich die Einstrahlfrequenzen aus dem Bereich des normalen spektralen Fensters zwischen 0 und 10 ppm entfernten. Dies hing mit der nicht optimalen Spindiffusion zusammen. Würde die Sättigung durch Spindiffusion

optimal auf jedes Proton des Proteins übertragen, dann dürfte sich eine derartige Abhängigkeit nicht ergeben. Die Praxis zeigt jedoch, dass diese Übertragung der Sättigung nie derart homogen abläuft. Daher kam es zu unterschiedlichen Sättigungseffizienzen für unterschiedliche Einstrahlfrequenzen.

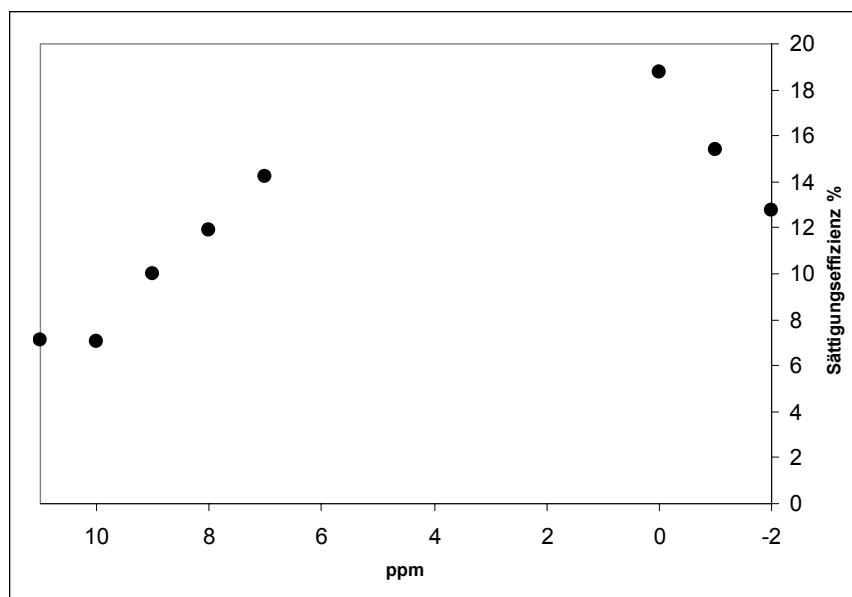


Abbildung 14: Auftragung der Sättigungseffizienz gegen die Einstrahlfrequenzen *on resonance*, $c(\text{FcMAGd1-3}) = 2.494 \mu\text{M}$ bei einer Temperatur von 285 K mit der Intensität des *shaped pulse* $\text{sp1}=45 \text{ dB}$ (500 MHz Spektrometer) und einer Sättigungszeit von 1.02 s. Das Spektrum wurde vor der Fourier Transformation mit einer linienverbreiternden Exponentialfunktion von 10 Hz multipliziert. Es ist deutlich zu sehen, dass die Sättigungseffizienz zunimmt, je näher die Einstrahlfrequenz beim normalen spektralen Fenster liegen. Im Bereich von 0-7 ppm wurden keine Werte aufgenommen, da sich in diesem Bereich die Resonanzen der Liganden befinden, mit denen später gearbeitet werden sollte. Eine direkte Sättigung der Liganden anstelle eines Sättigungstransfers auf den Liganden würde die Ergebnisse verfälschen.

Aus einer Analyse von Abbildung 14 wurden die Frequenzen 0 und 7 ppm als günstig ermittelt. Diese Daten sollten im nächsten Schritt mit den Ligandartefakten für die verschiedenen Frequenzen verglichen werden (siehe Kapitel 4.2).

4.2 ARTEFAKTE VON LIGANDEN

Theoretisch sollten kleine Moleküle keine Resonanzen im STD Spektrum zeigen, wenn außerhalb ihres spektralen Fensters eingestrahlt wird. In der Praxis zeigte sich jedoch, dass diese Moleküle auch ohne eine Bindung an das Protein Signale im STD Spektrum erzeugen. Dies hängt mit Aggregationseffekten zusammen. Dabei binden die Moleküle an größere Aggregate, die sie selber bilden. Diese Systeme sind groß genug, um breite Linien zu erzeugen, und zeigen somit einen Bindungseffekt, der im STD NMR Spektrum sichtbar ist. In der Regel sind diese Effekte jedoch klein und vernachlässigbar. Aber diese Artefakte mussten mit den Daten aus den Sättigungsstudien korreliert werden, um den optimalen Einstrahlpunkt zu finden, an dem die Sättigung des Proteins und die Artefakte des Liganden noch akzeptabel waren.

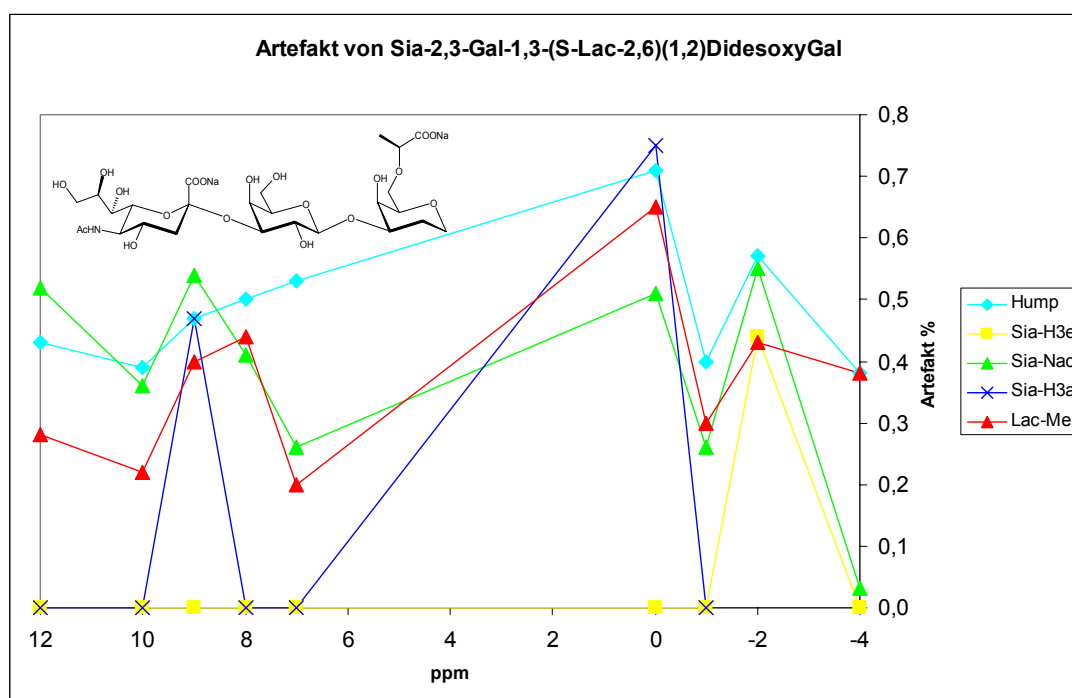


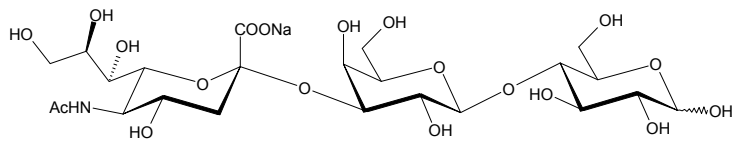
Abbildung 15: Artefaktanalyse von Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DideoxyGal. c(Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DideoxyGal) = 1.161 mM bei einer Temperatur 285 K mit der Intensität des *shaped pulse* $\gamma B_1/2\pi = 48.32$ Hz und einer Sättigungszeit von 2.04 s. Das Spektrum wurde vor der Fourier Transformation mit einer linienverbreiternden Exponentialfunktion von 3 Hz multipliziert. Pulsprogramm: std19slsp (siehe Appendix). STD Pulsprogramm mit Watergate zur Wasserunterdrückung und Spinlock von 10 ms zur Unterdrückung breiter Proteinresonanzen. In der Legende sind verschiedene Protonen des Moleküls angegeben, für die die Artefaktwerte bestimmt wurden. Es war für die einzelnen Resonanzen keine Abhängigkeit von der Einstrahlungsfrequenz zu ermitteln. Die Werte verhalten sich mehr oder weniger zufällig. Im Mittel lagen die Artefakte bei ca. 0.4 %, wobei der Integralfehler 25-30 % betrug.

Um diese Artefakte zu bestimmen, wurden konzentrierte Lösungen des Liganden (833 $\mu\text{g/mL}$) verwendet. Dabei sollte die Konzentration mindestens so hoch sein wie bei den STD NMR Experimenten mit Protein und Ligand. Anschließend wurden STD Spektren mit verschiedenen Einstrahlfrequenzen aufgenommen, und die Artefakte durch eine Überlagerung und Skalierung mit dem Referenzspektrum bestimmt.

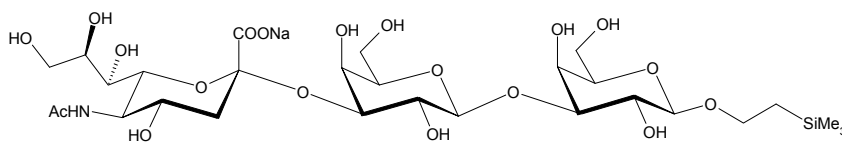
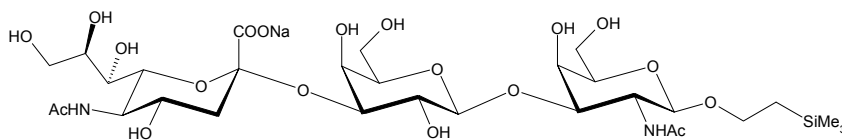
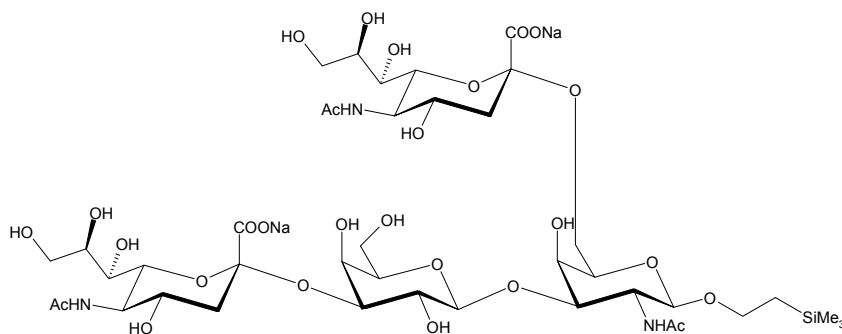
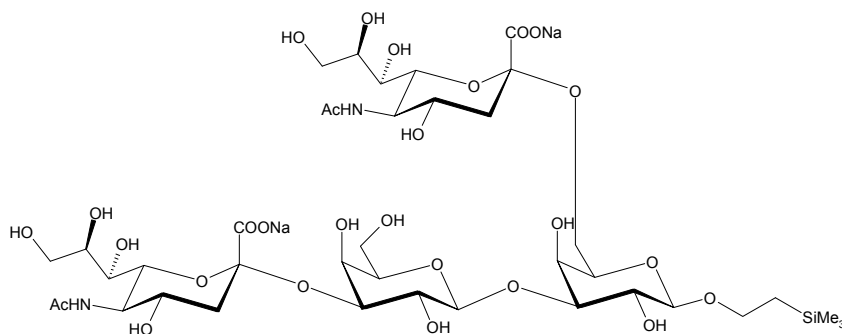
Erstaunlicherweise konnten bei einer Auftragung der Artefaktwerte gegen die Einstrahlfrequenz keine Korrelation zwischen den Einstrahlpunkten und den Artefaktwerten vorgenommen werden (siehe Abbildung 15). Diese Werte verhielten sich mehr oder weniger zufällig. Weil die STD Werte sehr gering waren, ist es jedoch möglich, dass in diesen Bereichen andere Faktoren dominierten. Da STD Spektren Differenzspektren sind, reagieren diese Experimente recht empfindlich auf Veränderungen der Umgebung. So kann eine thermische Instabilität oder eine Instabilität des Magneten einen größeren Einfluss haben und zusätzlich zu den eigentlichen STD Artefakten weitere Artefakte produzieren, die dann in der Summe dominieren.

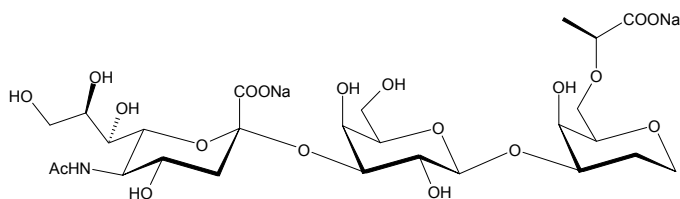
Viele der bearbeiteten Liganden tragen am anomeren Zentrum des reduzierenden Kohlenhydrats eine Trimethylsilylgruppe, deren Resonanz bei ca. -0.2 ppm liegt. Um die Resonanz dieser Gruppe nicht direkt zu treffen, wurden 0 und -1 ppm als Frequenzen eliminiert. In der Regel wurde für die folgenden Experimente mit den Einstrahlfrequenzen -2 oder 7 ppm gearbeitet.

4.3 ÜBERSICHT DER BEARBEITETEN LIGANDEN

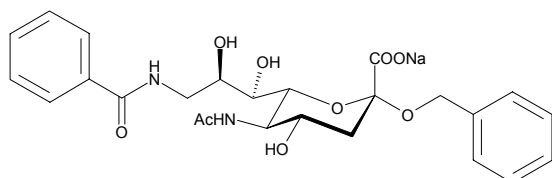


Sialyllactose

 α -Sia-2,3- β -Gal-1,4-Glc α -Sia-2,3- β -Gal-1,3- β -Gal-
OCH₂CH₂SiMe₃ α -Sia-2,3- β -Gal-1,3-
 β -GalNAc-CH₂CH₂SiMe₃ α -Sia-2,3- β -Gal-1,3-(α -Sia-
2,6) β -GalNAc-
OCH₂CH₂SiMe₃ α -Sia-2,3- β -Gal-1,3-(α -Sia-
2,6) β -Gal- OCH₂CH₂SiMe₃



α -Sia-2,3- β -Gal-1,3-
(S-Lac2,6)(1,2)DideoxyGal



2-Benzyl, 9-Benzamido- α -
Neuraminosid

Die Ethyltrimethylsilylgruppe, die bei den meisten Liganden mit dem anomeren Proton des reduzierenden Kohlenhydrats verknüpft ist, wird im weiteren für die Nomenklatur ignoriert. Außerdem wird aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Angaben zur α - oder β -Stellung der glycosidischen Bindung verzichtet, so dass z.B. α -Sia-2,3- β -Gal-1,3- β -Gal-OCH₂CH₂SiMe₃ mit Sia-2,3-Gal-1,3-Gal bezeichnet wird. Alle Liganden mit der Ausnahme der Sialyllactose wurden von Oliver Schwardt, Ganpan Gao und Sachin Shelke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Ernst an der Universität Basel synthetisiert.

4.4 STD-NMR STUDIEN VON SIALOGLYCOKONJUGATEN: DIE DISSOZIATIONSKONSTANTEN

Bei der Bearbeitung eines Liganden wurde in der Regel zunächst eine Titration durchgeführt, um die Dissoziationskonstante (K_D) zu bestimmen. Dafür wurden konzentrierte Stammlösungen von Ligand gegen eine Lösung von FcMAGd1-3 in D_2O /PBS Puffer titriert und wiederholt STD- und Referenzspektren aufgenommen. Der PBS Puffer wurde gewählt, da sich mit ihm physiologische Bedingungen weitgehend simulieren lassen und keine seiner Komponenten störende Signale im Spektrum erzeugt. Durch die Anwendung der Pulssequenz WATERGATE konnte das HDO-Signal nahezu vollständig unterdrückt werden, und durch die Verwendung eines Spinlock von 10 ms konnte ein großer Teil der breiten Proteinsignale eliminiert werden. Alle Experimente wurden dabei bei 285 K durchgeführt, da das Protein bei Raumtemperatur nicht sehr lange stabil war. Beide Spektren wurden anschließend identisch prozessiert und dann überlagert (siehe Abbildung 16).

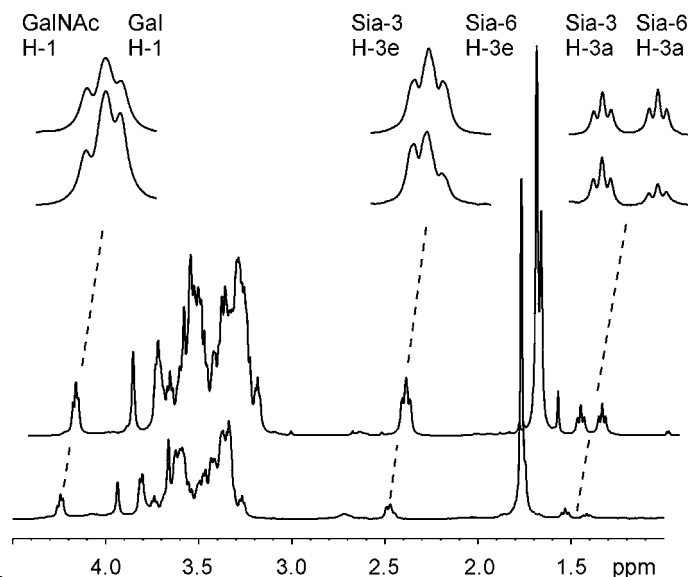


Abbildung 16: STD und Referenzspektrum von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia,2,6)GalNAc mit MAG. 41 facher Ligand-Überschuss bei einer Temperatur von 285 K. Oben: Referenzspektrum, unten: STD-Spektrum mit 5x höherer Intensität, damit sich die Spektren besser vergleichen lassen. Bei den Vergrößerungen kann deutlich die unterschiedliche Signalintensität im STD Spektrum im Vergleich zum Referenzspektrum gesehen werden. Je höher die Signalintensität im STD Spektrum ist, desto größer ist die Nähe des Protons zum Protein.

Die Auswertung für die K_D -Werte erfolgte in der Regel anhand des N-Acetylsignals der 2,3-verknüpften Sialinsäure. Dieses Signal stellte sich als besonders günstig heraus, weil seine Resonanz ein Singulett ist, in der Regel nicht überlagert war, und weil es bei allen untersuchten Liganden die höchste STD Intensität zeigte. Zur Bestimmung der STD Werte wurde das Referenzspektrum über das STD Spektrum gelegt und die beiden N-Acetylsignale zur Deckung gebracht. Daraus wurde der Skalierungsfaktors zwischen den beiden Spektren und damit der STD Wert bestimmt. Diese Werte lassen sich nach Eq. 3 als Quotient der Signalintensität im STD Spektrum und im Referenzspektrum ermitteln. Dabei stellen I_0 und I_{sat} die Intensität des Signals im *off resonance* bzw. *on resonance* Spektrum und $I_0 - I_{\text{sat}}$ die Signalintensität im Differenzspektrum dar. Abbildung 16 zeigt ein STD Spektrum im Vergleich mit dem Referenzspektrum.

Wird der ermittelte STD Wert mit dem Ligand-Überschuss multipliziert und dieses Produkt, der STD-Amplifikationsfaktor, gegen die Konzentration aufgetragen, so lässt sich bei fortschreitender Titration eine Sättigungskurve erkennen, aus der nach dem Modell des *one site binding* in Näherung die Dissoziationskonstante bestimmt werden kann. Die Verdünnung der NMR Probe, die durch die Titration entstand, wurde ignoriert, da es sich hierbei um minimale Effekte handelte. In der Regel wurde titriert, bis sich eine Sättigung erkennen ließ. An dem Punkt wurde dann die Titration abgebrochen. K_D -Werte werden im folgenden auf zwei signifikante Stellen angegeben.

4.4.1 Dissoziationskonstanten der Trisaccharide

Abbildung 17 zeigt das Gangliosid GT1b, einen funktionellen Liganden für MAG⁷⁸. Durch die Bindung des MAGs an das GT1b wird eine Kaskade ausgelöst, die zum *growth cone collapse* führt (siehe Kapitel 1.5). Um den Teil im Rahmen von Abbildung 17 zu simulieren, wurden die Trisaccharide Sia-2,3-Gal-1,3-Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc^a verwendet. Die Sialyllactose wurde kommerziell erhalten und diente als erste Referenz.

^a Die Liganden Sia-2,3-Gal-1,3-Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc wurden von Oliver Schwardt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Ernst an der Universität Basel synthetisiert.

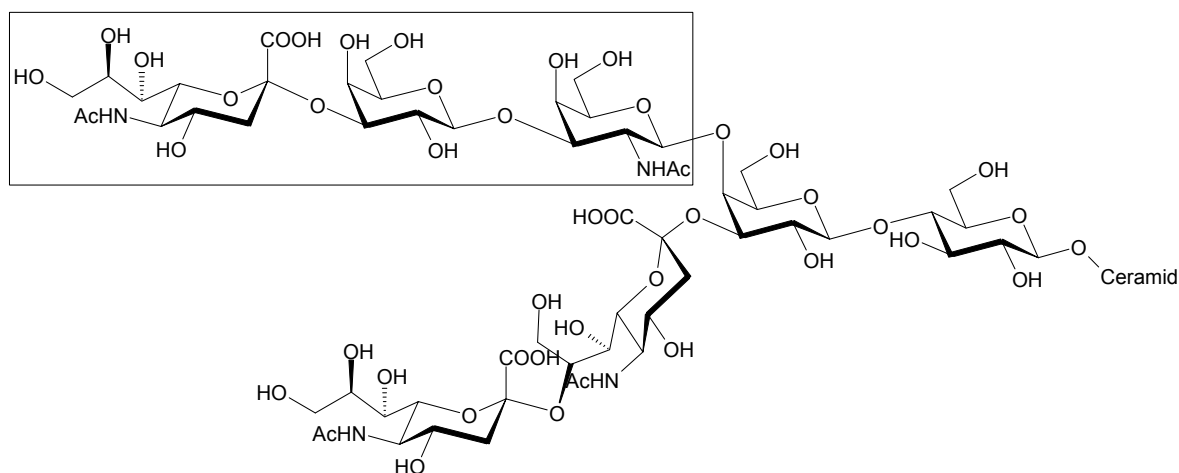


Abbildung 17: Das Gangliosid GT1b. Der Kohlenhydratanteil besteht aus einem biantennären Heptasaccharid mit drei Sialinsäuren. GT1b ist ein funktioneller Ligand von MAG. In dem Rahmen ist der Trisaccharidanteil dargestellt, dessen Beteiligung an der Bindung durch die bearbeiteten Trisaccharide analysiert werden soll.

Sialyllactose: Sia-2,3-Gal-1,4-Glc

Sialyllactose, ein Trisaccharid bestehend aus Sialinsäure, Galactose und Glucose wurde als erste Testsubstanz verwendet, da sie kommerziell erhältlich ist (siehe Abbildung 18). Im Gegensatz zum GT1b, dem natürlichen Liganden von MAG, trägt sie jedoch eine unnatürliche Verknüpfung: die Gal-1,4-Glc-Struktur (siehe Abbildung 18). Die von MAG bevorzugte Sia-2,3-Gal-Struktur ist jedoch vorhanden. Für die Titration wurde eine D₂O/PBS Lösung mit 4.5 nmol MAG ($c = 9 \mu\text{M}$) verwendet. Titriert wurde mit einer konzentrierten Stammlösung von Sialyllactose (7.41 mg/mL) von einem Ligand-Protein-Überschuss von Faktor 5 bis 150. Die Auswertung erfolgte anhand der Resonanz der N-Acetylgruppe.

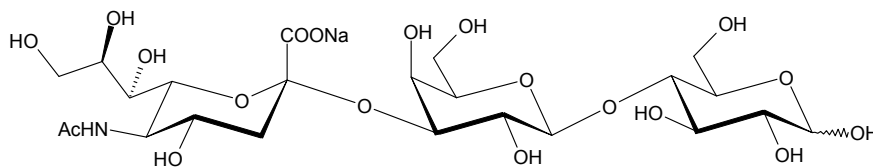


Abbildung 18: Struktur von Sialyllactose (Sia-2,3-Gal-1,4-Glc)

Während der Titration konnte ein farblos flockiger Niederschlag beobachtet werden, der sich in der NMR Probe bildete. Offensichtlich bewirkte die Zugabe des Liganden diesen Niederschlag, bei dem es sich u. U. um ausgefallenes Protein handelte. Die Menge des ausgefallenen Proteins war jedoch entweder sehr gering, oder es war Protein ausgefallen, das nicht aktiv und damit nicht dem STD Experiment zugänglich war. Denn wie in Abbildung 19 zu sehen ist (schwarze Kurve) zeigt die Aufbaukurve von Sialyllactose keine Besonderheiten. Wenn ein signifikanter Teil des Proteins durch die Titration mit dem Liganden unzugänglich geworden wäre, so hätte sich dies durch einen Einbruch der Aufbaukurve bemerkt gemacht, da weniger Protein zu geringeren STD Werten geführt hätte, die wiederum den STD-Amplifikationsfaktor beeinflusst hätten. Der K_D -Wert von Sialyllactose, der durch einen Fit nach dem *one site binding* Modell ermittelt wurde, liegt bei $650 \mu\text{M}$.

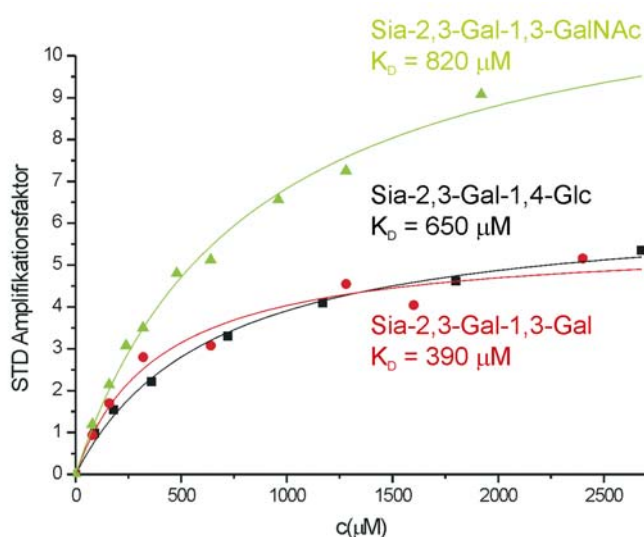


Abbildung 19: Die Aufbaukurven und Dissoziationskonstanten der untersuchten Trisaccharide: Sia-2,3-Gal-1,4-Glc, Sia-2,3-Gal-1,3-Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc. Alle Daten wurden über Titrations von Liganden-Stammlösungen gegen FcMAGd1-3 Lösungen aufgenommen. Die Auswertungen wurden anhand des Integrals der N-Acetylgruppe vorgenommen. Die Dissoziationskonstanten sind bei den Aufbaukurven dargestellt.

Sia-2,3-Gal-1,3-Gal

Die Verbindung Sia-2,3-Gal-1,3-Gal enthält die native Struktur aus dem GT1b mit der Ausnahme der N-Acetylfunktion an der reduzierenden Galactose (siehe Abbildung 17 u. Abbildung 20). Für die Titration wurde eine D₂O/PBS Lösung mit 4 nmol MAG ($c = 8 \mu\text{M}$) verwendet. Titriert wurde mit einer konzentrierten Stammlösung von Sia-2,3-Gal-1,3-Gal (10 mg/mL) von einem Ligand-Protein-Überschuss von Faktor 5 bis 150. Die Auswertung erfolgte anhand des Signals der N-Acetylgruppe. Die Aufbaukurve der Titration ist in rot in Abbildung 19 dargestellt. Der ermittelte K_D -Wert liegt nach einem Fit über das *one site binding* Modell bei 390 μM .

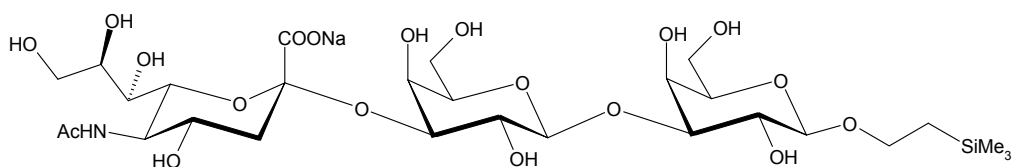


Abbildung 20: Struktur von Sia-2,3-Gal-1,3-Gal

Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc

Sia-2,3-Gal-1,3-Gal entspricht der nativen Struktur des GT1b (siehe Abbildung 17 u. Abbildung 21). Es wurde eine D₂O/PBS Lösung mit 4 nmol MAG ($c = 8 \mu\text{M}$) für die Titration vorgelegt. Titriert wurde von einem Ligand-Protein-Überschuss von Faktor 5 bis 120 mit einer konzentrierten Lösung von Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc (10 mg/mL). Anhand der Resonanz der N-Acetylgruppe erfolgte die Auswertung für die STD Titration. Die Aufbaukurve der Titration ist in grün in Abbildung 19 dargestellt und der ermittelte K_D -Wert liegt bei 820 μM . Er ist also um den Faktor zwei schlechter als der K_D -Wert von Sia-2,3-Gal-1,3-Gal.

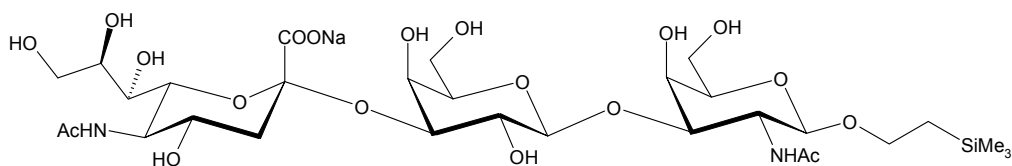


Abbildung 21: Struktur von Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc

4.4.2 Dissoziationskonstanten der Tetrasaccharide

Das GQ1b α (Abbildung 22) unterscheidet sich von dem GT1b (Abbildung 17) durch die 2,6-verknüpfte Sialinsäure an dem N-Acetylgalactosamin. Um den Effekt dieser zusätzlichen Sialinsäure zu bewerten, wurden STD Spektren von MAG mit zwei Tetrasacchariden aufgenommen. In dem Rahmen von Abbildung 22 ist der Teil des GQ1b α dargestellt, den die Tetrasaccharide Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc und Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal^a simulieren sollten.

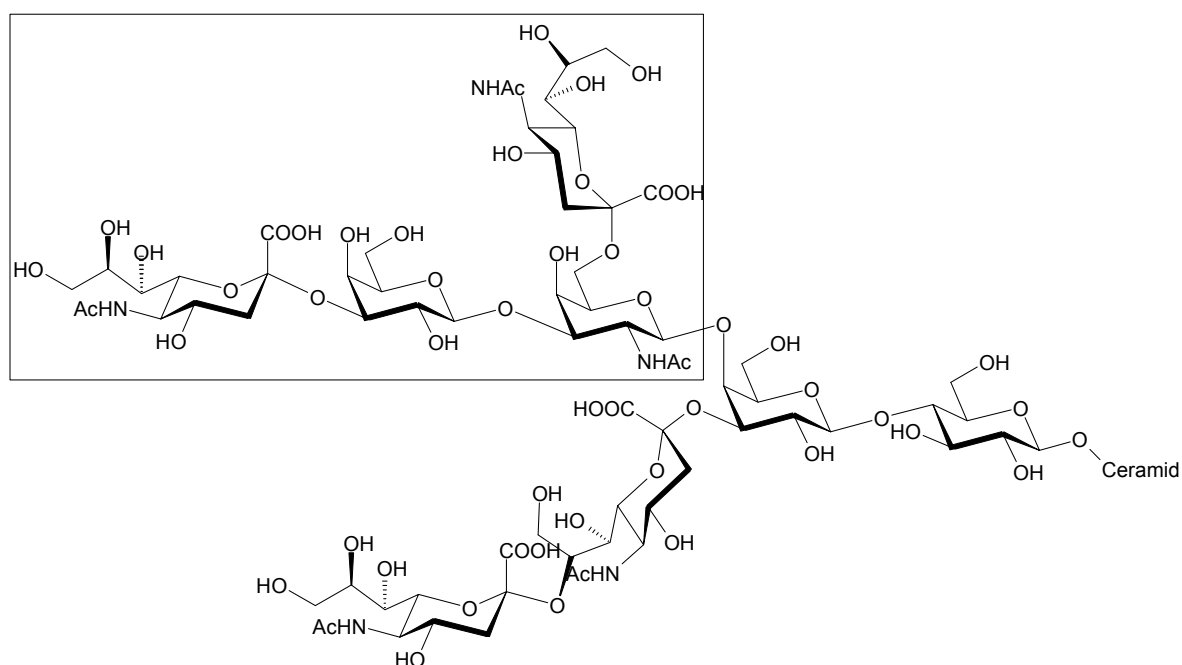


Abbildung 22: Das Gangliosid GQ1b α und der Ausschnitt für die Tetrasaccharide. Der Kohlenhydratanteil besteht aus einem triantennären Octasaccharid mit vier Sialinsäuren. In dem Rahmen ist der Anteil dargestellt, der durch die bearbeiteten Tetrasaccharide simuliert werden sollte.

^a Die Liganden Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc wurden von Oliver Schwardt und Ganpan Gaoin der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Ernst an der Universität Basel synthetisiert.

Die Konformation von MAG ist nicht bekannt, aber es wurde eine Cokristallstruktur von einem verwandten Protein, dem Sialoadhesin von May *et. al.* veröffentlicht^{74,75}. Die Sequenzhomologie zu MAG liegt dabei bei 28 % und auf dieser Basis wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Peters in Lübeck ein Homologiemodell erstellt^a. Aus diesem Modell konnte erkannt werden, dass eine ionische Interaktion der 2,6-verknüpften Sialinsäure mit dem Lysin 67 möglich ist. Die Untersuchungen mit den Tetrasacchariden sollten weitere Informationen hierzu liefern.

Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc

Das Tetrasaccharid Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc enthält die native Struktur aus dem Gangliosid GQ1b α (siehe Abbildung 22 u. Abbildung 23). Für die Titration wurde eine D₂O/PBS Lösung mit 4.7 nmol MAG ($c = 9.4 \mu\text{M}$) verwendet. Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc wurde als konzentrierte Stammlösung eingesetzt (10 mg/mL) und wurde von einem Ligand-Protein-Überschuss von Faktor 1 bis 41 titriert. Die Auswertung erfolgte anhand der Resonanz der N-Acetylgruppe.

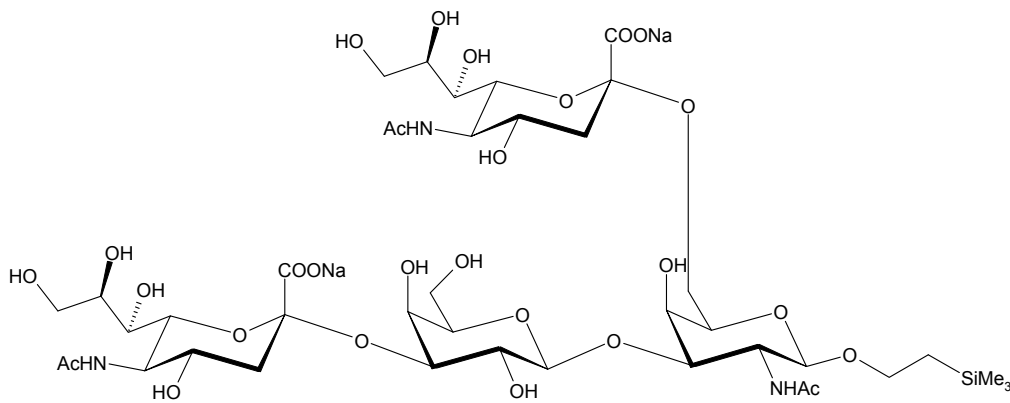


Abbildung 23: Struktur von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc

^a Dieses Homologiemodell wurde von Anirban Bhunia in dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Peters an der Medizinischen Universität Lübeck erstellt.

Analog zu den Experimenten mit den Trisacchariden wurden auch hier die STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentrationen aufgetragen. In Abbildung 24 ist die Titrationsaufbaukurve in schwarz dargestellt. Der K_D -Wert, der sich aus dieser Experimentserie ergab, lag bei 180 μM .

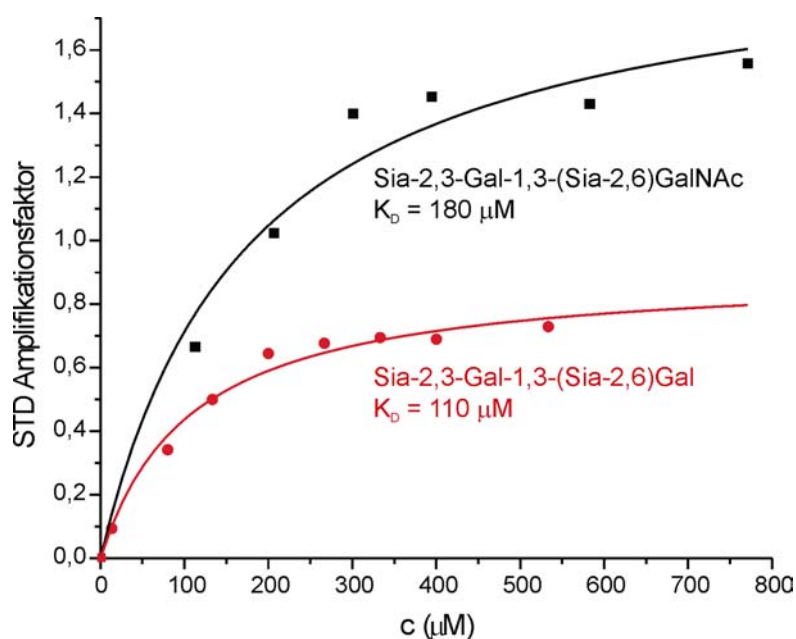


Abbildung 24: Die Aufbaukurven und Dissoziationskonstanten der untersuchten Tetrasaccharide: Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc (schwarz) und Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal (rot). Alle Daten wurden über Titrations von Liganden-Stammlösungen gegen FcMAGd1-3-Lösungen aufgenommen. Die Auswertungen erfolgten anhand des Integrals der N-Acetylgruppe. Die Dissoziationskonstanten sind unter den Aufbaukurven dargestellt

Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal

Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal enthält die native Struktur des GQ1b α mit Ausnahme der N-Acetylgruppe an der reduzierenden Galactose (siehe Abbildung 22 u. Abbildung 25). Es wurde eine D₂O/PBS Lösung mit 4 nmol MAG ($c = 8 \mu\text{M}$) vorgelegt und mit einer konzentrierten Stammlösung von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal (10 mg/mL) von einem Ligand-Protein-Überschuss von Faktor 1 bis 40 titriert. Die Auswertung erfolgte anhand des Signals der N-Acetylgruppe. In Abbildung 24 ist die Titrationsaufbaukurve in rot dargestellt. Der K_D -Wert, der sich aus dieser Experimentserie ergab, lag bei 110 μM . Analog zu den

Trisacchariden lag auch hier der K_D -Wert für das unnatürliche Tetrasaccharid um den Faktor 2 niedriger als beim natürlichen Tetrasaccharid.

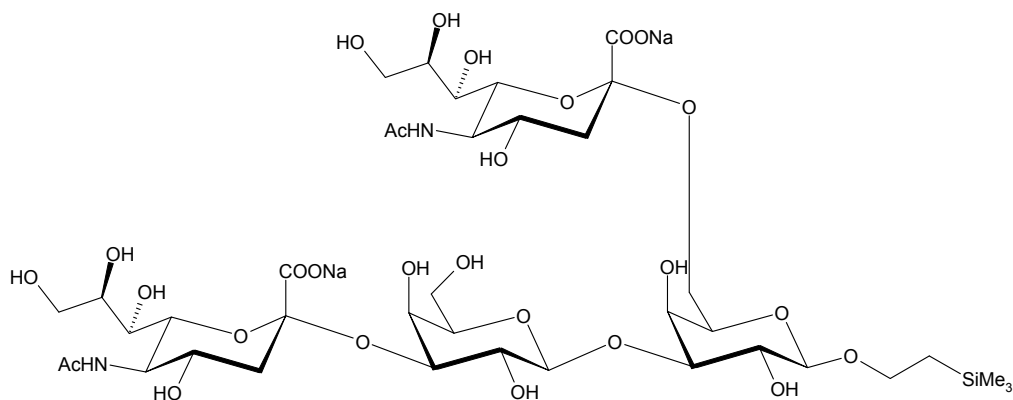


Abbildung 25: Struktur von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal

4.4.3 Vergleich der Tri- und Tetrasaccharide

Bei einem Vergleich der K_D -Werte der Trisaccharid Liganden, zeigt sich, dass die K_D -Werte für Sialyllactose mit $650 \mu\text{M}$, für Sia-2,3-Gal-1,3-Gal mit $390 \mu\text{M}$ und für Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc mit $820 \mu\text{M}$ etwa im gleichen Bereich liegen. Weiterhin bewirkt die N-Acetylgruppe an dem reduzierenden Galactosamin eine Erhöhung des K_D -Wertes und des maximalen Amplifikationsfaktor-Wertes um den Faktor zwei. Dies ist interessant, da das native Trisaccharid schlechter bindet, als das nicht native. Die generell höheren STD Amplifikationswerte für diesen nativen Liganden könnten auf einen höheren k_{off} -Wert hindeuten, wenn die k_{on} -Werte für die Liganden ähnlich sind. Sialyllactose hat mit $650 \mu\text{M}$ einen ähnlichen K_D -Wert wie die beiden anderen Liganden, obwohl sie eine unnatürliche Gal-1,4-Glc Verknüpfung aufweist. Daher scheint es wahrscheinlich, dass die reduzierende Galactose bzw. das Galactosamin im nativen Kohlenhydrat keine große Rolle bei der Bindung spielt. Vermutlich ist die Proteinoberfläche an dieser Stelle weit von dem Ligand entfernt, so dass ein Austausch der Galactose gegen Glucose möglich ist, ohne die Bindung des Liganden maßgeblich zu beeinflussen.

Ein Vergleich mit den Aufbaukurven der Tetrasaccharide scheint zu bestätigen, dass die N-Acetylgruppe an der reduzierenden Galactose einen negativen Einfluss auf die Bindung

hat. So ist die Dissoziationskonstante des Tetrasaccharids ohne N-Acetylgruppe mit 110 μM auch hier besser als die des Tetrasaccharids mit N-Acetylgruppe (180 μM). Des Weiteren ist auch hier der maximale Amplifikationsfaktor Wert von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc um den Faktor zwei höher als für Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal. (Die Proteinkonzentration war jedoch etwas unterschiedlich bei beiden Tetrasaccharidproben. Dies muss berücksichtigt werden, da mehr Protein zu höheren STD Amplifikationsfaktoren führt.) Wie schon bei den Trisacchariden scheint auch dies auf einen höheren k_{off} -Wert hinzudeuten.

Sowohl für Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc als auch für Sia-2,3-Gal-1,3-Gal führt die Addition einer weiteren Sialinsäure an die Position 6 der reduzierenden Galactose zu einer Verbesserung des K_{D} -Wertes um den Faktor vier.

4.4.4 Evaluation der 2,6-verknüpften Sialinsäure

In Kapitel 4.4.2 wurde erwähnt, dass das Homologiemodell des MAG eine ionische Interaktion der 2,6-verknüpften Sialinsäure mit dem Lysin 67 prognostiziert. Um diese Vorhersage des Modells zu evaluieren, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Erstens wurde ein Tetrasaccharid für STD Studien durch ein Derivat ersetzt, bei dem die 2,6-verknüpfte Sialinsäure gegen eine Milchsäure ausgetauscht wurde: Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal. Zweitens wurden STD Experimente mit einer Austauschmutante des MAGs vorgenommen, bei der das Lysin 67 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (K67A).

Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal

Wie das Bindungsepitop des Tetrasaccharids Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc zeigt (Kapitel 4.5.2), beteiligt sich die 2,6-verknüpfte Sialinsäure nicht stark an der Bindung. Daher sollte mit diesem Tetrasaccharid-Derivat der K_{D} -Wert dieser Interaktion bestimmt werden. Es sollte evaluiert werden, ob die gesamte Sialinsäure oder nur das Carboxylat wichtig für die Bindung an das Protein ist. Daher wurde die Sialinsäure durch eine S-Milchsäure ersetzt (siehe Abbildung 26).

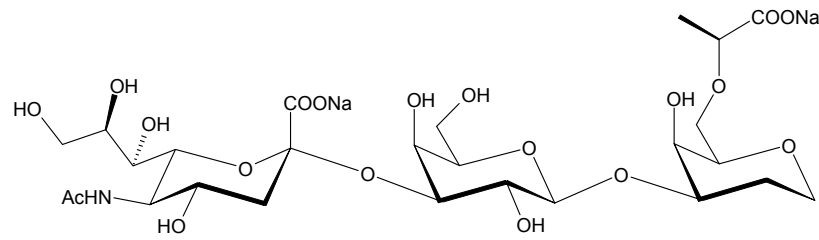


Abbildung 26: Struktur von Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DideoxyGal^a

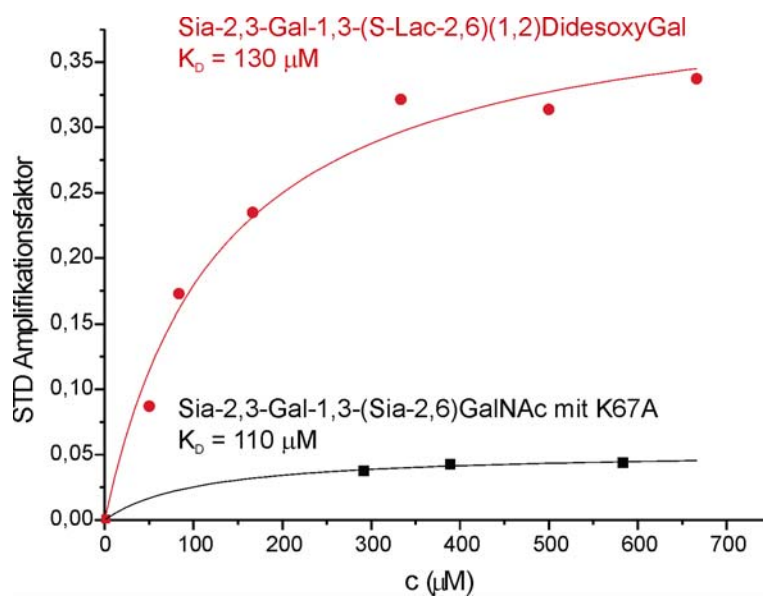


Abbildung 27: Die Dissoziationskonstanten der untersuchten Liganden: Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc mit der Mutante K67A (schwarz) und Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DideoxyGal mit dem Wildtyp MAG (rot). Die beiden letzten Datenpunkte dieser Aufbaukurve sind Ausreißer, die aber für die Kalkulation des Fits mit aufgenommen wurden, da sie noch einigermaßen gut zu dem Fit der ersten Datenpunkte passten. Diese Daten wurden über Titrationsen von Liganden-Stammlösungen gegen Protein-Lösungen aufgenommen. Die Auswertungen wurden anhand des Integrals der N-Acetylgruppe vorgenommen. Die Dissoziationskonstanten sind über den Aufbaukurven dargestellt.

Für die Titration wurde eine D₂O/PBS Lösung mit 5 nmol MAG ($c = 8.33 \mu\text{M}$) verwendet. Titriert wurde mit einer konzentrierten Stammlösung von Sia-2,3-Gal-1,3-

^a Der Ligand Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)-(1,2)-DideoxyGal wurde von Oliver Schwardt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Ernst an der Universität Basel synthetisiert.

(S-Lac-2,6)(1,2)DideoxyGal ($c = 10 \text{ mg/mL}$) von einem Ligand-Protein-Überschuss von Faktor 3 bis 40. Für die Auswertung wurde die Resonanz der N-Acetylgruppe verwendet. Der K_D -Wert betrug $130 \text{ }\mu\text{M}$.

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, liegt der K_D -Wert mit $130 \text{ }\mu\text{M}$ (Daten sind in rot dargestellt) im gleichen Bereich wie die anderen Tetrasaccharide. Untersuchungen des Bindungsepitopes sollten dann Auskunft darüber geben, ob auch der Bindungsmodus der gleiche ist wie der der anderen Tetrasaccharide.

FcMAGd1-3 K67A mit Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc

Hier wurde eine K67A Austauschmutante verwendet, bei der das Lysin gegen ein Alanin ausgetauscht war^a. Vorausgesetzt, dass die Konformation des Proteins der des nativen Proteins entspricht, sollte bei einer Interaktion dieser Mutante mit einem der Tetrasaccharide der K_D -Wert vergleichbar mit dem des entsprechenden Trisaccharids sein. Für die Titration wurde eine Lösung mit $5.83 \text{ nmol K67A-MAG}$ ($c = 9.72 \text{ }\mu\text{M}$) in $\text{D}_2\text{O/PBS}$ Lösung verwendet. Titriert wurde mit einer konzentrierten Stammlösung von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc (10 mg/mL) von einem Ligand-Protein-Überschuss von Faktor 5 bis 30. Abbildung 27 zeigt die Aufbaukurve der STD Titration. Dabei zeigen sich jedoch einige Defizite.

1. Das S/N-Verhältnis der STD Spektren war sehr niedrig, so dass die Spektren für die ersten Titrationspunkte nicht interpretiert werden konnten. Daher fehlen die Daten im Bereich des K_D -Wertes. Aus diesem Grund gibt es einen großen systematischen Fehler beim K_D -Wert.

^a Diese Mutante wurde von Heiko Gäthje aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Soerge Kelm in Bremen exprimiert.

- Die STD-Amplifikationsfaktoren waren im Vergleich zum nativen Protein um den Faktor 40 niedriger. Wie schon im Kapitel 4.2 erwähnt, sind derart kleine STD Werte nicht immer auf wirkliche Interaktionen zurückzuführen. Diese Werte werden vermutlich durch thermische oder andere Instabilitäten dominiert, da diese Veränderungen Artefakte produzieren, die in einem Differenzspektrum dominieren.

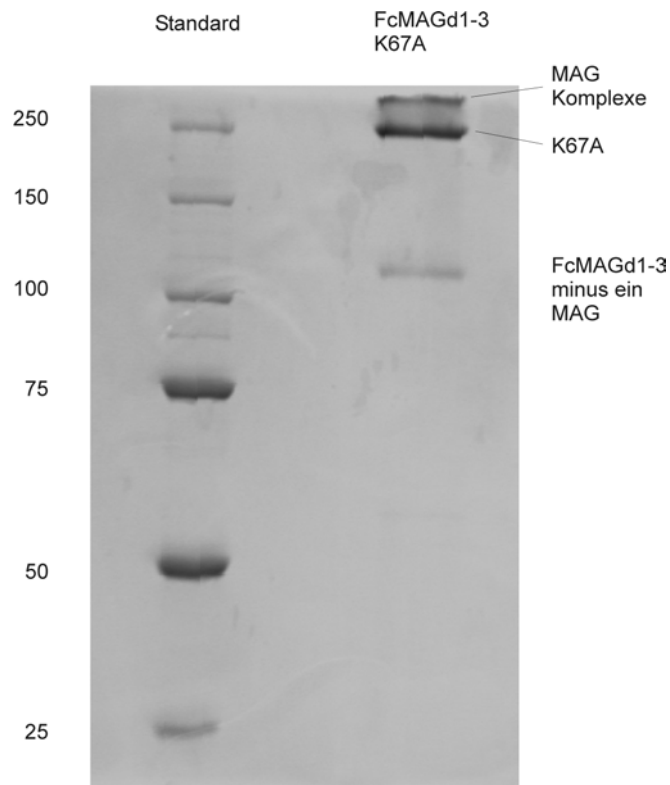


Abbildung 28: 10 %ige SDS-PAGE mit der Mutante K67A. Die oberste Bande entspricht hochmolekularen MAG Komplexen, die an der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel verbleiben. Die Bande direkt darunter entspricht dem K67A während die unterste und schwächste Bande einem MAG Komplex entspricht, bei dem ein MAG abgespalten wurde.

Ein vergleichender Assay (Fluorescein Hapten Inhibitionsassay), der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Soerge Kelm an der Universität Bremen vorgenommen wurde, zeigte einen Unterschied im rIP um den Faktor zwei zwischen dem Wildtyp und der Mutante für dieses Tetrasaccharid, während das Trisaccharid Sia-2,3-Gal-1,3-Gal gleich stark an Wildtyp und Mutante band. Dieses Trisaccharid diente bei diesem Assay gleichzeitig als Referenz (siehe Kapitel 4.4.6). Um einen Abbau der Mutante auszuschließen, wurde daher ein 10 %iges Acrylamidgel für eine SDS PAGE angefertigt (Abbildung 28). Aus dem

Polyacrylamidgel konnte jedoch ersehen werden, dass die Mutante intakt war. Da die Proteinprobe sehr frisch war, schien eine Abbau unwahrscheinlich.

Somit widersprechen sich hier die Ergebnisse des Assays und die STD Ergebnisse. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass die Konformation des Proteins durch die Mutation gestört wurde, so dass der Ligand nur in geringen Mengen oder gar nicht binden konnte. Die positiven Ergebnisse des Assays wären somit vielleicht nur Artefakte. Genaueres kann jedoch ohne Kenntnisse zur Proteinkonformation nicht ermittelt werden. Weitere Untersuchungen mit dieser Mutante wurden aus diesen Gründen nicht vorgenommen.

4.4.5 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid

Aromatische Gruppen werden häufig eingesetzt, um hydrophobe Patches auf der Proteinoberfläche durch den Liganden abzudecken. Daher wurden Versuche mit einer modifizierten Sialinsäure unternommen (siehe Abbildung 29), bei der Aromaten mit der 2- und 9-Position der Sialinsäure verknüpft sind^a. Die Analyse der STD-Aufbaukurven ergab einen K_D -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich (8 μM). Es wurde jedoch auch festgestellt, dass dieses Derivat zur Aggregation neigt. Im ^1H Spektrum des Liganden sind die Aggregate deutlich in Form einer Hüllkurve zu sehen, und bei einer Untersuchung der STD-Artefakte zeigten sich ungewöhnlich hohe Werte bis zu 1.5 %, die auf eine Bindung an die Aggregate hindeuten.

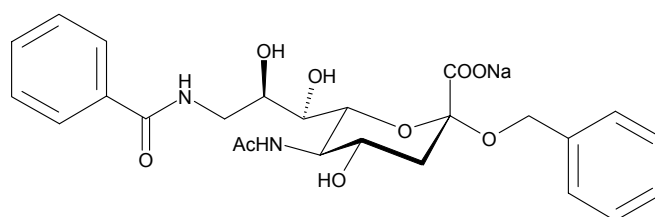


Abbildung 29: Struktur von 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid.

^a Der Ligand 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid wurde von Sachin Shelke in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Ernst an der Universität Basel synthetisiert.

Um die Aggregation zu unterdrücken, wurde der Probe Trifluorethanol-d₃ (TFE) hinzugefügt. Bei 20 Volumenprozent TFE waren die Artefakte im STD Spektrum des Liganden nicht mehr beobachtbar. Ein Vergleich dieses Systems mit dem physiologischen System ist durch den TFE-Anteil jedoch nur eingeschränkt möglich. 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid kann jedoch als Leitstruktur für weitere Struktur-Optimierungen verwendet werden.

Für die Titration wurde eine D₂O/PBS -Lösung mit 20 % TFE und 3.02 nmol MAG ($c = 5.6 \mu\text{M}$) verwendet. Titriert wurde mit einer konzentrierten Stammlösung von 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid (3.18 mg/mL) von einem Ligand-Protein-Überschuss von Faktor 2 bis 50. Die Aufbaukurven für die ortho-, meta- und para-Protonen der Benzyl- und Benzamidogruppen sind in Abbildung 30 dargestellt. Die K_D -Werte lagen zwischen 22 und 62 μM . In diesem Fall wurden die aromatischen Protonen für die Bestimmung der Dissoziationskonstante verwendet, da sie hohe STD Werte zeigten und sich außerhalb des Bereiches der störenden TFE Signale befanden. Die unterschiedlichen K_D -Werte für die verschiedenen Protonen kamen dadurch zustande, dass die Protonen, die nahe beim Protein liegen, eine bessere Bindung und damit einen größeren STD-Effekt zeigen. Aus Abbildung 30 kann daher ersehen werden, dass die Protonen der Benzamido- und der Benzylgruppe gut an das Protein binden. Da STD Werte jedoch von der longitudinalen Relaxationszeit (T_1) der Protonen abhängen (siehe Eq. 1) ist es möglich, dass die Werte für die Aromaten höher erscheinen, als sie eigentlich sind. Die T_1 -Werte für aromatische Protonen liegen in der Regel bei 2 s, können aber teilweise auch höher sein, so dass sich Sättigung auf diesen Atomen „akkumulieren“ kann. Daraus würde ein zu hoher STD Wert resultieren, wenn der Relaxationsdelay während der Akquisition des Spektrums nicht lang genug ist, um die vollständige Relaxation der beteiligten Atome zu ermöglichen.

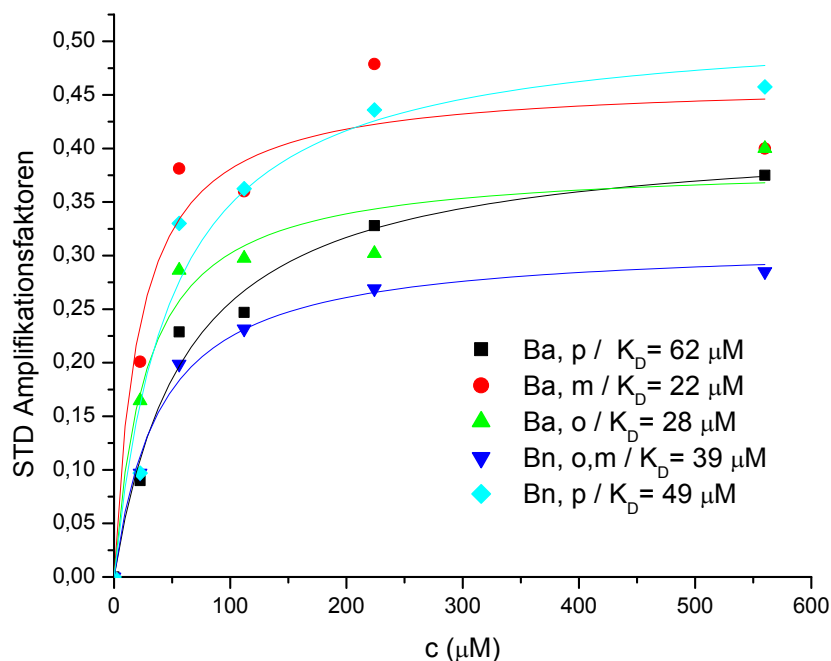


Abbildung 30: Aufbaukurve für die Titration des Sialinsäurederivates mit MAG bei 20 % TFE-Anteil. Die Aufbaukurven sind für die Protonen der Benzamido-Gruppe (Ba) und der Benzylgruppe (Bn) dargestellt. Die Bindungskonstanten liegen zwischen 22 und 62 μM .

4.4.6 Vergleich der K_D -Werte mit rIP-Werten

Zum Vergleich mit den STD Daten liegen rIP Werte vor, die durch einen Fluorescein Hapten Inhibitionsassay ermittelt wurden^a. Dieser Assay ist schematisch in Abbildung 31 dargestellt. Sialinsäure wird hier kovalent über einen Linker an eine Mikrotiterplatte gebunden und der Ligand dient als Inhibitor. Ein Komplex aus Fc-MAG und einem anti-Fc Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gelabelt ist, wird für die Bindung eingesetzt. Über die initiale Geschwindigkeit der Fluorescein-Freisetzung durch Hydrolyse des Fluoresceindiphosphat wird die Menge des gebundenen Proteins bestimmt. Die rIP-Werte wurden aus den IC50-Werten der verschiedenen Substanzen berechnet. Als Referenz diente Sia-2,3-Gal-1,3-Gal.

^a Diese Daten wurden von Heiko Gäthje aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Soerge Kelm ermittelt und zur Verfügung gestellt.

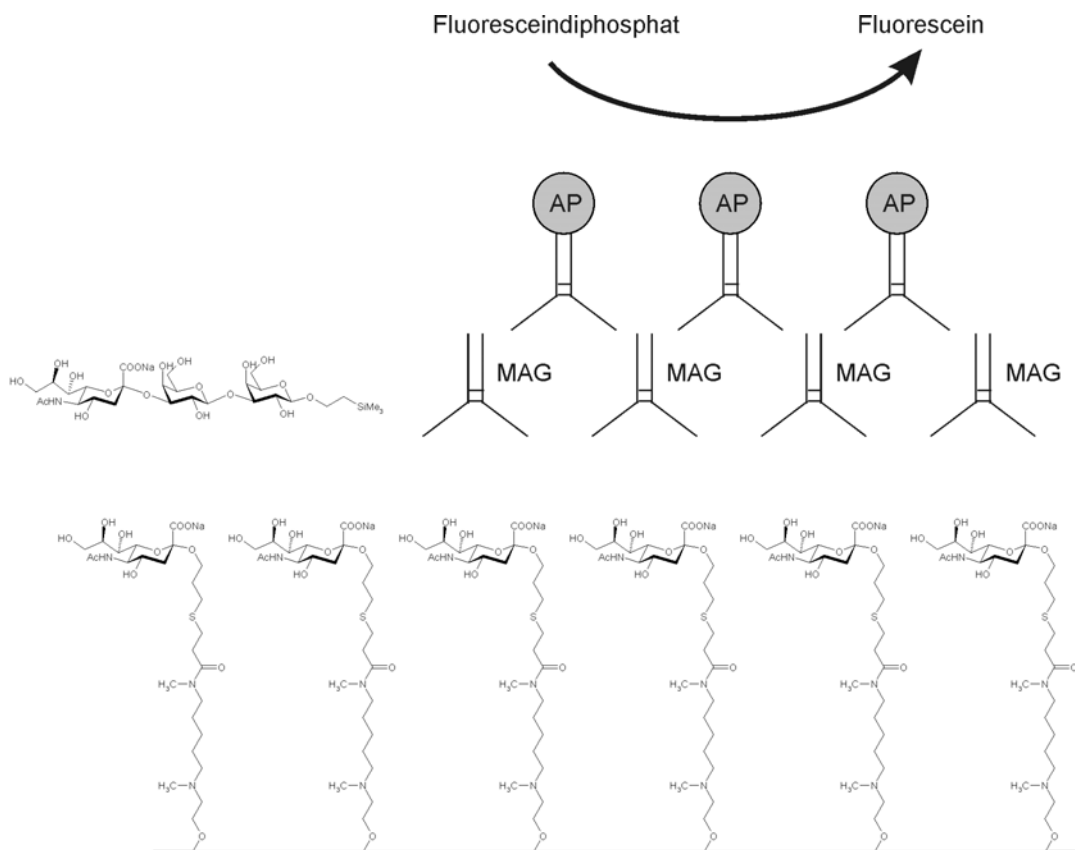
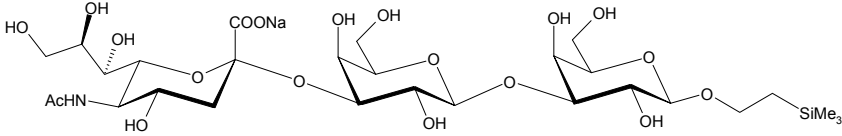
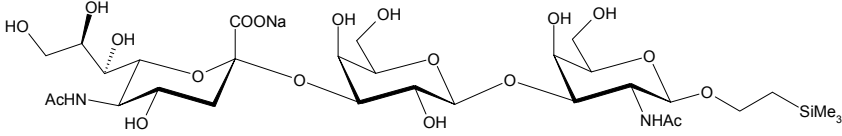
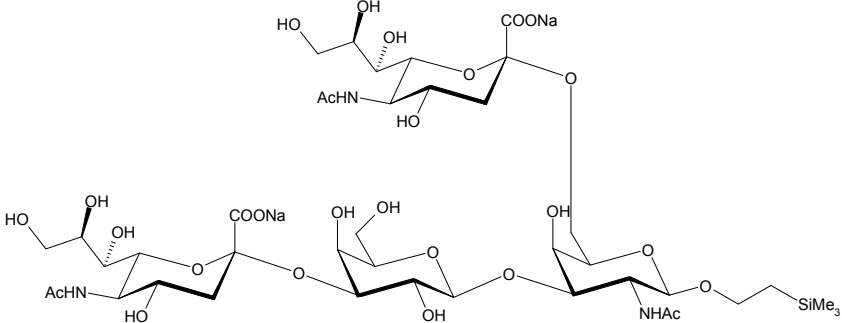
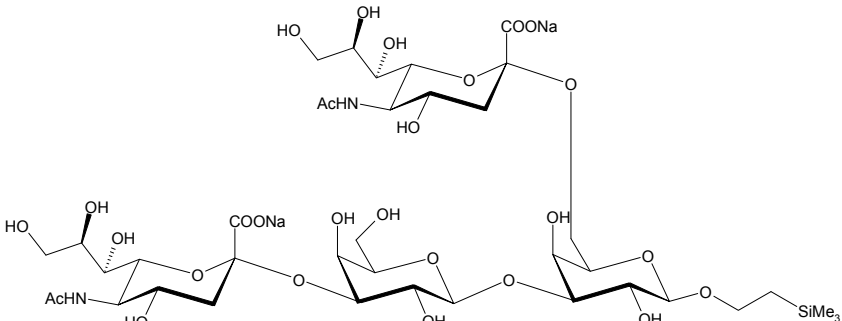
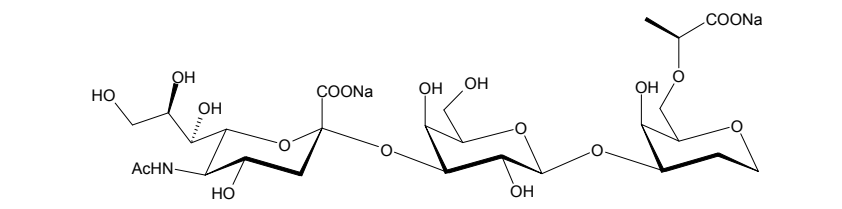
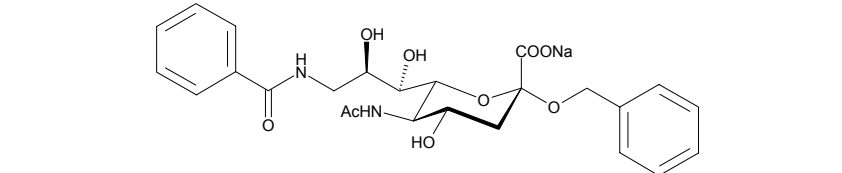


Abbildung 31: Fluorescein Hapten Inhibitionsassay. Sialinsäure ist kovalent an eine Mikrotiterplatte gebunden und der Ligand (hier Sia-2,3-Gal-1,3-Gal) dient als Inhibitor. Fc-MAG wird mit alkalischen Phosphatase gelabelten anti-Fc Antikörpern vorkomplexiert.

In Tabelle 1 sind die getesteten Verbindungen mit den rIP-Werten, die aus dem Fluorescein Hapten Inhibitionsassay stammen, und die K_D -Werte, die aus den STD Daten stammen, zusammengefasst. Für die rIP Daten sind in der Regel zwei Werte dargestellt, die aus zwei verschiedenen Messreihen stammen. Die Daten weisen dabei eine Varianz um den Faktor zwei auf. Wird dieser Fehler mit in Betracht gezogen, so ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung der STD Daten mit den rIP-Daten, wenn ein linearer Zusammenhang zwischen rIP- und K_D -Werten angenommen wird. So zeigte sich bei beiden Messungen, dass die N-Acetylgruppe an der reduzierenden Galactose, sowohl bei den Trisacchariden als auch bei den Tetrasacchariden zu einer schlechteren Bindung führt. Weiterhin zeigt sich, dass die Tetrasaccharide eine vierfach bessere Bindung an MAG zeigen, als die entsprechenden Trisaccharide und das Milchsäurederivat zeigt eine ähnlich gute Bindung wie die entsprechenden Tetrasaccharide. Eine größere Abweichung ergibt sich für das aromatische Derivat der Sialinsäure. Hier streuen die rIP Werte über einen größeren Bereich.

Tabelle 1: Vergleich der rIP Werte des Fluoreszenz Hapten Inhibitionsassays mit den K_D -Werten aus den STD Titrationen.

Verbindung	rIP	K_D
	1.0 Referenz	390 μ M
	1.0 bzw. 0.86	820 μ M
	3.8 bzw. 3.3	180 μ M
	4.6 bzw. 4.2	110 μ M
	2.5 bzw. 4.09	120 μ M
	250 - 700	22 μ M

4.5 STD-NMR STUDIEN VON SIALOGLYCOKONJUGATEN: BESTIMMUNG DES BINDUNGSEPITOPS

STD NMR ist sehr vielseitig, und so können aus einem STD Spektrum auch Informationen über das Bindungsepitop eines Liganden gewonnen werden. Dies ist möglich, da der STD-Effekt mit dem Abstand des Ligandprotons zur Proteinoberfläche korreliert. Ein großer STD Wert zeigt eine große Nähe zum Protein an. Der STD Wert ist jedoch außerdem, wie in Kapitel 4.4.5 erwähnt wurde, auch schwach von den T_1 Werten abhängig. Für die untersuchten Kohlenhydrate sind jedoch die T_1 -Zeiten der Protonen in der Regel ziemlich ähnlich. Bei T_1 Messungen mit Sialinsäure lagen die Zeiten zwischen 0.4 und 1.5 s. Aus den Messungen von Kline und Serianni ergaben sich für Galactose Werte zwischen 1 und 2 s⁸⁸. Die Ausnahme war H-2, wo die T_1 -Zeit bei 6.5 s lag. Für die Tri- und Tetrasaccharide konnten keine T_1 -Zeiten ermittelt werden, weil eine Integration der Signale aufgrund starker Überlagerung nicht möglich war. Die Relaxationszeiten der Tri- und Tetrasaccharide sollten jedoch kürzer sein, als die der Monosaccharide, wobei insbesondere lange Relaxationszeiten stark verkürzt werden. Daher wurde nicht für die T_1 Zeiten korrigiert.

In einem 1D STD Spektrum können für dispergierte Signale die STD-Effekte durch einen Vergleich der Signalintegrale im STD und Referenzspektrum bestimmt werden. Dieses Verfahren ist jedoch nur begrenzt für überlagerte Signale möglich. Wie aus Abbildung 16 zu sehen ist, befinden sich die meisten Kohlenhydratresonanzen zwischen 3.2 und 4.0 ppm. Dies ist typisch für viele Kohlenhydrate. Aufgrund dieser starken Überlagerung in diesem Bereich ist es jedoch schwierig, einzelne Resonanzen zuzuordnen. Für eine Bestimmung des Bindungsepitops des Liganden wäre es jedoch sehr wichtig, die Resonanzen mit denen des Referenzspektrums zu vergleichen, um die STD Intensität bestimmen zu können. Einzelne Signale, wie die anomeren Protonen der Galactosen oder die H-3a und H-3e Signale der Sialinsäuren, lassen sich aus dem eindimensionalen STD Spektrum ermitteln, aber der größte Teil der Signale weist nicht genügend spektrale Dispersion auf, um eine Interpretation zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurden zweidimensionale STD Spektren aufgenommen.

Ein STD TOCSY Spektrum kann zwar qualitative Aussagen liefern, aber eine Quantifizierung ist schwierig, da sich auch in diesem Spektrum die meisten Resonanzen im *Hump*-Bereich überlagern, und da auch die unterschiedliche Intensität entlang einer Spur, die aufgrund des Magnetisierungstransfers entsteht, in Betracht gezogen werden muss. Die

Anwendung eines heteronuklearen 2D Spektrums erschien daher am vorteilhaftesten. Deswegen wurden für die Bestimmungen des Bindungsepitopes STD HSQC Spektren mit einer ^1H - und einer ^{13}C -Domäne aufgenommen (siehe Abbildung 32).

Prinzipiell wurden die Messungen für die Bestimmung des Bindungsepitopes immer am Ende der STD Titrationen vorgenommen, so dass das STD HSQC immer für die höchste Ligandkonzentration aufgenommen wurde. Alle Messungen wurden an einem 700 MHz Spektrometer mit cryogenem Probenkopf durchgeführt. Die Intensität des *shaped pulse* $\gamma\text{B}1/2\pi$ war ca. 130 Hz ($\text{sp}1 = 39$ dB), bei einer Gesamtsättigungszeit von 2.04 s. Das spektrale Fenster umfasste in der ^1H -Domäne 6 ppm und in der ^{13}C -Domäne 100 ppm. Dafür wurden das *on-resonance* und das *off-resonance* Spektrum separat aufgenommen (Pulsprogramm *stdiitgpsi*, siehe Appendix) und nach Abschluss der Akquisition identisch prozessiert, phasenkorrigiert und voneinander abgezogen. Das resultierende Differenzspektrum wurde ausgewertet, und die Signale mit dem Programm Sparky⁸⁶ über den Fit einer Lorentzkurve integriert. Dabei wurde der höchste Integralwert als 100 % und alle anderen Werte dazu in Relation gesetzt.

Die Daten für das Bindungsepitop der Liganden wurden, wenn nicht anders beschrieben, immer aus den STD HSQC Spektren bezogen. Aufgrund einiger Probleme, die beim HSQC jedoch inhärent sind, und die später in Kapitel 4.5.3 beschrieben werden, wurden noch zusätzlich die Daten aus dem 1D STD Spektrum verwendet und in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Allgemein wurden die STD Intensitäten in drei Kategorien eingeteilt: schwach = 1-30 % in cyan, mittel = 31-60 % in blau und stark = 61-100 % in magenta. Weitere Farben, die verwendet wurden, sind in den Bildunterschriften erklärt.

Abbildung 32 zeigt einen Ausschnitt aus dem STD HSQC Spektrum von MAG mit dem Tetrasaccharid Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc. Auch hier sind einige Signale überlagert. Besonders gilt dies für die C-4, C-7, C-8 und C-9 der beiden Sialinsäuren.

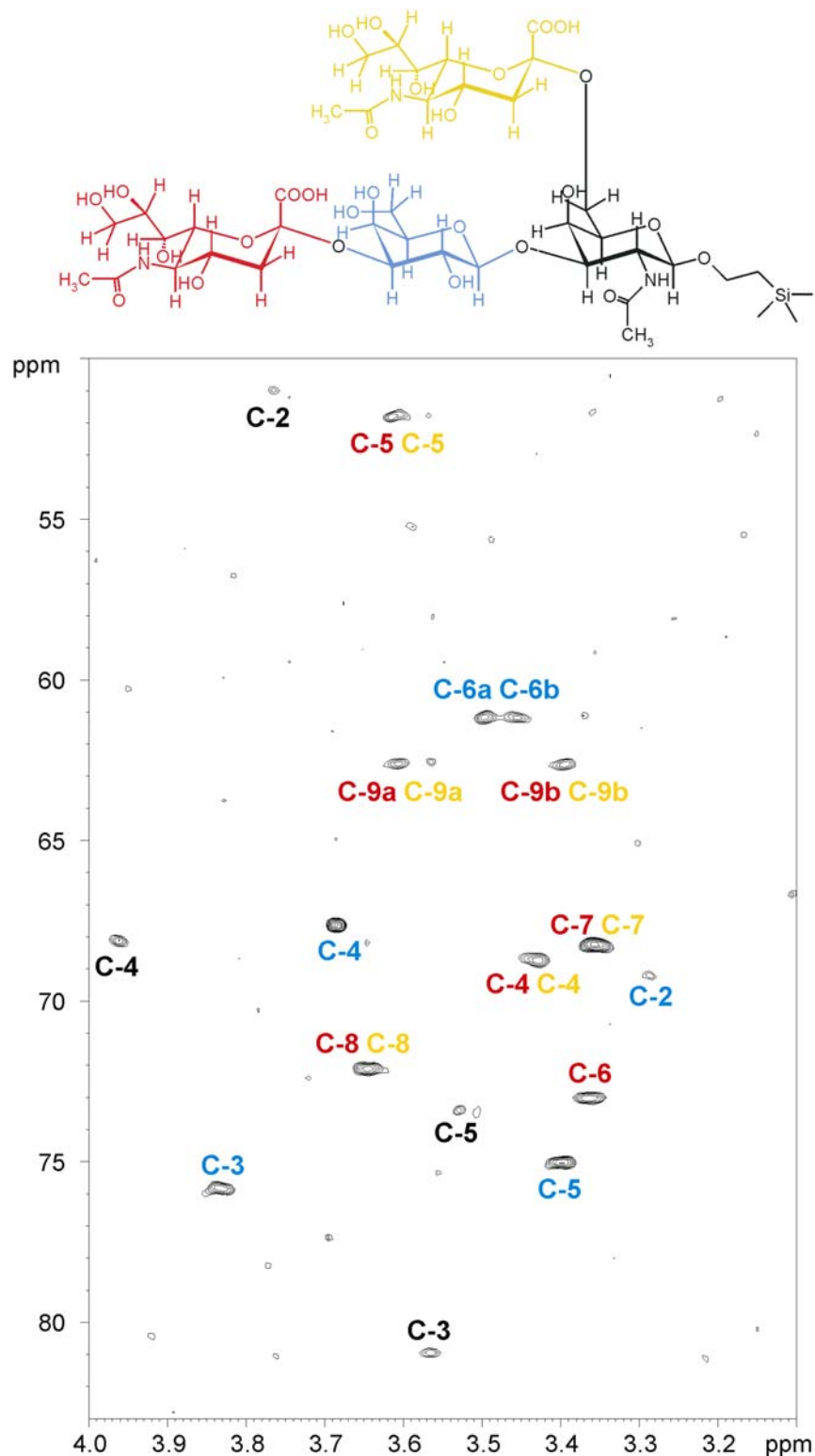


Abbildung 32: Ausschnitt aus dem STD HSQC von MAG mit dem Tetrasaccharid-Liganden Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc bei 39 fachen Protein-Ligand-Überschuß. Im Spektrum sind die Überlagerungen von Signalen der Sialinsäuren zu sehen. Betroffen sind dabei C-4, C-5, C-7, C-8 und C-9. Rot: 2,3-verknüpfte Sialinsäure, gelb: 2,6-verknüpfte Sialinsäure, blau: Galactose, schwarz, N-Acetylgalactosamin

4.5.1 Bindungsepitope der Trisaccharide

Für die beiden Trisaccharide Sia-2,3-Gal-1,3-Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc wurde die Bestimmung der Bindungsepitope anhand von STD HSQC Spektren durchgeführt. Für den Liganden Sialyllactose wurde die Analyse mit dem 1D Spektrum durchgeführt.

Sialyllactose: Sia-2,3-Gal-1,4-Glc

Für Sialyllactose wurde kein STD HSQC aufgenommen, da ein Anomerengemisch vorlag, welches das Spektrum aufgrund einer Überlagerung der Signale verkompliziert hätte. Da zwei verschiedene Ligandmoleküle (α -Anomer und β -Anomer) in der Probe vorlagen, hätte für viele Protonen, die die gleiche Verschiebung für beide Anomere aufweisen, nur die Summe ermittelt werden und keine Differenzierung zwischen den Anomeren vorgenommen werden können. Daher wurde für die Sialyllactose eine Auswertung des Bindungsepitopes anhand eines 1D STD Spektrums vorgenommen.

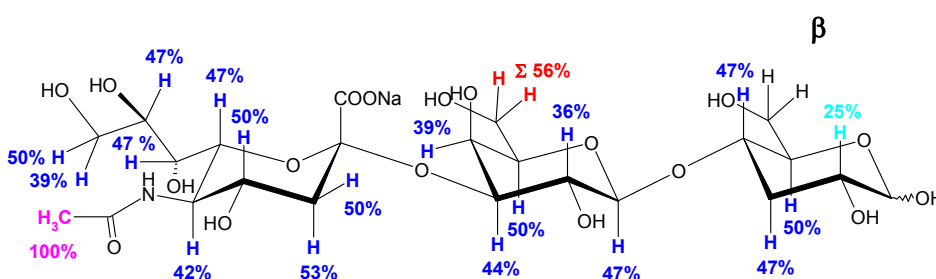


Abbildung 33: Bindungsepitop von Sialyllactose, in cyan sind die STD Werte von 1-30 %, in blau von 31-60 %, in magenta von 61-100 % und in rot, die Signale, für die aufgrund von Überlagerung nur die Summe bestimmt werden konnte. In schwarz sind Protonen dargestellt, für die aufgrund von Signal-Überlagerung keine STD Werte bestimmt werden konnten. Für die reduzierende Glucose konnten nur die Werte für das β -Saccharid bestimmt werden. 4.5 nmol MAG (c = 9 μ M) mit einem 149 fachen Überschuss an Sialyllactose. c(Sialyllactose) = 2.68 mM.

Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 285 K mit 4096 scans und 32k Datenpunkten aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 9 μ M und die Ligandenkonzentration 2.68 mM. Die Stärke des Gauss Pulses ($\gamma B_1/2\pi$) betrug 43.67 Hz. Insgesamt ergibt sich für Abbildung 32 ein homogenes Bild für diesen Liganden. Im

Vergleich zu den anderen Trisaccharid-Liganden konzentriert sich die Bindung hier nicht auf die N-Acetylgruppe und die Glycerinseitenkette der Sialinsäure. Stattdessen scheinen sich alle farblich markierten Protonen in einem gleichen Maße an der Bindung zu beteiligen. Da die Überlagerung der Signale in dem *Hump*-Bereich von 3.2 bis 4.0 ppm jedoch recht groß war, war die Interpretation der STD Werte nicht einfach und daher sind die Werte vermutlich fehlerbehaftet.

Sia-2,3-Gal-1,3-Gal

Das STD HSQC Spektrum wurde bei einer Temperatur von 285 K mit 96 scans und 4096 Datenpunkten in der ^1H -Domäne und 512 Punkten in der ^{13}C -Domäne aufgenommen, so dass sich 256 Inkremente jeweils für das *on* und *off-resonance* Spektrum ergaben. Die Proteinkonzentration betrug 8 μM und die Ligandenkonzentration 2.4 mM. Der selektive Puls ($\gamma\text{B}_1/2\pi$) war 135.18 Hz stark. Beide Spektren wurden mit einer linienverbreitenden Exponentialfunktion von 5 Hz in der ^1H -Domäne und 35 Hz in der ^{13}C -Domäne prozessiert und identisch phasenkorrigiert.

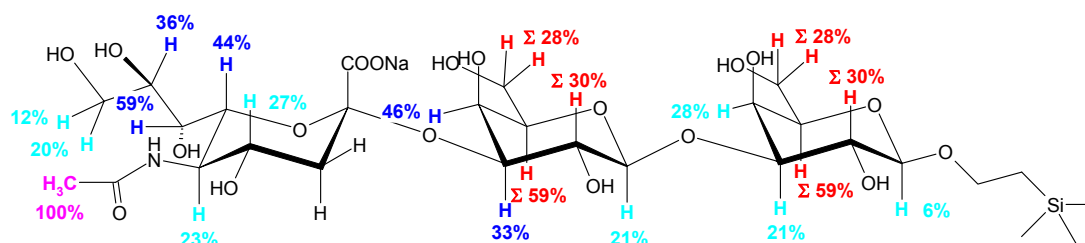


Abbildung 34: Bindungsepitop von Sia-2,3-Gal-1,3-Gal, in cyan sind die STD Werte von 1-30 %, in blau von 31-60 %, in magenta von 61-100 % und in rot, die Signale, die aufgrund von Überlagerung nicht zugeordnet werden konnten. So lagen die Signale von H-2, H-5 und H-6a bzw. H6b der mittleren und der reduzierenden Galactose direkt übereinander. Es konnte daher nur die Summe der Signale bestimmt werden. In schwarz sind Protonen dargestellt, die keinen STD-Effekt zeigten. 4 nmol MAG ($c = 8 \mu\text{M}$) mit einem 150 fachen Überschuss an Sia-2,3-Gal-1,3-Gal. $c(\text{Sia-2,3-Gal-1,3-Gal}) = 2.4 \text{ mM}$.

Abbildung 34 zeigt das Bindungsepitop von Sia-2,3-Gal-1,3-Gal. In rot sind Protonen gekennzeichnet, die sich aufgrund einer ähnlichen Verschiebung überlagern. Für sie wurde die Summe angegeben. Dabei handelt es sich immer um die Summe für ein bestimmtes Proton von den beiden Sacchariden, z.B. um H-2 der beiden Galactosen.

Bei allen untersuchten Trisaccharid-Liganden wurde festgestellt, dass die N-Acetylgruppe der Sialinsäure den stärksten STD-Effekt zeigt. Auch insgesamt scheint sich die Sialinsäure stark an der Bindung zu beteiligen. So zeigen die Protonen H-6 bis H-8 der Glycerinseitenkette noch eine mittlere Intensität. Auch die mittlere Galactose scheint sich noch mit H-3 und H-4 an der Bindung zu beteiligen, während die reduzierende Galactose nur noch schwache Bindung zeigt. Eine weiterführende Analyse und ein Vergleich mit den anderen Liganden sind im Kapitel 4.5.3 zu finden.

Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc

Für die Bestimmung des Bindungsepitopes wurde ein STD HSQC Spektrum aufgenommen. Die Temperatur betrug 285 K, die Scanzahl 208 bei 4096 Datenpunkten in der ^1H -Domäne und 256 Punkten in der ^{13}C -Domäne d.h. jeweils 128 für *on*- und *off-resonance* aufgenommen. Die Proteinkonzentration lag bei 8 μM und die Ligandenkonzentration bei 1.92 mM. Die Stärke des STD Pulses ($\gamma B_1/2\pi$) betrug 125.52 Hz. *Off*- und *on-resonance* Spektren wurden beide mit einer linienverbreiternden Exponentialfunktion von 5 Hz in der ^1H -Domäne und 70 Hz in der ^{13}C -Domäne prozessiert und anschließend identisch phasenkorrigiert.

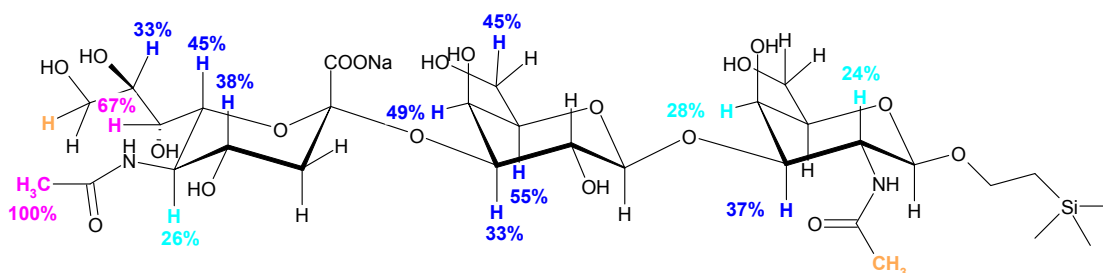


Abbildung 35: Bindungsepitop von Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc, in cyan sind die STD Werte von 1-30 %, in blau von 31-60 %, in magenta von 61-100 % und in orange, die Signale, die aufgrund von schlechten Linienformen nicht analysiert werden konnten. In schwarz sind Protonen dargestellt, die keinen STD-Effekt zeigten. 4 nmol MAG ($c = 8 \mu\text{M}$) mit einem 120 fachen Überschuss an Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc. $c(\text{Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc}) = 1.92 \text{ mM}$.

In Abbildung 35 ist das Bindungsepitop von Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc gezeigt. Zusätzlich sind noch die N-Acetylgruppe des GalNAc und ein H-9 Proton der Sialinsäure in orange

gekennzeichnet (diese Signale konnten nicht interpretiert werden, da ihre Linienform schlecht war, und damit kein Lorentzkurvenfit durchgeführt werden konnte). Diese Signale zeigten STD Intensität, aber der Wert ließ sich nicht quantifizieren.

Auch bei diesem Liganden zeigt die N-Acetylgruppe der Sialinsäure den stärksten STD-Effekt. Weitere starke Effekte zeigen noch H-4, H-6, H-7 und H-8 der Sialinsäure und H-3, H-4, H-5 und H-6a der mittleren Galactose. Die reduzierende Galactose zeigte nur einen stärkeren STD-Effekt auf H-3. Ein Vergleich mit den anderen Liganden und eine weiterführende Analyse sind im Kapitel 4.5.3 zu finden.

4.5.2 Bindungsepitope der Tetrasaccharide

Analog zu den Trisacchariden wurden auch für die Tetrasaccharide STD HSQC Spektren nach dem Abschluss der Titration aufgenommen und ausgewertet.

Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc

Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 285 K mit 112 scans und 4096 Datenpunkten in der ^1H -Domäne und 512 Punkten in der ^{13}C -Domäne d.h. jeweils 256 für *on-* und *off-resonance* aufgenommen. Die Proteinkonzentration lag bei 14.9 μM und die Ligandenkonzentration mit einem 39 fachen Überschuss bei 1.17 mM. Die Stärke des Gauss Pulses ($\gamma B_1/2\pi$) betrug 133.89 Hz. Für die Prozessierung wurden beide Spektren einer linienverbreiternden Exponentialfunktion von 1 Hz in der ^1H -Domäne und 35 Hz in der ^{13}C -Domäne multipliziert. Abbildung 36 zeigt das Bindungsepitop von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc. Zusätzlich sind noch die H-9 Protonen der Sialinsäuren in rot gekennzeichnet. Diese Signale konnten aufgrund von Überlagerungen und schlechten Linienformen nicht interpretiert werden.

Auch bei diesem Liganden zeigt die N-Acetylgruppe der 2,3-verknüpften Sialinsäure den stärksten STD-Effekt. Weitere starke Effekte zeigen sich noch bei H-6 und H-7 der 2,3-verknüpften Sialinsäure und H-4 und H-5 der mittleren Galactose. Die reduzierende Galactose und die 2,6-verknüpfte Sialinsäure beteiligen sich nur wenig an der Bindung. Eine

Integration, die *sum over ellipse* Methode ausgewichen. Um die beiden Verfahren zu vergleichen wurden Signale in einem Testspektrum integriert. Hierbei zeigte sich, dass sich die Integralwerte für beide Methoden um ca. 35 - 60 % unterscheiden, wobei die Werte bei dem *sum over ellipse* Verfahren immer geringer waren als beim Lorentzfit-Verfahren.

Auch hier zeigt die N-Acetylgruppe der 2,3-verknüpften Sialinsäure den stärksten STD-Effekt, aber aufgrund von starken Überlagerungen war es nicht möglich, die STD Werte für die individuellen Resonanzen zu ermitteln, daher wurde auch hier wieder nur die Summen beider Resonanzen angegeben. Weitere starke Effekte zeigen sich noch bei H-6 und H-7 der Sialinsäure und H-3 und H-4 der mittleren Galactose und H-5 der reduzierenden Galactose. Die 2,6-verknüpfte Sialinsäure beteiligt sich auch bei diesem Liganden wenig an der Bindung und nennenswerte Beiträge ließen sich nur für die Summe der Protonen beider Sialinsäuren ermitteln. Eine weiterführende Analyse und ein Vergleich mit den anderen Liganden sind im Kapitel 4.5.3 zu finden.

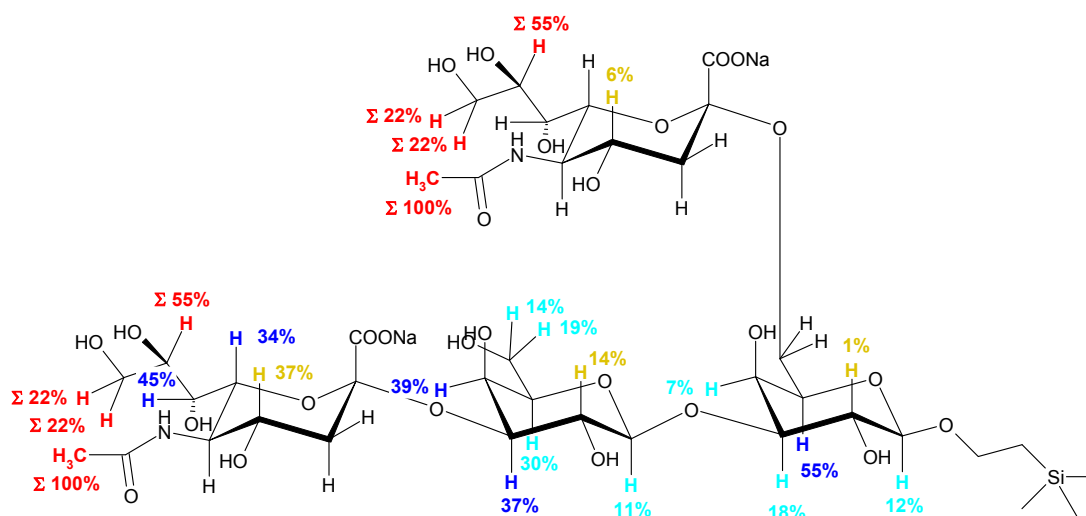


Abbildung 37: Bindungsepitop von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal, in cyan sind die STD Werte von 1-30 %, in blau von 31-60 %, in magenta von 61-100 %, in rot, die Signale, die aufgrund von Überlagerung nicht zugeordnet werden konnten. So lagen die Signale von H-8, H-9a bzw. H9b und die N-Acetylgruppen der beiden Sialinsäuren übereinander. Es konnte daher nur die Summe der Signale bestimmt werden. In gelb wurden die Signale dargestellt, die mit der herkömmlichen Integrationsmethode nicht integriert werden konnten. Daher wurde die *sum over ellipse* Methode hier angewendet. In schwarz sind Protonen dargestellt, die keinen STD-Effekt zeigten. 4 nmol MAG ($c = 6.67 \mu\text{M}$) mit einem 40 fachen Überschuss an Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal. $c(\text{Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal}) = 533 \mu\text{M}$.

4.5.3 Vergleich der Tri- und Tetrasaccharide

Bei einem Vergleich der Bindungsepitope der Trisaccharide Sia-2,3-Gal-1,3 und Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc, ergibt sich insgesamt eine gute Übereinstimmung. Auch wenn zu einigen Protonen keine, oder nur für die Summen der Protonen, Daten erhalten werden konnten, so lieferten die STD-Effekte insgesamt ein konsistentes Bild. Die einzige größere Diskrepanz ergibt sich für H-3 der reduzierenden Galactose bzw. Galactosamin. Im Sia-2,3-Gal-1,3-Gal liegt der STD-Effekt bei 21 % und beim Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc bei 37 %. Allerdings war für die reduzierende Galactose auch ein Unterschied zu erwarten, da die N-Acetylgruppe aufgrund ihres Raumbedarfs die Konformation des Saccharids stören kann. Insgesamt konzentriert sich die Bindung eher auf die Sialinsäure und die mittlere Galactose. Der Schwerpunkt bei der Sialinsäure liegt dabei auf der N-Acetylgruppe, die den stärksten STD-Effekt zeigt. Bei einer Analyse der Kristallstruktur von Sialoadhesin von May *et. al.* wurde festgestellt, dass die N-Acetylgruppe von Sialyllactose einen Kontakt zu Tryptophan 2 ausbildet⁷⁴. Aus einem Homologiemodell des MAG anhand von Sialoadhesin konnte erkannt werden, dass diese Aminosäure im MAG ebenfalls dem Tryptophan 2 entspricht⁸⁹. Diese hohen STD Werte kommen dabei vermutlich durch hydrophobe Interaktionen der Ligandprotonen mit der Proteinoberfläche zustande, aber Experimente mit modifizierten Sialinsäuren zeigten, dass es vermutlich zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung von der N-Acetylgruppe an C5 der Sialinsäure zum Protein (N-terminale Teile des A- und G-Strangs) gibt^{89,90}. Wichtig für die Bindung der Sialinsäure an das MAG ist auch die Glycerinseitenkette. Collins *et. al.* zeigten, dass die Bindung einer um C8 und C9 verkürzten Sialinsäure drastisch reduziert ist^{87,91}. Es ließ sich jedoch nicht aus diesen Experimenten schließen, ob die Hydroxylgruppen an C8 und C9 oder hydrophobe Interaktionen dieser Kette wichtig sind. Im Sialoadhesin bilden die beiden Hydroxylgruppen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem *Backbone* des Proteins (G-Strang) bei Leucin 107 aus. Zusätzlich ist beim Sialoadhesin die Glycerinseitenkette über Tryptophan 106 platziert, womit van der Waals Kontakte möglich sind⁷⁴.

Bei der mittleren Galactose konzentriert sich die STD Antwort in dem Bereich von H-3 bis H-5 mit wenig Beteiligung der anderen Protonen. Die reduzierende Galactose scheint sich dagegen wenig, oder nicht an der Bindung zu beteiligen, wobei die Ausnahme das erwähnte H-3 bei Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc ist, das eine mittelstarke Antwort zeigt. Insgesamt lässt sich

für die Trisaccharide schließen, dass es sehr wahrscheinlich ist, dass beide Moleküle an die gleiche Stelle im MAG binden und ähnliche Bindungsmodi einnehmen.

Bei einem Vergleich der beiden Tetrasaccharide zeigt sich, ähnlich wie bei den beiden Trisacchariden, eine gute Übereinstimmung der Bindungsepitope. Die N-Acetylgruppe der 2,3-verknüpften Sialinsäure zeigt hier ebenfalls den stärksten Effekt. Weitere Schwerpunkte liegen auf H-6 und H-7 der 2,3-verknüpften Sialinsäure und H-3 bis H-5 der mittleren Galactose. Beim Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal liegt weiterhin ein starker Effekt auf H-5 der reduzierenden Galactose. Dies ist vermutlich ein Hinweis darauf, dass die reduzierenden Saccharide beider Liganden etwas anders orientiert sind, wie dies auch schon bei den Trisacchariden der Fall gewesen ist. Weitere größere Diskrepanzen der STD Daten sind jedoch nicht sichtbar, so dass angenommen werden kann, dass auch die beiden Tetrasaccharide einen ähnlichen Bindungsmodus besitzen.

Bei einem Vergleich der Tetrasaccharid-Bindungsepitope mit denen der Trisaccharide zeigt sich eine insgesamt reduzierte Bindungsbeteiligung der Tetrasaccharidprotonen gegenüber der N-Acetylgruppe der 2,3-verknüpften Sialinsäure. Das generelle Muster für die STD Intensitäten ist jedoch bei den Tetrasacchariden und Trisacchariden ähnlich. So zeigen beide eine mittelstarke Bindung der H-6 und H-7 Protonen der 2,3-verknüpften Sialinsäuren. H-8 scheint sich bei Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc hingegen nur noch wenig an der Bindung zu beteiligen, während dies für das gleiche Proton von Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal nicht ermittelt werden konnte, weil der STD Wert nur in der Summe vorhanden ist. Bei den Trisacchariden ist die STD-Antwort bei H-8 deutlich höher. Bei der mittleren Galactose zeigen alle untersuchten Liganden eine Bindungsbeteiligung im Bereich von H-3 bis H-5, während die reduzierende Galactose bei allen Liganden wenig beteiligt ist. Auch wenn das generelle Intensitätsmuster beim Wechsel von Trisacchariden auf Tetrasaccharide erhalten bleibt, zeigt sich eine insgesamt erniedrigte Bindung in diesen Bereichen. Daraus lässt sich schließen, dass die Tetrasaccharide einen etwas anderen Bindungsmodus einnehmen als die Trisaccharide. Vermutlich handelt es sich jedoch nicht um eine gravierende Umorientierung, da die wesentlichen Kontaktstellen im Bindungsepitop erhalten bleiben, wenn auch mit geringerer Intensität.

Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass das Molekül zwischen den Salzbrücken von der 2,3 Sialinsäure-Carboxylgruppe mit Arg 118 und dem 2,6 Sialinsäure-Carboxylat mit Lys 67 des MAG verankert ist, und diese Salzbrücken zu einem großen Teil

für die Affinität verantwortlich sind. Insgesamt scheinen die Aussagen des Homologiemodells bezüglich einer ionischen Interaktion der Carboxylgruppe der 2,6-verknüpften Sialinsäure mit dem Protein zu den STD Daten zu passen. Da die Tetrasaccharide eine erhöhte Bindungsaffinität zeigen, aber die Intensität der Bindung der einzelnen Protonen im Vergleich zu den Trisacchariden abnahm, ist es möglich dass die bessere Bindungsaffinität auf einem Effekt beruht, der durch STD NMR nicht verfolgt werden kann. Da die Carboxylgruppe kein Proton besitzt, kann sie im NMR Spektrum nicht beobachtet werden und es kann daher nur ein indirekter Beweis für eine Interaktion erbracht werden. Weitere Informationen können über Transfer NOESY Experimente gewonnen werden, die Daten zu der Konformation der Liganden in der Bindungstasche liefern würden.

Die Abbildungen zu den Bindungsepitopen enthalten nur die Daten, die aus den STD HSQC Spektren ermittelt wurden. Ein Vergleich mit den 1D Spektren zeigt jedoch, dass die anomeren Protonen der Galactosen und die H-3a und H-3e Protonen der Sialinsäuren einen STD-Effekt zeigen. Um diese Informationen zu ergänzen, sind sie in Tabelle 2 dargestellt. Der Grund für die niedrige Intensität der Resonanzen dieser Protonen im STD HSQC liegt in den $^1J_{C,H}$ Kopplungskonstanten. Diese Kopplungskonstanten sind sehr wichtig für HSQC Experimente, da sie die Signalintensität mitbestimmen. Daher kann mit einem HSQC Experiment immer nur ein bestimmter Kopplungskonstantenbereich aufgenommen werden. Bei den Experimenten in dieser Arbeit wurde $^1J_{C,H}$ immer auf einen Standardwert von 145 Hz gesetzt, aber die anomeren Protonen ($^1J_{C,H} \approx 170$ Hz) und die H-3a und H-3e der Sialinsäuren ($^1J_{C,H} \approx 128$ Hz) haben Kopplungskonstanten, die stark von diesem Standardwert abweichen. Da die Aufnahme von STD HSQC Spektren sehr zeitaufwändig ist, wurde darauf verzichtet, für jeden Liganden drei dieser Spektren mit unterschiedlichen Kopplungskonstanten aufzunehmen. Vergleiche der Integrale aus den HSQC Spektren mit denen aus den 1D Spektren (siehe Tabelle 2) zeigen eine annehmbare Übereinstimmung, und daher wurden die STD Werte der oben benannten Protonen aus den 1D STD Spektren bezogen.

Tabelle 2: STD Werte für interpretierbare Protonen aus 1D STD Spektren. Lac = S-Milchsäure, dDGal = 1,2-DidesoxyGalactose.

	Protonen	Sia	Gal	Gal GalNAc dDGal	2,6 Sia Lac
Sia-Gal-Gal	H-1	-	39	20	-
Sia-Gal-GalNAc		-	49	32	-
Sia-Gal-(Sia)GalNAc		-	55	44	-
Sia-Gal-(Sia)Gal		-	53	23	-
Sia-Gal-(Lac)dDGal		-	22	-	-
Sia-Gal-Gal	H-3a	23	-	-	-
Sia-Gal-GalNAc		27	-	-	-
Sia-Gal-(Sia)GalNAc		36	-	-	17
Sia-Gal-(Sia)Gal		37	-	-	11
Sia-Gal-(Lac)dDGal		16	-	-	-
Sia-Gal-Gal	H-3e	25	-	-	-
Sia-Gal-GalNAc		39	-	-	-
Sia-Gal-(Sia)GalNAc		38	-	-	20
Sia-Gal-(Sia)Gal		31	-	-	11
Sia-Gal-(Lac)dDGal		14	-	-	-
Sia-Gal-Gal	H-4	-	47	29	-
Sia-Gal-GalNAc		-	64	39	-
Sia-Gal-(Sia)GalNAc		-	68	47	-
Sia-Gal-(Sia)Gal		-	53	37	-
Sia-Gal-(Lac)dDGal		-	33	-	-
Sia-Gal-Gal	NHAc Me	100	-	-	-
Sia-Gal-GalNAc		100	-	32	-
Sia-Gal-(Sia)GalNAc		100	-	12	39
Sia-Gal-(Sia)Gal		Σ 100	-	Σ 100	-
Sia-Gal-(Lac)dDGal		100	-	-	-

Ein weiteres großes Problem beim Umgang mit STD HSQC Spektren war das niedrige Signal zu Rauschverhältnis (S/N). Es wurde ein 700 MHz Spektrometer mit cryogenem Probenkopf verwendet und in der Regel für drei Tage gemessen, wobei das S/N-Verhältnis normalerweise bei 3-4 für die meisten Signale lag. Daher ist es möglich, dass schwache Signale durch das Rauschen hohe Integralfehler besitzen. Durch die Differenzbildung kam es außerdem häufiger zu schlechten Linienformen, so dass die Interpretation dieser Signale verkompliziert wurde. Da das S/N-Verhältnis in der Regel schlecht war, wurde dies durch die Wahl eines größeren Linienverbreiterungsfaktors kompensiert. Dies zog jedoch einen Verlust an Auflösung nach sich, so dass in einigen Fällen bei stark überlagerten Signalen nur die Summe der Signale angegeben werden konnte. Der Linienverbreiterungsfaktor wurde daher individuell für jeden Spektrensatz gewählt, je nach dem Bedarf an Auflösung oder besserem S/N-Verhältnis. In einigen Fällen hätte eine Reduzierung dieses Faktors zwar eine Auflösungsverbesserung mit sich gebracht, aber das S/N-Verhältnis wurde in der Regel damit so niedrig, dass Teile der Signale vom Rauschen überdeckt wurden. Da die Linienverbreiterungsfaktoren für die Spektren unterschiedlich sind, können die Bindungsepitope der Liganden nur mit einem gewissen Vorbehalt miteinander verglichen werden. Trotzdem ergab sich eine gute Übereinstimmung.

Die Summen der Signale wurden häufig für die beiden Sialinsäuren der Tetrasaccharide oder für die beiden Galactosen angegeben, wie aus den Abbildungen zu den Bindungsepitopen zu entnehmen ist. Diese Überlagerung von Signalen betraf in der Regel jedoch nicht viele Resonanzen (Siehe Abbildung 32). Im Prinzip gibt es jedoch mehrere Möglichkeiten diese Probleme zu umgehen.

1. Das S/N-Verhältnis erhöhen

- Die einfachste Methode, das S/N-Verhältnis zu erhöhen, ist natürlich eine Steigerung der Probenkonzentration. Da jedoch nur begrenzt Protein und Ligand zur Verfügung stand, war dies zu dem Zeitpunkt nicht möglich.
- Die Messzeit zu verlängern wäre eine andere Möglichkeit, aber da sich das S/N-Verhältnis nur um $\sqrt{2}$ für eine Verdoppelung der Scanzahl erhöht, wäre eine weitere Verlängerung wenig sinnvoll gewesen, da die Messzeit für ein Experiment in der Regel schon drei Tage betrug.

2. Die STD Werte erhöhen

- Um die STD Werte zu erhöhen, wäre es möglich die Intensität des *shaped pulses*, der für STD verwendet wurde, zu erhöhen. Damit wären jedoch auch höhere Artefaktwerte des Liganden verbunden.
- Es wäre weiterhin möglich, den Ligand-Überschuss zu verringern, da der relative STD Wert mit steigendem Überschuss abnimmt (der absolute STD Wert steigt mit ansteigendem Überschuss, da mehr gesättigte Liganden in der Lösung vorliegen, die detektiert werden, aber der relative STD Wert, der sich auf den Anteil der gesättigten Liganden auf die Gesamtmenge bezieht, sinkt mit ansteigendem Überschuss). Aber dies würde ein schlechteres S/N-Verhältnis zur Folge haben. Außerdem würde die Wahrscheinlichkeit für ein *Rebinding* des Liganden steigen. Daher wurde in der Regel bei dem höchsten Überschuss gemessen.
- Eine höhere Temperatur würde einen schnelleren Durchsatz bewirken und damit höhere STD Werte erzeugen. Es müsste jedoch sicher gestellt werden, dass sich das Protein bei diesen Temperaturen stabil verhält.

4.5.4 Evaluation der 2,6-verknüpften Sialinsäure

Um einzuschätzen, in welchem Maß die 2,6-verknüpfte Sialinsäure wichtig ist, sollte von dem Liganden Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal das Bindungsepitop bestimmt werden. Eine Bestimmung des Bindungsepitops des Tetrasaccharids Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc mit der Mutante K67A war nicht möglich, da die STD Antwort viel zu gering war. Aus dem Acrylamidgel konnte ersehen werden (siehe Abbildung 28), dass das Protein intakt ist. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Konformation des Proteins durch die Mutation gestört wurde, so dass eine Bindung nur noch in einem reduzierten Ausmaß oder gar nicht mehr möglich war (siehe Kapitel 4.4.4).

Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal

Aus der Analyse des Bindungsepitops von Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal sollte sich zeigen, ob die Methylgruppe oder das Methinproton der Milchsäure mit dem Protein wechselwirken. Wenn dies ausgeschlossen ist, dann wäre eine ionische Interaktion der Carboxylgruppe mit dem Protein möglich und könnte damit für die bessere Bindung der Tetrasaccharide an das MAG verantwortlich sein.

Das STD HSQC Spektrum wurde bei einer Temperatur von 285 K mit 136 scans und 4096 Datenpunkten in der ^1H -Domäne und 256 Punkten in der ^{13}C -Domäne d.h. jeweils 128 Punkte für *on-* und *off-resonance*. Die Proteinkonzentration betrug 20.10 μM und die Ligandenkonzentration 1.61 mM. Der Gauss Puls ($\gamma B_1/2\pi$) war hier 131.39 Hz stark. Beide Spektren wurden mit einer linienverbreiternden Exponentialfunktion von 10 Hz in der ^1H -Domäne und 105 Hz in der ^{13}C -Domäne prozessiert.

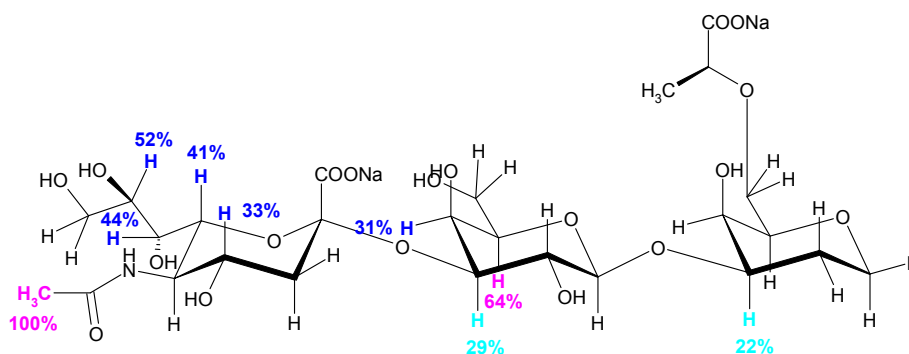


Abbildung 38: Bindungsepitop von Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal, in cyan sind die STD Werte von 1-30 %, in blau von 31-60 %, in magenta von 61-100 %. In schwarz sind Protonen dargestellt, die keinen STD-Effekt zeigten. 15 nmol MAG ($c = 20.10 \mu\text{M}$) mit einem 40 fachen Überschuss an Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal. $c(\text{Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal}) = 1.61 \text{ mM}$.

Abbildung 38 zeigt das Bindungsepitop von Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal. Der größte Effekt liegt bei diesem Liganden, ähnlich wie bei den Tetrasacchariden, auf der N-Acetylgruppe und H-6 – H-8 der Glycerinseitenkette der Sialinsäure. Mittelstarke Kontakte zeigen auch H-3 und H-4 der mittleren Galactose. Weiterhin zeigt auch H-5 eine starke Bindung an das Protein. Die Dideoxygalactose zeigt hingegen nur einen einzigen Kontakt bei H-3. Bei der Milchsäure sind weder die Methylgruppe noch das Methinproton an der Bindung beteiligt. Es scheint überraschend, dass

sich so wenig Protonen an der Bindung beteiligen, aber da auch hier trotz der hohen Probenkonzentration das S/N-Verhältnis sehr niedrig war, wurden vermutlich schwache Kontakte vom Rauschen dominiert.

Im Vergleich zu den beiden Tetrasacchariden ergibt sich eine gute Übereinstimmung des Bindungsepitops dieses Liganden. Neben den oben erwähnten dominanten Kontakten kann auch der mittelstarke Kontakt von H-4 der Sialinsäure beobachtet werden. Interessanterweise zeigt H-8 bei diesem Liganden wieder einen stärkeren Kontakt zum Protein. Dies stellt eine Abweichung zum Bindungsepitop der Tetrasaccharide dar, da dieser Kontakt bei den Trisacchariden stärker als bei den Tetrasacchariden war.

Die schwachen Kontakte bei den beiden Tetrasacchariden sind bei diesem Liganden nicht vorhanden, aber dies kann wie oben beschrieben an dem schlechten S/N-Verhältnis liegen. Eine größere Diskrepanz ist bei dem H-5 der mittleren Galactose zu beobachten. Bei den beiden Tetrasacchariden war dieser Kontakt mit 30 bzw. 33 % nur mittelstark, während er bei diesem Liganden mit 64 % der zweitstärkste Kontakt war. Eine weitere Diskrepanz zeigt sich für H-5 der Didesoxygalactose. Bei dem Tetrasaccharid Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal zeigte sich für dieses Proton ein starker Wert von 55 %. Für Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc lag dieser Wert jedoch bei nur 14 %. Diese Unterschiede hängen vermutlich mit einer anderen Orientierung in der Bindungstasche zusammen. In Tabelle 2 sind die 1D STD Daten zusammengefasst. Nur die Werte für H-4 der Galactose sind bei beiden Aufstellungen vorhanden und hier stimmen die Werte gut überein.

Interessant bei diesem Molekül ist auch das Fehlen jeden Kontaktes der Milchsäure mit dem Protein. Eine Interaktion dieses Molekülteils mit der Proteinoberfläche ist daher fragwürdig. Insgesamt zeigt sich über das Bindungsepitop, dass Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal einen ähnlichen Bindungsmodus wie die Tetrasaccharide einnimmt. Auch hier liegt der Schwerpunkt der Bindung auf der N-Acetylgruppe und der Glycerinseitenkette der Sialinsäure und dem Bereich H-3 bis H-5 der Galactose, während sich die Didesoxygalactose und die Milchsäure kaum an der Bindung beteiligen. Zusammengenommen mit dem K_D -Wert dieser Verbindung, der mit den Werten der Tetrasaccharide ähnlich ist, kann geschlossen werden, dass eine Interaktion des Carboxylates der 2,6 verknüpften Sialinsäure der Tetrasaccharide mit dem Protein möglich ist. Um eine ionische Interaktion zu bestätigen sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig. Alternativ könnte dieser Effekt auch auf einer Änderung der Bindungskonformation beruhen.

4.5.5 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid

Da die Resonanzen dieses Liganden gut dispergiert sind, wurde darauf verzichtet, ein STD HSQC Spektrum aufzunehmen. Für die Bestimmung des Bindungssepitopes wurde ein 1D STD Spektrum mit Watergate für eine Wasserunterdrückung und einem Spinlock von 10 ms für die Unterdrückung breiter Proteinresonanzen aufgenommen. Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 285 K mit 4096 scans und 32k Datenpunkten aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 5.6 μM und die Ligandenkonzentration 560 μM . Die Stärke des STD Gauss Pulses ($\gamma B_1/2\pi$) betrug 137.83 Hz. Das Lösungsmittel war ein $\text{D}_2\text{O}/\text{PBS}$ Puffer mit 20 % Trifluorethanol-d3 (TFE). Abbildung 39 zeigt das STD- und Referenzspektrum von 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid.

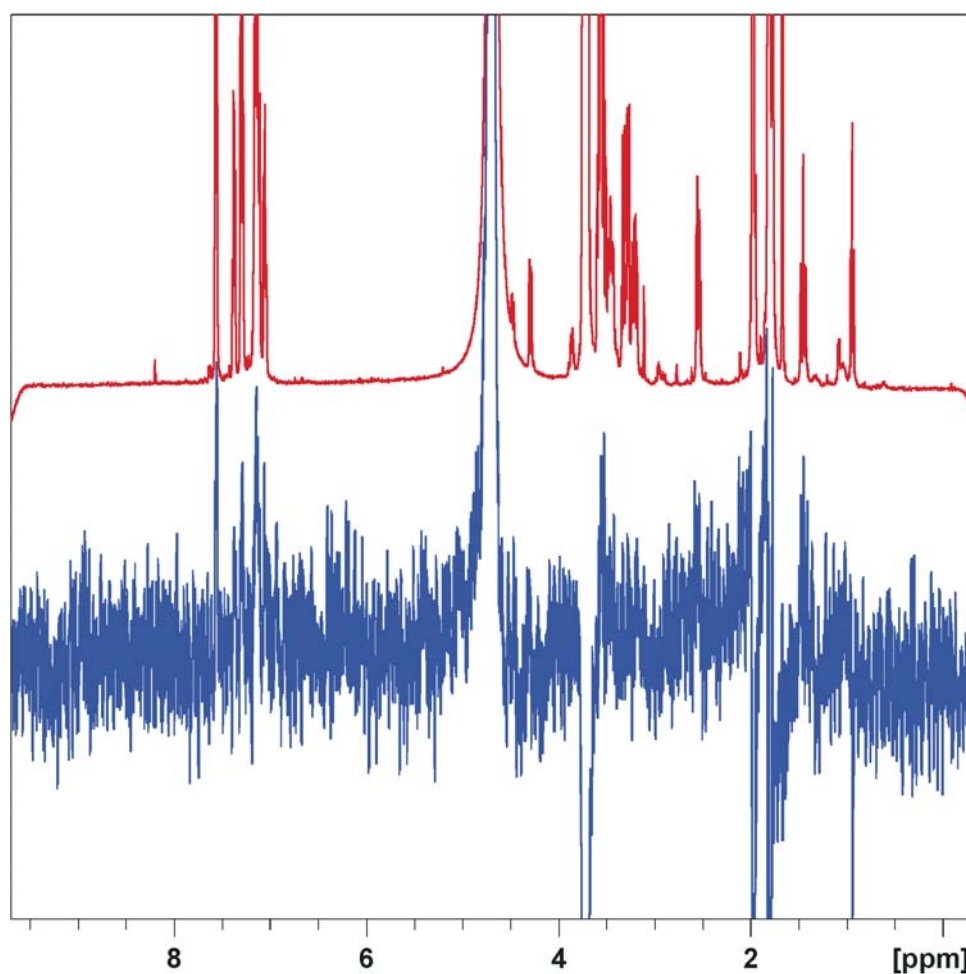


Abbildung 39: STD- (unten, blau) und Referenzspektrum (oben, rot) des 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosids. Die TFE Signale bei 3.8 und 1.9 ppm erscheinen im STD Spektrum negativ.

Abbildung 40 zeigt das Bindungsepitop dieses Liganden. Mehrere Faktoren fallen bei diesem Liganden auf. Im Vergleich zu den Trisacchariden und den Tetrasacchariden zeigt sich hier ein vollkommen anderes Bild. Das intensivste Signal wird hier nicht von der N-Acetylgruppe sondern vom H-3a der Sialinsäure erzeugt. Weiterhin zeigen nahezu alle Protonen einen hohen STD Wert. Neben H-3a zeigen auch H-3e, H-4, H-6 und H-9a einen starken Effekt. Bei den Tri- und Tetrasacchariden lag der Schwerpunkt der Bindung eher bei der N-Acetylgruppe und bei der Glycerinseitenkette.

Bei diesem Liganden sind die aromatischen Ringprotonen ebenfalls stark an der Bindung beteiligt. Die Benzamidoprotonen zeigen eine mittelstarke Bindung, und die Werte für die ortho- und meta-Protonen sind paarweise als Summe angegeben, weil diese Protonen äquivalent sind. Bei der Benzylgruppe beteiligen sich dagegen nur die meta-Protonen an der Bindung.

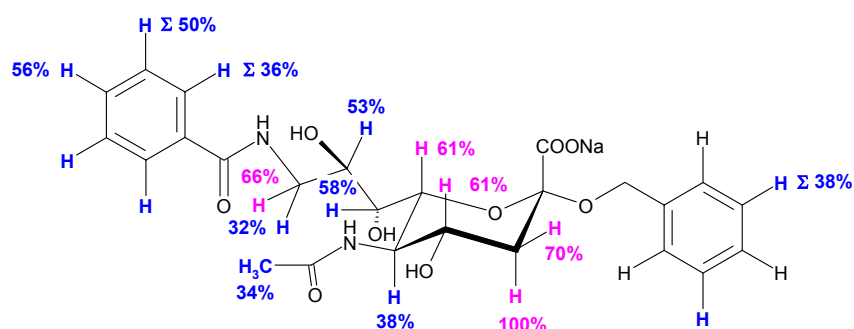


Abbildung 40: Bindungsepitop von 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid. In orange sind die STD Werte von 31-60 %, in rot von 61-100 %, in schwarz sind Protonen dargestellt, die keinen STD-Effekt zeigten. Diese Werte wurden aus einem 1D STD Spektrum mit Watergate zur Wasserunterdrückung und einem Spinlock von 10 ms zur Unterdrückung breiter Proteinresonanzen ermittelt. 3.02 nmol MAG ($c = 5.6 \mu\text{M}$) mit einem 50 fachen Überschuss an 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid. $c(2\text{-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid}) = 560 \mu\text{M}$.

Dieser Ligand zeigte von allen bearbeiteten Liganden den niedrigsten K_D -Wert. Aber wie aus dem Bindungsepitop ersehen werden kann, liegt das nicht daran, dass nur die Benzamido- und die Benzylgruppe stark an das Protein binden. Durch die Addition der aromatischen Gruppen nimmt vielmehr die Sialinsäure einen anderen Bindungsmodus ein, wodurch sie sich stärker an der Bindung beteiligen kann. Da die Neuraminosid-Probe jedoch TFE enthielt, ist es möglich, dass dieses Lösungsmittel die Bindungsdaten beeinflusst. Da aber der Anteil mit 20 % nicht sehr hoch ist, sollte ein Vergleich mit den Bindungsdaten der Tri- und

Tetrasaccharide unter Vorbehalt möglich sein. Es ist jedoch auch möglich, dass dieser Ligand an einer anderen Stelle in der Bindungstasche oder aber in einem vollkommen anderen Bereich des Proteins bindet. Wettbewerbsversuche sollten hierüber Auskunft geben.

Ein Problem bei dem Umgang mit diesem Liganden war die schlechte Qualität der Spektren (siehe Abbildung 39). Die Signale, die vom TFE stammten, verkomplizierten das Spektrum. Obwohl sie nicht direkt mit den Signalen des Liganden überlagerten, lagen sie doch im gleichen Bereich und erzeugten Phasenfehler. Dies lag vermutlich an der sehr langen Relaxationszeit des TFE. Es wurden zwar die Relaxationsdelays bis zu 10 s verlängert, aber dies hatte kaum Einfluss auf die Phasenfehler im Spektrum. Dieser *delay* müsste sehr viel länger sein, um eine vollständige Relaxation des TFE zu bewirken. Ein anderes Problem waren die schlechten Linienformen und das niedrige S/N-Verhältnis. Um bessere Spektren zu erhalten, sollte die Ligandkonzentration erhöht werden und es sollten andere Lösungsmittel zur Unterdrückung der Aggregation getestet werden. Dafür müsste jedoch die Stabilität des Proteins unter diesen Bedingungen gewährleistet sein.

4.5.6 Structure Activity Relationship (SAR)

Aus den vorliegenden STD Daten lassen sich gewisse Rückschlüsse auf eine Abhängigkeit von Struktur und Bindungseigenschaften ziehen. So zeigte sich, dass die N-Acetylgruppe an dem reduzierenden Galactosamin im Gegensatz zu der Hydroxylgruppe bei der Galactose bei den Tri- und Tetrasacchariden hinderlich für die Bindung ist. Positiv auf die Bindung wirkte sich hingegen die 2,6-verknüpfte Sialinsäure an der reduzierenden Galactose bzw. Galactosamin aus. Bei einem Vergleich der Tetrasaccharide mit Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal zeigte sich, dass dieses Derivat den gleichen K_D -Wert aufwies. Da die Bindungsepitope einen ähnlichen Bindungsmodus bei beiden Molekülen zeigten, kann angenommen werden, dass nur ein Teil der 2,6-verknüpften Sialinsäure für die Verbesserung der Bindung bei den Tetrasacchariden zuständig ist, und nicht die ganze Sialinsäure. Da außerdem die Methylgruppe und das Methinproton der Milchsäure keine STD Werte zeigten und somit nicht an die Proteinoberfläche banden, ist es möglich dass die negative Ladung der Carboxylgruppe mit dem Protein interagiert.

Für den Liganden 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid ergab sich der geringste K_D -Wert. Ohne weitere Daten lässt sich jedoch nicht erkennen, ob dies auf einer hydrophoben Interaktion der Aromaten mit der Proteinoberfläche beruht, obwohl dies recht wahrscheinlich ist.

4.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR PRÄPARATION VON LIPOSOMEN

Ganglioside, die natürlichen Liganden von MAG, sind amphiphile Moleküle. Sie besitzen einen hydrophilen Kohlenhydratteil und einen hydrophoben Ceramidschwanz. Ihre monodisperse Löslichkeit in Wasser ist daher sehr gering. Um die Bindung von Gangliosiden, wie GT1b, an MAG zu analysieren, sollten Liposomen präpariert werden, in die die Ganglioside mit ihrem Ceramidschwanz eingebettet werden sollten. Im optimalen Fall sollten dann STD oder Biacore Messungen durchgeführt werden, um die Interaktionen mit MAG zu untersuchen.

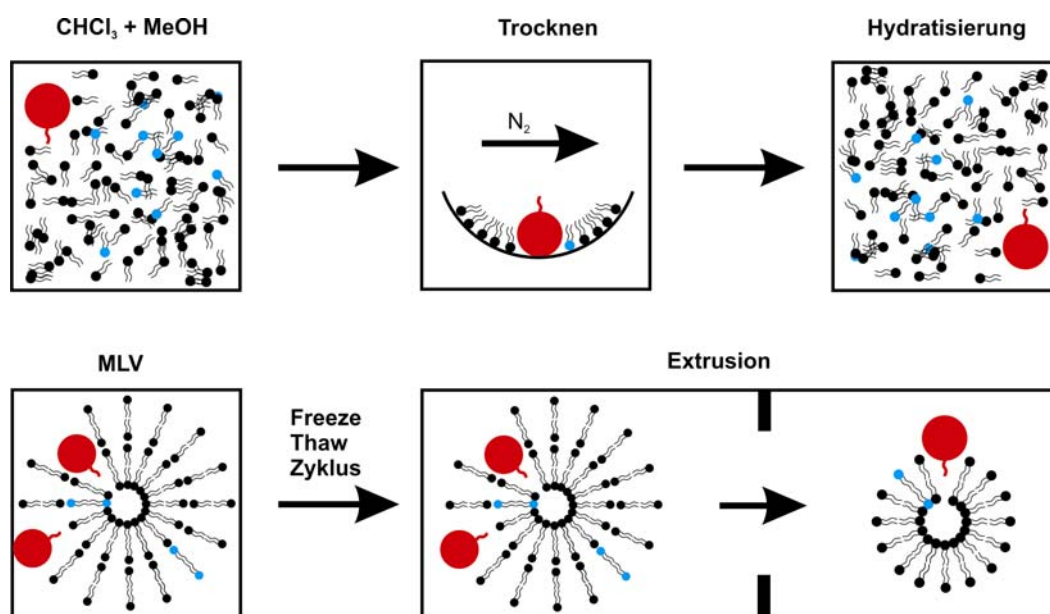


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Liposomenpräparation. In schwarz ist das DMPC, in blau das DMPG und in rot das Gangliosid dargestellt. Für Bindungsstudien ist nur die Hälfte des Gangliosides zugänglich, da die andere Hälfte auf der inneren Seite der Membran eingebaut ist. In der Grafik sind die Ganglioside aus Übersichtsgründen nur auf der äußeren Membran dargestellt.

Abbildung 41 zeigt eine schematische Darstellung für die Liposomenpräparation. Die Liposomen sollten aus den Lipiden 1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-phosphocholin (DMPC) und 2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac(1-glycerol)-Natriumsalz (DMPG) mit einem geringen prozentualen Anteil von GT1b produziert werden. Dafür wurden die Lipide mit dem Gangliosid in Chloroform und Methanol aufgelöst, um eine homogene Mischung zu erhalten. Das Lösungsmittel wurde durch einen Stickstoffstrom entfernt, wodurch ein Lipidfilm an der

Wand des Gefäßes erzeugt wurde, der im nächsten Schritt hydratisiert wurde. Dabei war es wichtig bei der Präparation der Liposomen für die Hydratisierung über der *gel-liquid crystal transition temperature* der Lipide (ca. 23 °C) zu bleiben. Durch die Hydratisierung bildeten sich undefinierte Aggregate und teilweise multilamellare Vesikel. Im nächsten Schritt wurden die Vesikel zerstört, indem die Lösung mehrere *Freeze-Thaw* Zyklen durchlief⁹². Abschließend erfolgte die Extrudierung durch eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengrößen von 100 nm bei 35° C. Die extrudierte Liposomenlösung, die nur noch unilamellare Vesikel enthalten sollte⁹³, wurde in Ultrazentrifugationseinheiten aufkonzentriert und im NMR Spektrometer vermessen. Zum Vergleich wurde eine Liposomenlösung ohne Gangliosid präpariert und ebenfalls vermessen.

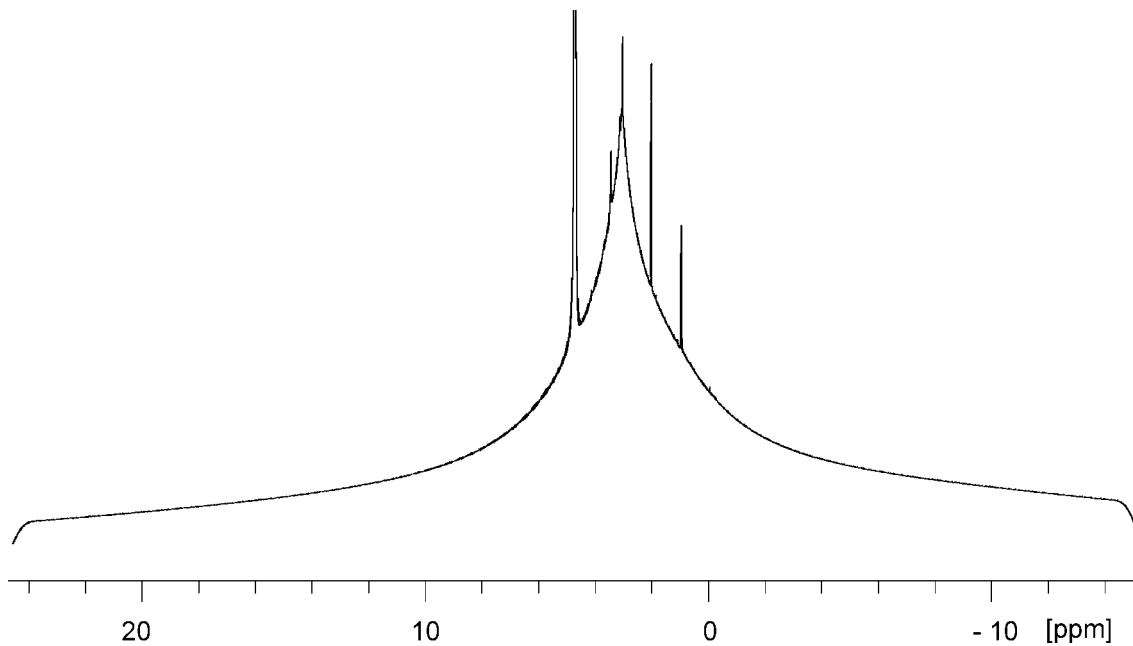


Abbildung 42: ¹H NMR Spektrum von Liposomen ohne GT1b. Charakteristisch ist die Hüllkurve für die Vesikel. Der Fuß des Signals, der sein Maximum bei 3 ppm hat, ist so breit, dass er selbst über einen Bereich von 40 ppm noch zu sehen ist. Die scharfen Signale sind Verunreinigungen.

Die ¹H NMR Spektren zeigten die Liposomenhüllkurve und einige Verunreinigungen, die vermutlich aus dem verwendeten Puffer, oder aus der Lipid-Charge stammten (Abbildung 42). Überraschenderweise konnte jedoch kein Unterschied in den Spektren der beiden Liposomenproben gefunden werden. Erwartet wurde das charakteristische Kohlenhydratmuster zwischen 3 und 4 ppm und die N-Acetylgruppen der Sialinsäuren bei

1.8 ppm. Selbst durch eine Differenzbildung zwischen den Spektren mit und ohne GT1b war es nicht möglich, kohlenhydratspezifische Signale im Spektrum zu erkennen. Obwohl die Proben identisch präpariert wurden, gab es trotzdem noch einige Unterschiede, die besonders im Differenzspektrum sichtbar waren (siehe Abbildung 43). Hier zeigte sich, dass die Signale der Verunreinigungen noch vorhanden sind. Da vermutet wurde, dass dies die Folge einer zu niedrigen Präparationstemperatur sein könnte, wurde bei einem erneuten Ansatz eine höhere Temperatur gewählt (40 °C) und die Präparation beider Proben wiederholt. Durch die höhere Temperatur sollte eine genügende Fluidität der Membran gewährleistet werden.

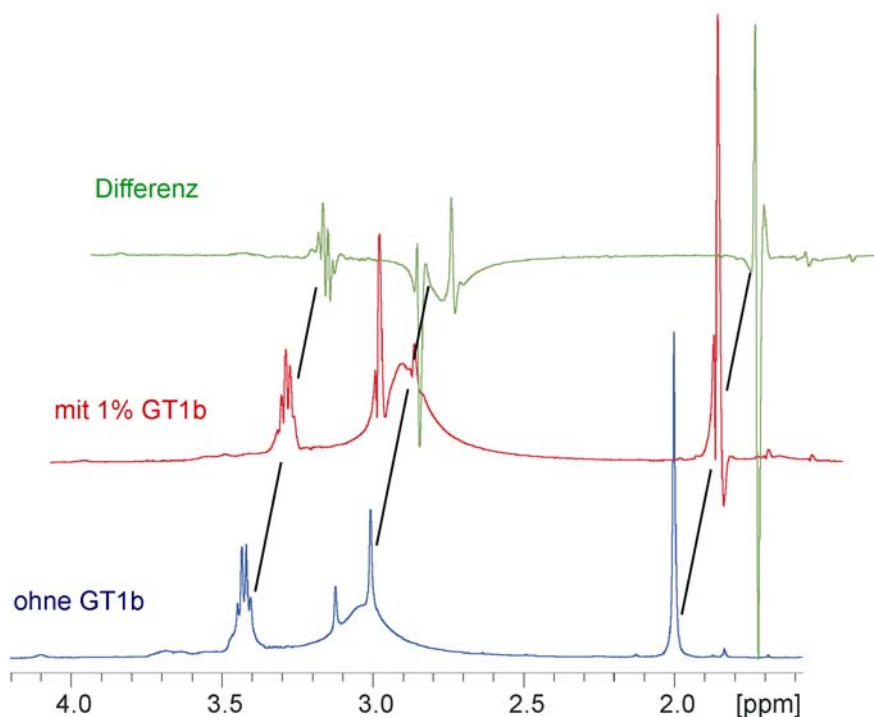


Abbildung 43. Watergatespektren von Liposomen mit GT1b (rot), ohne GT1b (blau) und die Differenz (grün). Durch die Wasserunterdrückung wird auch die Liposomenhüllkurve unterdrückt. Der charakteristische Saccharidbereich zwischen 3.2 und 4.0 ppm ist leer. Die Resonanzen der N-Acetylgruppen der Sialinsäuren sollten bei ca. 1.8 ppm liegen, aber auch dort sind keine Signale.

Um eine höhere Auflösung zu erzielen, wurden HR-MAS Spektren an einem 500 MHz NMR Spektrometer mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 4000 Hz aufgenommen. Dies führte zwar zu einer höheren Auflösung der Liposomensignale, es konnten aber dennoch keine Kohlenhydratsignale, wie z.B. die H-3a und H-3e Protonen der Sialinsäuren, gefunden werden. Die vorhandenen scharfen Signale waren Verunreinigungen, die ebenfalls bei der

Referenzprobe ohne GT1b auftraten (siehe Abbildung 44). Eine Differenzbildung der beiden Spektren brachte keine neuen Erkenntnisse. Ein Problem für die Akquisition der Spektren war die Instabilität der Liposomen unter den HR-MAS Bedingungen aufgrund der hohen Rotationsgeschwindigkeit. Ein Vergleichsspektrum, das nach den HR-MAS Spektren aufgenommen wurde, bestätigte dies. Vermutlich halten die Vesikel diesen Bedingungen nicht stand und werden an der Wand des Probenröhrchens zerstört. Eine niedrigere Rotationsgeschwindigkeit wäre zwar schonender für die Probe, würde jedoch auch einen Verlust an Auflösung bedeuten. Die spektrale Auflösung war jedoch auch unter diesen Bedingungen noch zu niedrig, so dass die Rotationsgeschwindigkeit sogar noch hätte erhöht werden müssen.

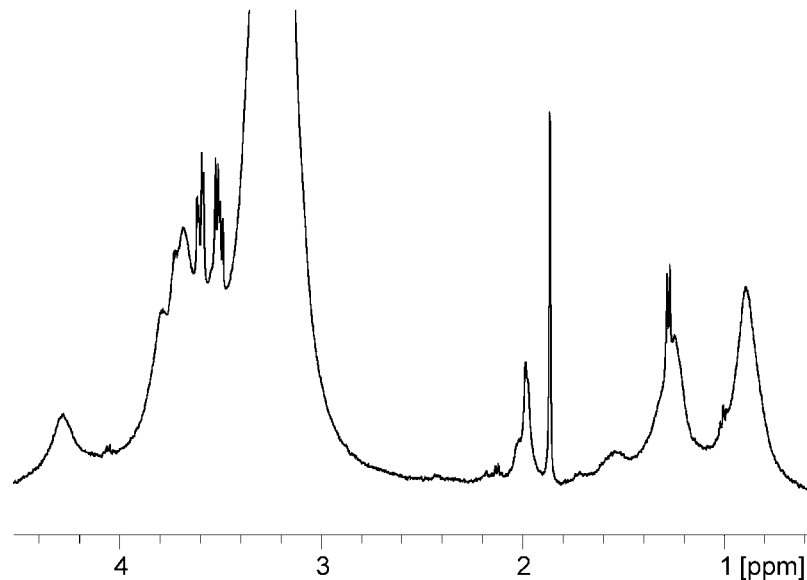


Abbildung 44: Watergate HR-MAS Spektrum von Liposomen mit 2 % GT1b. Die Auflösung ist zwar merklich erhöht, aber es treten trotzdem keine Kohlenhydratsignale wie z.B. die H-3a und H-3e der Sialinsäuren auf. Die beobachteten scharfen Signale sind Verunreinigungen und traten auch bei der Referenzprobe ohne GT1b auf. Eine Differenzbildung zeigte ebenfalls keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob das Gangliosid eingebaut wurde, wurden 150 μL der Liposomenprobe mit 2 % GT1b getrocknet und in deuteriertem Chloroform solubilisiert. Durch eine Aufnahme eines ^1H Spektrums sollten Kohlenhydratsignale nachgewiesen werden. Aber auch im optimalen Falle würden diese Signale nur 2 % der DMPC Signale ausmachen. Im Spektrum konnten zwar kleine Signale gefunden werden, die von den

Kohlenhydraten stammen könnten, aber aufgrund der Überlagerung mit den DMPC Signalen war eine genauere Analyse nicht möglich.

Prinzipiell wären zwei Erklärungen möglich warum keine Kohlenhydratsignale im NMR-Spektrum beobachtet werden konnten:

1. Das Gangliosid wurde nicht oder zu wenig eingebaut:
 - a. Die Temperatur, bei der nach dem Hydratisieren gearbeitet wurde, war zu niedrig, weswegen sich die Membran nicht genügend fluid verhielt, so dass die Extrusion nicht die gewünschten monolamellaren Vesikel lieferte.
 - b. Die Konzentration des Gangliosids war zu hoch. Es konnte auf Grund von Platzmangel nicht richtig eingebaut werden. Damit könnte die Gangliosid-Konzentration unter die Nachweis-Grenze fallen.
2. Das Gangliosid wurde eingebaut, aber konnte nicht im NMR detektiert werden.
 - a. Die Konzentration des Gangliosids war zu niedrig, um detektiert zu werden. Dies könnte mehrere Gründe haben: hohe Verluste während der Präparation, oder es wurde nur ein Teil des Gangliosids eingebaut, während der größte Teil an der Wand des Gefäßes haften blieb.
 - b. Der Kohlenhydratanteil ist nicht beweglich genug, um diskrete Signale zu erzeugen. Wenn er unflexibel wäre, würden nur verbreiterte Signale zu sehen sein.

Für die Präparation der Proben wurde darauf geachtet über der *gel-liquid crystal transition temperature* (T_c) der Lipide DMPC und DMPG, zu arbeiten (23 °C). Die T_c des Gangliosides war nicht bekannt, aber für das Gangliosid GM1⁹⁴ und für Glucocerebroside⁹⁵ wurde festgestellt, dass es keine thermotropen Übergänge gibt. Bei Mischungen des Gangliosides GM1 mit dem Lipid Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) wurde in der Literatur jedoch eine Präparationstemperatur von 40 °C angegeben⁹⁴, so dass sich vermutlich die verwendete Temperatur im richtigen Bereich aufhielt.

Das Gangliosid GT1b hat einen Kohlenhydratanteil, der aus einem biantennären Heptasaccharid besteht. Bei einer Liposomenpräparation mit 1 % GT1b sollte durchschnittlich ein GT1b Molekül auf einer Oberfläche von 10 x 10 Lipidmolekülen kommen. Sollte der Raumbedarf zu groß sein, wäre es möglich, dass das Gangliosid die Stabilität der Vesikel beeinflusst, oder weniger in die Liposomen eingebaut wird. In dem Fall wäre es

wahrscheinlich, dass es nur eine bestimmte Grenzkonzentration gibt, mit der das GT1b eingebaut werden würde. Der Rest würde vermutlich unlöslich an der Wand des Präparationsgefäßes vorliegen. Wenn es dadurch zu einer geringeren Konzentration an Gangliosid in der Probe kommen sollte, würde dies die Detektion erschweren. Wenn das Gangliosid nicht richtig eingebaut wurde, ist es bei einem der Bearbeitungsschritte vermutlich ausgefallen, da es nicht gut wasserlöslich ist.

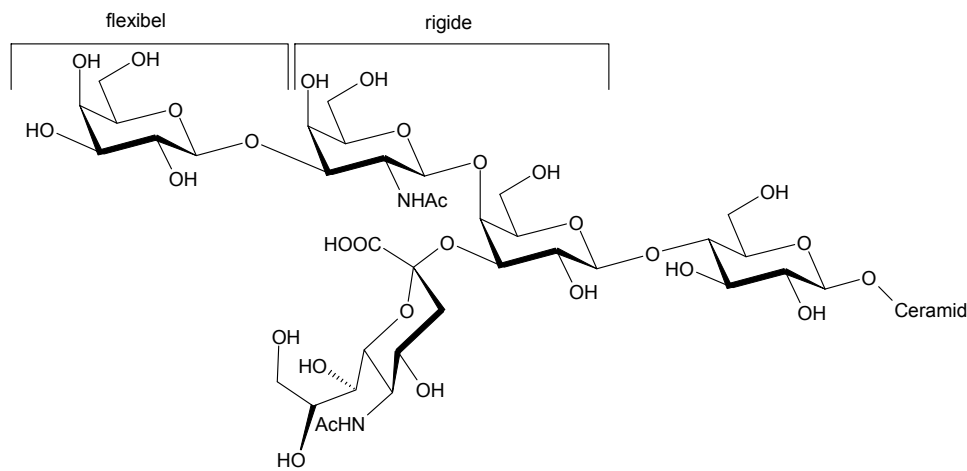


Abbildung 45: GM1 in Micellen. Das zentrale Trisaccharid ist rigide, während die terminale glycosidische Bindung mehr Flexibilität zeigt. Ergebnisse von Brocca, Berthault und Sonnino⁹⁶.

Da das Gangliosid in einem Liposom mit dem Ceramidschwanz in der Oberfläche verankert ist, ist vermutlich die Beweglichkeit des Kohlenhydratrestes etwas eingeschränkt. Diese Saccharidteile würden im NMR leicht verbreiterte Linien zeigen, und damit schlecht detektiert werden können. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass selbst die terminalen Sialinsäuren davon betroffen sind. In der Tat zeigten Brocca et al., dass der Kohlenhydratanteil des Gangliosids GM1 in Micellen noch gut zu detektieren ist⁹⁶. Nach diesen Aussagen ist das β -GalNAc-1,4-(Sia-2,3)- β -Gal-Trisaccharid sehr steif aber die terminale β -Gal-1,3- β -GalNAc Bindung recht flexibel (siehe Abbildung 45). Die Situation für Micellen unterscheidet sich zwar von der in Liposomen, aber der Abstand der Gangliosidmoleküle voneinander ist in Micellen geringer als in Liposomen, da hier keine Lipide als Spacer zwischen den Gangliosiden dienen können. Wenn die Ganglioside am Terminus in Micellen genug Platz haben, so scheint dies auch für Liposomen wahrscheinlich. GT1b enthält im Vergleich mit GM1 zwei weitere Sialinsäuren, die jeweils mit dem Ende der

beiden Antennenketten verknüpft sind. Dieses Molekül ist nicht wesentlich größer als GM1, und ein größerer Abstand zur Membran sollte eine weitere Flexibilisierung der terminalen Sialinsäuren mit sich bringen.

Insgesamt scheint es eher wahrscheinlich, dass die Konzentration von GT1b in den Liposomen gering war, oder dass das Gangliosid überhaupt nicht eingebaut wurde. Um dieses Problem zu umgehen, sollten weitere Versuche mit höheren Präparationstemperaturen und höheren Gangliosidkonzentrationen gemacht werden. Alternativ sollten STD Versuche mit Gangliosid-Micellen und MAG durchgeführt werden. Dies wäre jedoch nur möglich, wenn die Assoziation der Ganglioside an die Micellen sehr langsam wäre. Sonst würde diese weitere Bindung die STD Messungen stören.

4.7 GANGLIOSIDSPALTUNG

Da Ganglioside schlecht wasserlöslich sind, sollte der Ceramidteil vom Gangliosid abgespalten und das komplexe Saccharid gewonnen werden. Mit diesem Saccharid sollten dann Bindungsstudien durchgeführt werden. Zur Hydrolyse wurde ein Enzym, die Endoglycoceramidase II aus dem Organismus *Rhodococcus* sp., eingesetzt⁹⁷⁻⁹⁹. Dafür wurde das Gangliosid GT1b mit dem Enzym in einem 20 mM Natriumacetat-Puffer mit 0.4 % Triton X-100 bei 37 °C inkubiert (siehe Abbildung 46). Es wurden verschiedene Enzymkonzentrationen und Reaktionszeiten getestet.

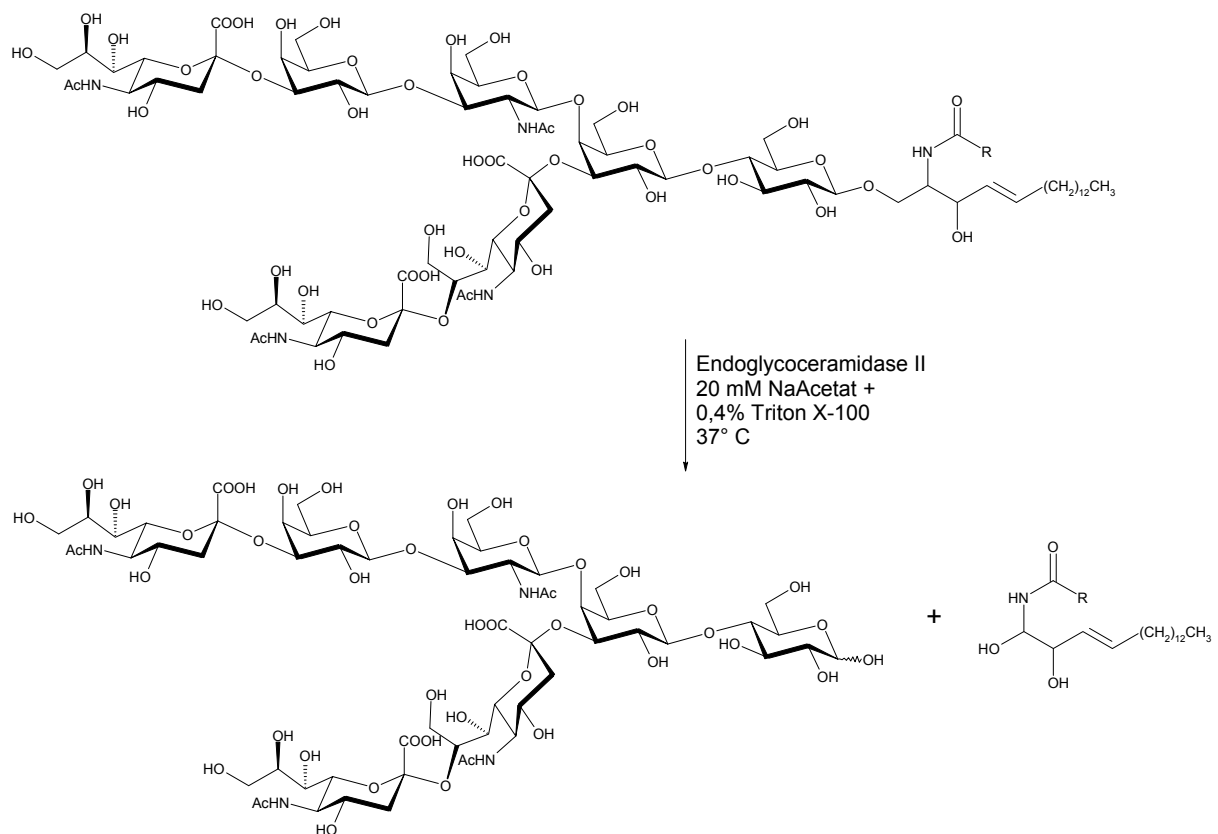


Abbildung 46: Spaltung des Gangliosides GT1b mit dem Enzym Endoglycoceramidase II. Die Hydrolyse setzt den komplexen Zucker frei. R bezeichnet einen Fettsäurerest.

Zur Aufreinigung wurde das Reaktionsgemisch zunächst HPLC-chromatographisch über eine C-18 Säule und dann über eine Aminosäule getrennt. Die C-18 Säule diente der Abtrennung der unpolaren Substanzen, wie dem Triton X-100 und dem Ceramidrest. Auf der Aminosäule sollten dann die Saccharide getrennt werden. Aus dem Chromatogramm ergaben sich zwei verschiedene Spezies (Peaks), die mit massenspektrometrischen Methoden untersucht wurden.

4.7.1 Untersuchungen mit MALDI-TOF MS und ESI MS

Für die MALDI-TOF Untersuchungen wurde im positiven und negativen Modus, mit unterschiedlicher Laserenergie und mit zwei verschiedenen Matrices (DHB und CCA) gemessen. Weiterhin wurden verschiedene Präparationsmethoden für die Probenpräparation verwendet. Die Analytik war jedoch schwierig, da Sialinsäurekomplexe sehr leicht fragmentieren. So wird in der Literatur berichtet, dass die Mehrheit der Ionen im Linearmodus für sialylierte Glycoproteine metastabilen Ionen entspricht¹⁰⁰, während der Reflektormodus mit CCA oder Sinapinsäure zum Verlust der meisten Sialinsäurereste führt¹⁰¹. Um derartige Probleme zu vermeiden, sollte im negativen Linearmodus mit niedriger Laserenergie und mit DHB gemessen werden. Die Messung im positiven Modus ist zwar möglich, aber das sialylierte Glycan tritt im Massenspektrum aufgrund seiner negativen Ladungen durch die Carboxylate als Mischung von Protonen-, Natrium- und Kaliumaddukten auf. Durch die Präsenz mehrerer Spezies wird das Spektrum verkompliziert und die Intensität der einzelnen Peaks erniedrigt. Um das Auftreten mehrerer Spezies im Positivmodus zu unterdrücken, können der Matrix Schwefelsäure¹⁰² oder Alkylsulfonate¹⁰³ zugefügt werden. Dadurch werden hauptsächlich protonierte Addukte erzeugt.

Um die Stabilität der Glycane zu erhöhen, wurden sie bei Raumtemperatur in DMSO mit Methyljodid umgesetzt, um eine Methylveresterung der Carboxylate zu erreichen^{104,105}. Dies sollte außerdem eine Detektion im Positivmodus erlauben. Eine nachfolgende MALDI-Analyse ergab jedoch ebenfalls nicht die gewünschte Masse. In der Literatur werden weitere Derivatisierungen wie Permethylierungen¹⁰⁶ oder Perbenzoylierung¹⁰⁷ diskutiert.

Alternativ zum MALDI-TOF-MS wurde auch Untersuchungen mit dem ESI-MS durchgeführt. Es wurden jedoch auch hierbei keine Massen gefunden, die erwartet wurden.

In der Literatur wird als weitere Alternative zur Derivatisierung noch eine enzymatische Desialylierung diskutiert^{108,109}. Zwar werden mit dieser Methode neutrale Saccharide erhalten, die sich in der Regel gut detektieren lassen, aber ein direkter Nachweis einer bestimmten sialylierten Spezies ist mit dieser Methode nicht zu leisten.

4.7.2 Untersuchungen mit NMR

Da aus den massenspektrometrischen Untersuchungen keine Erkenntnisse gewonnen werden konnten, wurden von GT1b in Methanol d₄ und von den zwei Fraktionen (D₂O), die aus der Aufreinigung mit der HPLC gewonnen werden konnten, NMR Spektren aufgenommen (Siehe Abbildung 47). Da die Spektren in unterschiedlichen Lösungsmitteln aufgenommen wurden, können sie nicht direkt verglichen werden. Das GT1b Spektrum in Methanol wurde daher um -0.23 ppm verschoben, damit eine teilweise Deckung mit den anderen Spektren erreicht werden konnte.

- In allen drei Spektren ist die charakteristische *Hump*-Region der Saccharide zwischen 3 und 4 ppm gut zu erkennen. Daher enthalten vermutlich beide HPLC Fraktionen Saccharide. Die *Hump*-Region der zweiten Fraktion war jedoch stärker ausgeprägt, so dass es möglich ist, dass diese Fraktion einen höheren Saccharidanteil besitzt.
- Weitere kohlenhydratspezifische Signale sollten bei ca. 4.3 ppm für die anomeren Protonen der Galactosen und bei ca. 2.5 und 1.5 ppm für die H-3e und H-3a Protonen der Sialinsäuren liegen.
 - Im GT1b Spektrum befinden sich zwei Resonanzen bei ca. 4.6 u. 4.2 ppm, die von anomeren Protonen stammen können. Beide zeigen die richtigen Kopplungskonstanten und sind Dubletts. In den Spektren der beiden HPLC-Fraktionen konnten diese Signale jedoch nicht gefunden werden. In der ersten Fraktion befindet sich zwar ein Signal bei 4.2 ppm, aber es zeigt nicht die korrekte Aufspaltung für ein anomeres Proton.
 - Die H-3a Protonen der Sialinsäuren können aufgrund von Überlagerungen mit anderen Signalen in keinem der drei Spektren identifiziert werden.

- Im Bereich der H-3e Protonen liegen bei ca. 2.1, 2.3 u. 2.6 ppm Signale, die von den H-3e Protonen stammen könnten. In den korrespondierenden Bereichen der beiden HPLC Fraktionen sind diese Signale aber teilweise mit anderen Signalen überlagert und zum Teil nicht sichtbar. Eine Resonanz bei ca. 2.1 ppm in der ersten Fraktion zeigt zwar die gleiche Verschiebung, aber die anderen Signale bei 2.3 u. 2.6 ppm sind nicht vorhanden.
- Die intensiven Signale bei ca. 1.0 ppm im GT1b Spektrum sind Ceramidprotonen aus den langen Alkanketten. In der ersten Fraktion sind diese Resonanzen noch sichtbar, aber in der zweiten Fraktion sind sie nur noch wenig intensiv, was darauf hindeuten könnte, dass die erste Fraktion einen größeren Ceramidanteil enthält.
- Bei ca. 1.8 ppm sollten die Resonanzen der N-Acetylgruppen auftreten. Das Spektrum des GT1b zeigt insgesamt sechs Singulett-Signale in diesem Bereich. In demselben Bereich bei dem Spektrum der ersten Fraktion befinden sich drei Singulett-Resonanzen mit unterschiedlicher Intensität und Linienform, während bei dem Spektrum der zweiten Fraktion eine Verunreinigung diesen Bereich dominiert. Es sind jedoch drei Singulett-Resonanzen erkennbar.

Die ^1H NMR Spektren konnten aufgrund ihrer Komplexität nur rudimentär ausgewertet werden. Da die Probenmenge zu gering für 2D Spektren war, konnte keine weitere Auswertung vorgenommen werden. Beide Fraktionen enthielten das Produkt entweder gar nicht, oder mit starken Verunreinigungen. Am schwierigsten war zu bewerten, warum bestimmte Resonanzen wie für die H-3e oder die anomeren Protonen in den Spektren der beiden Fraktionen nicht sichtbar waren. Prinzipiell gibt es mehrere Gründe hierfür. Es ist möglich, dass diese Signale mit breiten Resonanzen überlagert waren, so dass sie nicht beobachtet werden konnten. Alternativ könnte sich das Saccharid zersetzt haben. Sialoglycokonjugate sind empfindlich und zersetzen sich leicht, wobei die Sialinsäuren abgespalten werden. Dies würde erklären, warum die H-3e Protonen der Sialinsäuren nicht sichtbar waren, aber nicht, warum die anomeren Protonen fehlten.

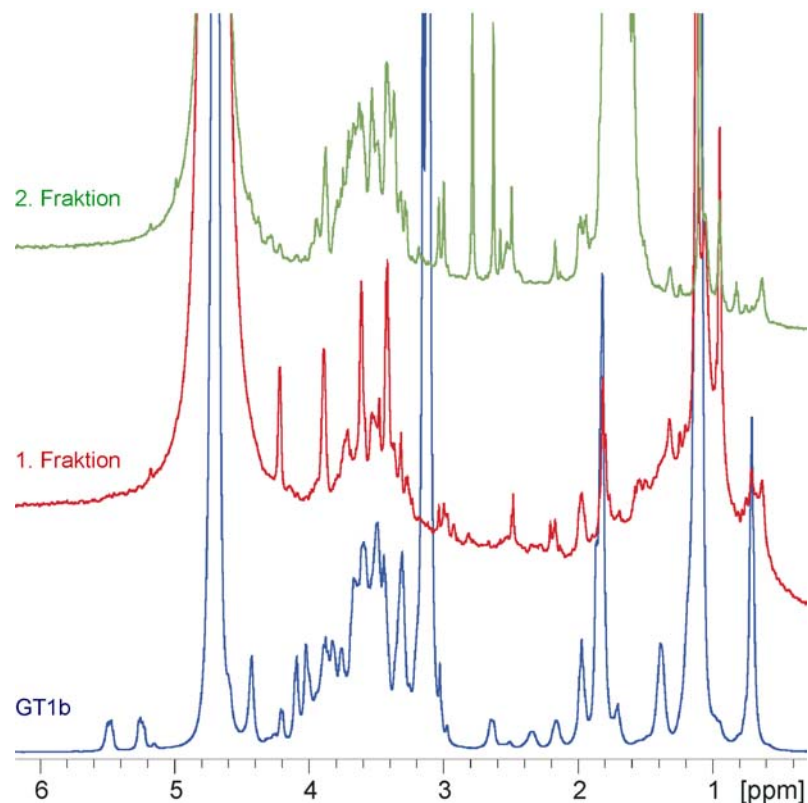


Abbildung 47: ¹H NMR Spektren von GT1b (unten), der ersten Fraktion des HPLC Laufes (Mitte) und der zweiten Fraktion des HPLC Laufes (oben). Die Spektren der HPLC Fraktionen wurden in D₂O und das Spektrum von GT1b in Methanol-d₄ aufgenommen. Das unterste Spektrum ist um -0.23 ppm verschoben, da es in einem anderen Lösungsmittel aufgenommen wurde.

Insgesamt ist es möglich, dass die Umsetzung stattgefunden hat, da die Ceramidresonanzen reduziert in den Spektren der beiden HPLC Fraktionen auftreten. Die zweite Fraktion könnte das gesplante Saccharid enthalten. Es kann jedoch nicht beurteilt werden, ob eine Nebenreaktion stattgefunden hat, die vielleicht das Produkt zersetzt hat. Variationen in den HPLC-Methoden für eine bessere Trennung und eine Optimierung der massenspektrometrischen Analytik wären nötig, um dies zu evaluieren. Das störende Triton X-100 sollte gut mit Bio-Beads entfernt werden können.

4.8 AUSBLICK

Sialoglycokonjugate haben als potentielle Therapeutika einige Nachteile. Sie sind schwer zu synthetisieren und sind nicht sehr stabil, da sie eine geringe Toleranz gegenüber dem pH-Wert zeigen. Daher sind die untersuchten Liganden eher als Leitstrukturen, denn als echte Therapeutika zu verstehen. Das Ersetzen der Sialinsäuren durch stabilere Mimetika, wie dies für die 2,6-verknüpfte Sialinsäure im Tetrasaccharid geschehen ist, wäre daher wünschenswert, da es den synthetischen Zugang erleichtern und die Stabilität erhöhen könnte. Eine weitere Optimierung der Liganden sollte auch hinsichtlich ihrer Hydrophobizität stattfinden. So sollten hydrophobe Gruppen, wie Aromaten, hydrophobe Flächen in der Bindungstasche des Rezeptors nutzen, um die Affinität zu erhöhen.

Konventionelle Kriterien bei der Entwicklung im *Drug Design* Bereich können jedoch bei diesen Substanzen umgangen werden, da sie im Anwendungsfall entweder intrathekal (in den Liquorraum des Rückenmarks) oder systemisch über eine Infusion appliziert werden würden. Da die Blut-Hirn-Schranke nach einer Verletzung des Rückenmarks für längere Zeit nicht existiert¹¹⁰, bräuchten die Substanzen auch nicht die üblichen Kriterien, wie z.B. eine gewisse Hydrophobizität erfüllen, die zum Passieren der Schranke notwendig wären.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) ist ein Protein der Oligodendrozytenmembran und des Myelins im zentralen Nervensystem (ZNS). Es ist verantwortlich für die Inhibition der axonalen Regeneration nach einer Verletzung des Rückenmarks. MAG gehört zu der Familie der Siglecs und ist somit ein Sialinsäure bindendes Lektin. Dabei spielt das Arginin 118, das eine Salzbrücke zum Carboxylat einer Sialinsäure ausbildet, eine zentrale Rolle⁷⁶. Eine Inhibierung des MAGs kann eine Regeneration des zerstörten Neuriten ermöglichen, wie DeBellard *et. al.* mit sialylierten Kohlenhydraten nachwiesen⁸⁰.

Bei dieser Arbeit wurde die Bindung verschiedener sialylierter Glycokonjugate an eine wasserlösliche MAG Chimäre, das FcMAGd1-3 studiert. Dafür wurde Saturation Transfer Difference NMR (STD NMR) eingesetzt, mit dem sich die Bindung eines kleinen Liganden an ein großes Protein verfolgen lässt. Über STD NMR ließen sich die K_D -Werte der Interaktionen und die Bindungsepitope der Liganden bestimmen.

Als Liganden für das MAG dienten Trisaccharide (Sia-2,3-Gal-1,4-Glc; Sia-2,3-Gal-1,3-Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc), die einen Ausschnitt aus dem funktionellen Liganden des MAGs, GT1b darstellten, (siehe Abbildung 17) und Tetrasaccharide (Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc), die einen Ausschnitt aus dem Gangliosid mit der höchsten Affinität zu MAG, dem GQ1b α , (siehe Abbildung 22) darstellten. Weiterhin wurde ein Milchsäure-Derivat der Tetrasaccharide und ein aromatisches Sialinsäure-Derivat untersucht. Von allen Liganden wurde der K_D -Wert und das Bindungsepitop bestimmt.

Für die Bestimmung der K_D -Werte wurden zunächst Stammlösungen der Liganden angesetzt und gegen eine Lösung des Proteins titriert. Für die unterschiedlichen Ligandkonzentrationen wurden STD und Referenzspektren aufgenommen. Die Auswertung wurde in der Regel anhand der N-Acetylgruppen der 2,3-verknüpften Sialinsäure vorgenommen, da sie üblicherweise den stärksten STD-Effekt zeigte. Dafür wurde der STD-Amplifikationsfaktor gegen die Konzentration aufgetragen, und der K_D -Wert mittels des *one site binding* Modells ermittelt.

Es zeigte sich, dass sich die K_D -Werte der Trisaccharide Sia-2,3-Gal-1,4-Glc, Sia-2,3-Gal-1,3-Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc bei 650, 390 und 820 μM lagen, während die K_D -Werte der Tetrasaccharide Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc bei 110 und 180 μM lagen. Die Tetrasaccharide banden also um den Faktor vier besser an das MAG, als die korrespondierenden Trisaccharide. Interessanterweise zeigten hierbei die Liganden mit N-Acetylgruppe an der reduzierenden Galactose, wie sie in der nativen Struktur bei GT1b und GQ1b α vorkommt, eine um den Faktor zwei schlechtere Bindung, als die Liganden ohne N-Acetylgruppe. Dies traf sowohl für die Trisaccharide als auch für die Tetrasaccharide zu.

Anschließend an die K_D -Wert Bestimmung wurden die Bindungsepitope der Liganden ermittelt, indem entweder ein 1D STD Spektrum bei Liganden, deren Resonanzen geringe Überlagerung zeigten, oder ein 2D STD HSQC Spektrum bei Liganden, deren Resonanzen große Überlagerung zeigten, aufgenommen wurde. Das STD HSQC kam zur Anwendung, weil es durch die zusätzliche Kohlenstoff-Dimension eine größere spektrale Dispersion aufwies, und sich dadurch die Resonanzen vieler Ligandenprotonen separieren ließen. Für die Auswertung des 1D STD Spektrums wurden die Intensitäten der Ligandresonanzen im STD Spektrum mit denen der Referenzspektren verglichen, und somit die STD Werte für die einzelnen Protonen bestimmt. Dabei wurden alle STD Werte auf die intensivste Resonanz bezogen, die gleich 100 % gesetzt wurde. Für die STD HSQC Spektren wurden die Signale des Differenzspektrums über einen Lorentzfunktions-Fit mit dem Programm Sparky⁸⁶ integriert. Auch hier wurden die Signalintensitäten auf die intensivste Resonanz bezogen.

Aus den Bindungsepitopen dieser Saccharide konnte erkannt werden, dass ein Schwerpunkt der Bindung auf der N-Acetylgruppe und der Glycerinseitenkette der 2,3-verknüpften Sialinsäure liegt. Es ist wahrscheinlich, dass diese beiden Gruppen mit einem hydrophoben *Patch* auf der Oberfläche des Proteins interagieren. Nach einem Homologiemodell des MAGs anhand von Sialoadhesin sollte die N-Acetylgruppe der Sialinsäure mit dem Tryptophan 2 wechselwirken⁸⁹. Im Sialoadhesin binden die Hydroxylgruppen von C8 und C9 der Sialinsäureseitenkette einerseits an das Peptid *Backbone* von Leucin 107 und andererseits kommt es zu hydrophoben Interaktionen der Glycerinseitenkette mit Tryptophan 106⁷⁴. Möglicherweise liegt beim MAG eine analoge Situation vor. Ein weiterer Schwerpunkt der Bindung lag auf H-3 bis H-5 der mittleren

Galactose, während sich die reduzierende Galactose bzw. das Galactosamin und die 2,6-verknüpfte Sialinsäure (bei den Tetrasacchariden) wenig an der Bindung beteiligen.

Insgesamt zeigte sich, dass die Trisaccharide Sia-2,3-Gal-1,3-Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc einen sehr ähnlichen Bindungsmodus einnehmen. Die Ausnahme war die reduzierende Galactose, bei der sich einige Diskrepanzen in den STD Werten für die bindenden Protonen zeigte. Diese Unterschiede waren jedoch zu erwarten, da die N-Acetylgruppe an der reduzierenden Galactose durch ihren Raumbedarf die Bindung stören kann. Die Tetrasaccharide Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal und Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc zeigten ebenfalls einen sehr ähnlichen Bindungsmodus. Die einzigen größeren Unterschiede für die STD Werte wurden auch hier im Bereich der reduzierenden Galactose gefunden.

Bei einem Vergleich der Bindungsepitope der Trisaccharide mit denen der Tetrasaccharide stellte sich heraus, dass die Bindung in den Tetrasacchariden bezüglich der N-Acetylgruppe der 2,3-verknüpften Sialinsäure insgesamt erniedrigt ist. Das Muster der Protonen, die an der Bindung beteiligt sind, ist zwar ähnlich, aber die STD Intensität in diesen Bereichen hat bei den Tetrasacchariden abgenommen. Es ist möglich, dass die bessere Interaktion bei den Tetrasacchariden über eine Gruppe stattfindet, die im STD NMR nicht beobachtet werden kann. Zusammengefasst zeigen die Tetrasaccharide einen etwas anderen Bindungsmodus als die Trisaccharide.

Bei der Analyse eines Homologiemodells des MAGs im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Peters an der Medizinischen Universität Lübeck wurde festgestellt, dass eine ionische Interaktion der 2,6-verknüpften Sialinsäure der Tetrasaccharide mit dem Lysin 67 möglich ist. Da sich außerdem die 2,6-verknüpfte Sialinsäure wenig an der Bindung beteiligte, wurden zwei unterschiedliche Strategien angewendet, um den Beitrag der zusätzlichen Sialinsäure zur Bindung zu evaluieren. Zum einen wurden STD Experimente mit einer K67A Mutante des FcMAGd1-3 durchgeführt, bei der das Lysin 67 gegen ein Alanin ausgetauscht war, und zum anderen wurden Experimente mit einem Derivat der bearbeiteten Tetrasaccharide durchgeführt, bei dem die 2,6-verknüpfte Sialinsäure durch eine S-Milchsäure ausgetauscht war.

Bei den Experimenten der K67A Mutante mit dem Tetrasaccharid Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc konnte kein K_D -Wert ermittelt werden, da die STD Werte extrem niedrig waren, was auf eine sehr geringe Bindung oder auf einen sehr niedrigen k_{off} -Wert deutet. Da bei einer SDS PAGE kein Abbau des Proteins festgestellt werden konnte, wurde

angenommen, dass sich die Konformation der Mutante gegenüber dem Wildtyp geändert hatte, so dass keine Bindung mehr stattfinden konnte.

Als zweites wurde ein Derivat der Tetrasaccharide, das Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal verwendet. Dieses Derivat zeigte einen ähnlichen K_D -Wert (130 μM) und Bindungsepitop wie die untersuchten Tetrasaccharide. Daher ist es möglich, dass die Interaktion des Carboxylates der 2,6-verknüpften Sialinsäure mit dem Protein von Bedeutung ist. Da Experimente mit der K67A Mutante jedoch fehlgeschlagen waren, ließ sich nicht erkennen, ob diese Interaktion tatsächlich mit dem Lysin 67 stattfindet. Es ist jedoch möglich, dass sich die Hauptbindungsstellen auf die beiden Carboxylate der Tetrasaccharide konzentrieren, so dass das Molekül zwischen diesen beiden Salzbrücken verankert ist.

6 SUMMARY

Myelin-associated Glycoprotein (MAG) is a protein of the oligodendrocyte membranes and of myelin in the central nervous system (CNS). It is responsible for the inhibition of axonal regeneration after spinal cord injury (SCI). MAG belongs to the family of the Siglecs and is a sialic acid binding lectin. For this interaction arginine 118 plays a dominant role, because it establishes a salt bridge to the carboxylate of a sialic acid⁷⁶. The inhibition of MAG may allow the regeneration of severed neurites as DeBellard et. al. showed⁸⁰.

Here, the binding of several sialylated glycoconjugates to a water soluble MAG chimera, FcMAGd1-3 was studied. For this, Saturation Transfer Difference NMR (STD NMR) was employed, because it is useful for the observation of small ligands binding to a large protein. STD NMR allows the determination of K_D values of the interactions and of binding epitopes of the ligands.

Trisaccharides (Sia-2,3-Gal-1,4-Glc, Sia-2,3-Gal-1,3-Gal and Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc), who represent a section of the functional ligand of MAG GT1b, and tetrasaccharides (Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal and Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc), who represent a section of the ganglioside with the highest affinity to MAG, GQ1b α , (see Abbildung 22) served as ligands. Further a lactic acid derivative of the tetrasaccharides and an aromatic derivative of sialic acid were tested. The K_D values and binding epitopes were determined for all ligands.

For the determination of the K_D values stock solutions of the ligands were prepared and titrated against a solution of the protein. STD and reference spectra were acquired for the different ligand concentrations. The analysis was generally conducted with the N-acetyl groups of the 2,3 bound sialic acid, because it usually showed the largest STD effect. For this the STD amplification factor was plotted against the concentration and the K_D value was determined with the one site binding model.

It was shown, that the K_D values of the trisaccharides Sia-2,3-Gal-1,4-Glc, Sia-2,3-Gal-1,3-Gal and Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc were at 650, 390 and 820 μ M, while the K_D values for the tetrasaccharides Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal and Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc were at 110 and 180 μ M. The tetrasaccharides bound thus four times better to MAG than the corresponding trisaccharides. Interestingly the ligands with the N-acetyl group at the reducing galactose, as is apparent in the native structure of GT1b and GQ1b α showed a factor two

inferior binding, than the ligands without N-acetyl group. This applied to both trisaccharides and tetrasaccharides.

Following the determination of the K_D value the binding epitopes of the ligands were investigated. For ligands, whose resonances showed little overlap a 1D STD spectrum was acquired and for ligands, whose resonances showed great overlap a 2D STD HSQC spectrum was used. The STD HSQC was applied, because the additional carbon dimension allowed a greater spectral dispersion and thus it was possible to separate the resonances of many ligand protons. The intensities of the ligand resonances in the 1D STD spectrum were compared with those of the reference spectra and thus the STD values for the individual protons were determined. For this every STD value was referenced to the maximum resonance, which was set as 100 %. For the STD HSQC spectra the signals of the difference spectrum were integrated via a lorentz function fit with the program Sparky⁸⁶. Here too the signal intensities were referred to the most intensive resonance.

When regarding the binding epitopes of these saccharides it is apparent that a focal point of the binding is at the N-acetyl group and at the glycerol side chain of the 2,3 bound sialic acid. It is likely, that these two groups interact with a hydrophobic patch on the surface of the protein. A homology model of MAG on the basis of sialoadhesin predicted the interaction of the N-acetyl group of the sialic acid with tryptophane 2⁸⁹. In sialoadhesin the hydroxyl groups of C8 and C9 of the sialic acid side chain bind to the peptide backbone of leucine 107. Furthermore there are hydrophobic interactions of the glycerol side chain with tryptophane 106⁷⁴. It is possible that there is an analogous situation present with MAG. Another focal point of binding are H-3 to H-5 of the middle galactose, while the reducing galactose or galactosamine and the 2,6 bound sialic acid (tetrasaccharides) do not participate much in binding.

Altogether it could be shown that the trisaccharides Sia-2,3-Gal-1,3-Gal and Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc show a very similar binding mode. The reducing galactose was an exception because it showed some discrepancies for the STD values of the binding protons. But these differences were expected, because the N-acetyl group of the reducing galactose might disturb binding due to its steric needs. The tetrasaccharides Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal and Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc showed also a very similar binding mode. Here too the only major differences for the STD values were found in the region of the reducing galactose.

When the binding epitopes of the trisaccharides are compared with those of the tetrasaccharides, it is clear that the binding of the tetrasaccharides with regard to the N-acetyl group of the 2,3 bound sialic acid is lowered. The pattern of the protons that participate in binding is similar but the STD intensity in those regions has decreased for the tetrasaccharides. It is possible that the improved interaction of the tetrasaccharides occurs via a group, that can not be detected with STD NMR. In summary the tetrasaccharides show a slightly different binding mode than the trisaccharides.

The analysis of a homology model of MAG in the research group of Prof. Dr. Thomas Peters at the Medical University of Lübeck yielded a possibility for an ionic interaction of the 2,6 bound sialic acid of the tetrasaccharides with lysine 67. Because the 2,6 bound sialic acid participated little in binding two strategies were used to evaluate the contribution of this additional sialic acid to binding. First STD experiments were conducted with a K67A mutant of FcMAGd1-3, where lysine 67 was exchanged to alanin. And second, experiments with a derivative of the tetrasaccharides were conducted, where the 2,6 bound sialic acid was exchanged against a S-lactic acid.

The experiments with the K67A mutant with the tetrasaccharide Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc yielded no K_D value, because the STD values were very low and indicated therefore very low binding or a very low k_{off} value. Because a degradation of the protein could not be detected via a SDS PAGE it was assumed that the conformation of the mutant had changed with regards to the wild type, so that binding could not occur.

As a second strategy a derivative of the tetrasaccharides, the Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal was used. This derivative showed a similar K_D value (130 μ M) and binding epitope like the analyzed tetrasaccharides. Therefore it is possible that the interaction of the carboxylate of the 2,6 bound sialic acid with the protein is of importance. Because experiments with the K67A mutants failed, it could not be determined if this interaction does really occur with lysine 67. But it is possible that the central binding regions in the ligand are the two carboxylates of the tetrasaccharides, so that the molecule is fixed between those two saltbridges.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 CHEMIKALIEN

Das FcMAGd1-3 und die Mutante K67A wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Soerge Kelm exprimiert und zur Verfügung gestellt.

Alle Liganden (Ausnahme: Sialyllactose) die für STD NMR Untersuchungen verwendet wurden, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Ernst an der Universität Basel synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Hersteller	Chemikalien
Sigma	DMPC
	DMPG
	GT1b
	2,3-Sialyllactose
J.T. Baker	Acetonitril (HPLC Grade)
Calbiochem	Endoglycoceramidase II
Deutero	Deuteriumoxid 99.9 %
	Trifluorethanol-d3
Merck	Natriumchlorid
	Kaliumchlorid
	Natriumdihydrogenphosphat
	Dinatriumhydrogenphosphat
	Natriumazid
	Chloroform
	Methanol

7.2 GERÄTE

NMR Spektrometer

NMR-Spektren wurden an einem Bruker DRX500 oder an einem Avance 700-Spektrometern aufgenommen.

DRX 500: Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 11.67 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 499.87 MHz für Protonen. Das Spektrometer ist wahlweise mit einem inversen 5mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen ausgestattet oder einem 4 mm Doppelresonanz-HRMAS-Probenkopf.

Avance 700: Der Magnet besitzt eine magnetische Induktion von 16.35 Tesla entsprechend einer Larmor-Frequenz von 700.13 MHz für Protonen. Das Spektrometer ist wahlweise mit einem inversen 5mm Tripelresonanz-Cryo-Probenkopf mit Z-Gradienten und abgeschirmten Spulen oder mit einem analogen TXI-Probenkopf ohne Cryo-Technologie ausgestattet.

Software: Die Auswertung, Prozessierung, Phasenkorrektur, Basislinienkorrektur und Kalibrierung der Spektren erfolgte mit der Software XWINNMR (Version 3.0) der Firma Bruker auf Silicon-Graphics Workstations (O2, Octane). Die Integration wurde mit dem Programm Sparky⁸⁶, Version 3.106 durchgeführt.

Chromatographie

BioCAD Sprint Perfusion Chromatography System. Die Aufreinigung der Substanzen erfolgte an einer BioCAD Sprint HPLC-Anlage der Firma Applied Biosystems, Darmstadt. Dabei wurden Säulen mit unterschiedlichen Materialien verwendet. Die Wellenlänge zur Detektion war 215 nm.

HPLC-Säulen:

semipräparative Säule, C18 analoges Material, *Protein & Peptide*, Volumen: 19.635 mL, Vydac, Art.-Nr. 218TP510.

semipräparative Säule: Luna NH₂, 5 µm, Volumen: 19.635 mL, Phenomenex, Art.-Nr. 165122-1.

Fraktionssammler. Gilson FC205, Gilson, Middleton, WI, USA.

ESI-Massenspektrometer

HP5989B MS Engine: Die *electron spray* Massenspektren mit HPLC-Kopplung wurden an einem HP5989B MS Engine Massenspektrometer der Firma Hewlett Packard, Böblingen aufgenommen.

HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface: Als Ionenquelle diente ein HP59987A API-Elektrospray LC/MS Interface der Firma Hewlett Packard, Böblingen.

MALDI-TOF Massenspektrometer

Bruker Biflex III: Die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren erfolgte an einem Biflex III Spektrometer der Firma Bruker Daltonics, Bremen, im Reflexions Modus.

Zentrifugation

Alle proteinhaltigen Proben wurden bei 6 °C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert bzw. ultrafiltriert.

Sigma Laborzentrifuge 2K15

Eppendorf Laborzentrifuge 5804

Ultrafiltrationseinheiten / Dialyseeinheiten

Vivaspin 4 mL Concentrator: Ausschlussgrenze: 10 kDa, Volumen: 4 mL, Vivascience, Produkt-Nr. VS0403. Vor der Benutzung wurde die Membran 15x mit Wasser und 2x mit Puffer gewaschen.

Spectra/Por Float-A-Lyzer: Ausschlussgrenze: 500 Da, 1 mL, Spectrum, Produkt-Nr. 235026. Vor der Benutzung wurde die Membran 3x mit Wasser gewaschen und in Wasser gelagert, um das Konservierungsmittel zu entfernen.

Extruder

Mini Extruder: Avantilipids, Produkt-Nr. 610000

7.3 SICHERHEIT

Verbindung	Gefahrensymbole	R- und S-Sätze
Acetonitril	F Xn	R 11-20/21/22-36 S 16-36/37
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22 S 36/37
Methanol	F T	R 11-23/24/25-39/23/24/25 S 7-16-36/37-45
Methyliodid	T	R 21-23/25-37/38-40 S 36/37-38-45
Natriumazid	T+ N	R 28-32-50/53 S 28.1-45-60-61
Triton X-100	Xn	R 22-41 S 24-26-39
Trifluorethanol	Xn	R 10-20/21/22-38-41-48/20 S 26-36/37/39

7.4 PUFFER

Für alle NMR Untersuchungen wurde ein Phosphate Buffered Saline (PBS) Puffer in D₂O mit folgender Zusammensetzung verwendet:

140 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄ * 2 H₂O

2 mM NaH₂PO₄ * 2 H₂O

6 mM Natriumazid

pH-Wert = 7-7.5 (nicht korrigiert)

7.5 STD NMR SPEKTREN

Alle STD Spektren wurden bei der Temperatur 285 K aufgenommen. Die Proteinkonzentrationen lagen in der Regel bei 5 nmol MAG bzw. 10 nmol Rezeptor (FcMAGd1-3 ist ein Dimer) pro NMR Probe. Die Ligandkonzentrationen variierten je nach Anwendung.

Die Sättigung des Proteins wurde durch eine Serie von *Gauss-shaped* Pulsen von 50 ms Länge, getrennt durch einen 1 ms langen *delay* erreicht. Die Gesamtsättigungsdauer lag in der Regel zwischen 1.02 und 2.04 s. Die Pulsleistung variierte zwischen 45 und 55 dB bei dem 500 MHz Spektrometer und zwischen 39 und 49 dB bei dem 700 MHz Spektrometer mit cryogenem Probenkopf. Die *on resonance* Frequenzen lagen in der Regel bei -2 und 7 ppm. Die verwendeten Pulsprogramme sind im Anhang aufgelistet.

7.5.1 Titrationsen

Das Protein, FcMAGd1-3 wurde zunächst in Ultrafiltrationseinheiten umgepuffert, wobei der D₂O/PBS Puffer verwendet wurde. Die Endkonzentration lag üblicherweise bei ca. 10 µM. Zur Überprüfung der Integrität wurden STD Spektren ohne Ligand aufgenommen.

Vom Liganden wurde üblicherweise eine konzentrierte Stammlösung (10 mg/mL) angesetzt. Für die Aufnahme eines Titrationspunktes wurde diese Stammlösung zu der Proteinlösung titriert und ein STD- und Referenzspektrum aufgenommen. Anschließend wurde der nächste Titrationspunkt aufgenommen. Die Titration wurde fortgeführt bis eine Sättigung erreicht wurde.

Die Auswertung erfolgte über das N-Acetylsignal der 2,3-verknüpften Sialinsäure. Dafür wurde das Referenzspektrum über das STD Spektrum gelegt und der Skalierungsfaktor ermittelt, der direkt dem STD Wert entsprach. Anschließend erfolgte eine Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors und seine Auftragung gegen die Konzentration des Liganden. Durch einen Fit mit dem *one site binding* Modell unter dem Programm Origin wurde der K_D-Wert ermittelt.

7.5.2 Bestimmung des Bindungsepitopes

Für die Liganden Sialyllactose und 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid wurden die Daten für das Bindungsepitop aus 1D STD Spektren gewonnen. Üblicherweise geschah dies nach Abschluss der Titration, also bei der höchsten Ligandkonzentration. Hierfür wurden STD- und Referenzspektren aufgenommen, und aus dem Verhältnis der Signalintensitäten die STD Werte bestimmt.

Für alle anderen Liganden wurden in der Regel nach Abschluss der Titration bei der höchsten Ligandkonzentration STD HSQC Spektren aufgenommen. Anschließend wurden das *on-resonance* und das *off-resonance* Spektrum identisch prozessiert, phasenkorrigiert und anschließend von einander abgezogen. Die Signale des Differenzspektrums wurden dann mit dem Programm Sparky⁸⁶, Version 3.106, über einen Lorentzkurvenfit integriert.

Für die Bindungsepitope wurden die STD Werte immer in Relation zum intensivsten Signal gesetzt, so dass sich für das intensivste Signal 100 % ergaben. (Siehe Kapitel 4.5)

7.6 LIPOSOMENPRÄPARATION

Die Liposomen wurden aus 90 Teilen 1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 10 Teilen 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac(1-glycerol)-Natriumsalz (DMPG) und einem oder zwei Teilen GT1b zusammengesetzt. Alternativ wurden auch zum Vergleich Liposomen ohne GT1b präpariert.

Lösen der Lipide (Homogenisierung)

In einem Glasfläschchen wurden 33.9 μmol (23 mg) 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-phosphocholine in 2.3 mL Chloroform (10 mg/mL) zusammen mit 3.5 μmol (2.4 mg) 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac(1-glycerol)-Natriumsalz (DMPG) in 240 μl Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) (10 mg/mL) vermischt. Zusätzlich wurden für 1 % GT1b, 22.9 μmol GT1b in Methanol (1 mmol/mL) und für 2 % GT1b, 45.9 μmol GT1b in Methanol (1 mmol/mL) hinzugefügt. Alle Lösungsmittel wurden mit Hamilton Gas-Tight-Spritzen gehandhabt. Durch einen Stickstoffstrom wurde das Lösungsmittel entfernt und der Lipidfilm über Nacht im Vakuum getrocknet.

Hydratisierung des Lipidfilms

Der Lipidfilm wurde in 3.37 mL D_2O /PBS Puffer bei 30 °C gelöst. Dies war nötig um über der *gel-liquid crystal transition temperature* (T_c) des Lipids mit dem höchsten T_c zu bleiben (DMPC und DMPG haben beide 23 °C). Die Mischung wurde für ca. eine Stunde bei 30 °C temperiert und dann für eine weitere Stunde bei 30 °C im Inkubator geschüttelt. Die Lösung wurde über Nacht bei 30 °C stehen gelassen.

Extrusion

Die Lipidlösung wurde mehrfach mit flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, um multilamellare Vesikel zu zerstören. Die Flüssigkeit wurde anschließend in eine Gas-Tight Spritze transferiert und auf 30 °C temperiert. Anschließend wurde die Lösung 5x extrudiert, wobei eine Polycarbonatmembran mit 100 nm Porengröße verwendet wurde.

Abschließend wurde die Lösung mit einer Ultrazentrifugationseinheit (Ausschlussgrenze: 100 kDa) bei 6 °C auf 600 µl aufkonzentriert.

NMR Messung

Die extrudierten Liposomenlösungen wurden im NMR einmal mit dem TXI Probenkopf und einmal mit dem HR MAS Probenkopf vermessen. (Siehe Kapitel 4.6)

7.7 GANGLIOSIDSPALTUNG

2 mg GT1b (1 mmol) wurden in einem 20 mM Natriumacetat-Puffer mit 0.4 % Triton X-100 gelöst und mit 10 Milliunits Endoglycoceramidase II (EGC II) versetzt. Eine Unit des Enzyms ist dabei definiert als die Menge, die 1.0 µmol des Gangliosids asialo GM₁ pro Minute bei 37 °C und pH 5.0 hydrolysieren kann.

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37 °C für 24 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend mit einer Dialyseeinheit zwei Tage lang dialysiert, um das Natriumacetat zu entfernen. Zur Abtrennung von unpolaren Substanzen (Triton X-100 und Ceramid) wurde die HPLC mit einer C18 Säule verwendet. Dabei eluierten die Saccharide ohne Retention bei 100 % Wasser und die unpolaren Substanzen bei 100 % Acetonitril. Die gesammelten Fraktionen wurden an einer Lyophylle getrocknet und dann über eine Aminosäule bei 100 % Wasser weiter aufgetrennt.

7.8 ZUORDNUNGEN

Tabelle 3: Zuordnung für Sialyllactose: Sia-2,3-Gal-1,4-Glc in D₂O. Temperatur = 285K, kalibriert auf das HDO Signal bei 4.7 ppm in der ¹H-Domäne und das C-3 Signal der Sialinsäure bei 40.0 ppm in der ¹³C-Domäne

H C	Sia	Gal	β-Glc
1	-	4.267	4.388
	174.544	102.587	98.629
2	-	3.282	2.993
	100.225	69.918	74.182
3a	1.533	3.848 75.853	3.348 74.448
3e	40.000		
4	2.472	3.682 67.884	3.407 78.282
	40.000		
5	3.326	3.424 75.572	3.424 75.632
	68.689		
6a	3.572	3.441 61.619	3.691 60.316
6b	52.078		
7	3.340	3.441 61.619	3.547 60.316
	73.114		
8	3.306	3.441 61.619	3.547 60.316
	68.433		
9a	3.617	3.441 61.619	3.547 60.316
	72.346		
9b	3.595	3.441 61.619	3.547 60.316
	62.902		
	3.344		
	62.902		

Tabelle 4: Zuordnung für Sia-2,3-Gal-1,3-GalOCH₂CH₂SiMe₃ in D₂O. Temperatur = 285K, kalibriert auf die Trimethylsilylgruppe bei -0.25 ppm in der ¹H-Domäne und das C-5 Signal der reduzierenden Galactose bei 74.8 ppm in der ¹³C-Domäne

H C	Sia	Gal	Gal
1	-	4.415	4.206
	174.023	104.213	101.703
2	-	3.370	3.365
	99.757	69.710	69.710
3a	1.530 *	3.852 75.575	3.546 82.712
3e	2.483 *		
4	3.396	3.680	3.937
	68.614	67.403	68.559
5	3.584	3.419	3.433
	51.663	74.880	74.800
6a	3.344	3.451	3.451
		60.976	60.976
6b	72.937	3.451	3.451
		60.976	60.976
7	3.322 68.049		
8	3.609		
	72.040		
9a	3.594		
	62.508		
9b	3.353		
	62.508		
SiMe₃-CH₂^a		0.71 / 0.817 17.776	
-O-CH₂^b		3.494 / 3.794 68.424	
NHAc Me		1.797 *	
SiMe₃		-0.25 *	

* die chemische Verschiebung konnte nicht ermittelt werden, da die Signale im Spektrum nicht sichtbar waren.

Tabelle 5: Zuordnung für Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAcOCH₂CH₂SiMe₃ in D₂O. Temperatur = 285K, kalibriert auf die Trimethylsilylgruppe bei -0.25 ppm in der ¹H-Domäne und das C-1 Signal von GalNAc bei 100.0 ppm in der ¹³C-Domäne.

H C	Sia	Gal	GalNAc
1	-	4.252	4.273
	173.522	104.146	100.000
2	-	3.274	3.756
	99.103	68.418	50.377
3a	1.534	3.817 74.975	3.569 80.020
	39.653		
3e	2.487	3.673 66.706	3.923 67.356
	39.653		
4	3.410	3.381 74.130	3.432 74.124
	67.983		
5	3.594	3.500 60.159	3.479 59.831
	51.051		
6a	3.346	3.448 60.159	3.479 59.831
	72.075		
6b	3.345	3.409 61.754	3.479 61.754
	67.343		
7	3.624	3.409 61.754	3.479 61.754
	71.319		
8	3.597	3.409 61.754	3.479 61.754
	61.754		
9a	3.409	3.409 61.754	3.479 61.754
	61.754		
9b	3.409	3.409 61.754	3.479 61.754
	61.754		
SiMe3-CH₂^a			0.739 / 0.609 *
-O-CH₂^b			3.441 / 3.813 67.775
NHAc Me	1.767	3.409 61.754	3.479 61.754
	21.446		
NHAc CO	-	3.409 61.754	3.479 61.754
	174.381		
SiMe₃			-0.250 *

* die chemische Verschiebung konnte nicht ermittelt werden, da die Signale im Spektrum nicht sichtbar waren.

Tabelle 6: Zuordnung für Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAcOCH₂CH₂SiMe₃ in D₂O. Temperatur = 285K, kalibriert auf die Trimethylsilylgruppe bei -0.25 ppm in der ¹H-Domäne und das C-1 Signal von GalNAc bei 100.0 ppm in der ¹³C-Domäne.

H C	Sia	Gal	GalNAc	2,6 Sia	
1	- 173.473	4.236 104.076	4.258 100.000	- 172.919	
2	- 99.039	3.268 68.742	3.753 50.194	- 99.793	
3a	1.531 38.671	3.812 74.867	3.545 79.912	1.416 39.577	
3e	2.480 38.671			2.454 39.577	
4	3.405 67.897	3.663 66.731	3.938 67.069	3.398 67.577	
5	3.589 50.946	3.379 74.026	3.507 72.394	3.569 50.946	
6a	3.340 72.081	3.476 60.257	3.688 62.722	3.453 71.958	
6b		3.426 60.257	3.347 62.722		
7	3.335 67.244			3.315 67.455	
8	3.645 71.107			3.614 71.107	
9a	3.622 61.867			3.589 61.660	
9b	3.375 61.758			3.375 61.758	
SiMe3-CH₂^a				0.734 / 0.601 *	
-O-CH₂^b				3.455 / 3.791 67.820	
NHAc Me	1.763 *			1.742 *	1.767 *
NHAc CO	- 174.327	- 174.023	- 174.327		
SiMe₃			-0.25 *		

* die chemische Verschiebung konnte nicht ermittelt werden, da die Signale im Spektrum nicht sichtbar waren.

Tabelle 7: Zuordnung für Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalOCH₂CH₂SiMe₃ in D₂O. Temperatur = 285K, kalibriert auf die Trimethylsilylgruppe bei -0.25 ppm in der ¹H-Domäne und das C-1 Signal von der reduzierenden Galactose bei 100.00 ppm in der ¹³C-Domäne.

H C	Sia	Gal	Gal-O-Et-SiMe3	2,6 Sia	
1	- 172.385	4.374 102.589	4.179 100.000	- 171.954	
2	- 98.066	3.356 67.787	3.346 67.787	- 98.509	
3a	1.521 *	3.832 73.798	3.514 81.104	1.387 *	
3e	2.477 *			2.430 *	
4	3.385 66.929	3.655 65.634	3.947 66.499	3.362 66.929	
5	3.574 50.616	3.384 73.395	3.492 71.264	3.545 49.746	
6a	3.338 71.227	3.457 59.190	3.622 61.773	3.422 71.213	
6b		3.386 59.190	3.287 61.773		
7	3.313 66.500			3.289 66.500	
8	3.617 70.348			3.589 70.139	
9a	3.572 60.918			3.572 60.918	
9b	3.344 60.912			3.344 60.912	
SiMe3-CH₂^a				0.794 / 0.693	
-O-CH₂^b				3.763 / 3.488 66.519	
NHAc Me	1.744 *				1.745 *
NHAc CO	- 173.271		- 173.271		
SiMe₃			-0.250 *		

* die chemische Verschiebung konnte nicht ermittelt werden, da die Signale im Spektrum nicht sichtbar waren.

Tabelle 8: Zuordnung für Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac-2,6)(1,2)DidesoxyGal in D₂O. Temperatur = 285K, kalibriert auf die Methylgruppe der Milchsäure bei 1.000 ppm in der ¹H-Domäne und bei 20.000 ppm in der ¹³C-Domäne.

H C	Sia	Gal	diDesoxyGal	Milchsäure
1	- 175.599	4.321 103.073	3.719 / 3.214 67.465	
2	- 101.241	3.265 70.983	1.575 27.189	
3a	1.50 41.385	3.801 77.428	3.739 78.598	
3e	2.450 41.385			
4	3.361 70.108	3.640 69.224	3.756 69.525	
5	3.549 53.402	3.358 76.550	3.344 79.193	
6a	3.303 74.499	3.405 62.587	3.330 71.865	
6b		3.405 62.587	3.189 71.865	
7	3.286 69.813			
8	3.590 73.625			
9a	3.564 64.245			
9b	3.326 64.245			
Me				1.000 20.000
CH				3.540 79.777
NHAc Me	1.718 23.804			
NHAc CO	- *			

* die chemische Verschiebung konnte nicht ermittelt werden, da die Signale im Spektrum nicht sichtbar waren.

Tabelle 9 Zuordnung für 2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid in D₂O mit 20 % TFE. Temperatur = 285K, kalibriert auf die Methylgruppe der N-Acetylgruppe bei 1.8 ppm in der ¹H-Domäne und das C-3 Signal der Sialinsäure bei 38.655 ppm in der ¹³C-Domäne.

H C	Sia	Ba	Bn
1	- *		
2	- *		
3a	1.486 38.655		
3e	2.571 38.655		
4	3.475 66.278		
5	3.608 50.367		
6	3.555 70.687		
7	3.306 68.052		
8	3.579 68.247		
9a	3.585 40.611		
9b	3.258 40.611		
NHAc Me	1.800 21.674		
p-		7.596 126.983	7.092 128.273
o-		7.332 128.706	7.192 128.706
m-		7.416 132.143	7.153 128.279
CH ₂			4.507 / 4.327 65.41

* die chemische Verschiebung konnte nicht ermittelt werden, da die Signale im Spektrum nicht sichtbar waren.

7.9 ÜBERSICHT DER STD PARAMETER

7.9.1 Parameter für die Titrationsen

Ligand	c(MAG)	Überschuss	K _D
Sia-2,3-Gal-1,4-Glc	9 µM	5-150	650 µM
Sia-2,3-Gal-1,3-Gal	8 µM	5-150	390 µM
Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc	8 µM	5-120	820 µM
Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc	9.4 µM	1-41	180 µM
Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal	8 µM	1-40	110 µM
Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc mit K67A	9.72 µM	5-30	110 µM
Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac2,6) (1,2)DidesoxyGal	8.33 µM	3-80	120 µM
2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid	5.6 µM	2-50	22-62 µM

7.9.2 Parameter für die Bestimmung der Bindungsepitope

Ligand	c(MAG)	c(Ligand)	ns	TD ¹ H	TD ¹³ C	lb ¹ H	lb ¹³ C
Sia-2,3-Gal-1,4-Glc	9 µM	2.68 mM	4096	32768	-	1 Hz	-
Sia-2,3-Gal-1,3-Gal	8 µM	2.4 mM	96	4096	512	5 Hz	35 Hz
Sia-2,3-Gal-1,3-GalNAc	8 µM	1.92 mM	208	4096	256	5 Hz	70 Hz
Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)GalNAc	14.9 µM	1.17 mM	112	4096	512	1 Hz	35 Hz
Sia-2,3-Gal-1,3-(Sia-2,6)Gal	6.67 µM	533 µM	160	4096	256	5 Hz	70 Hz
Sia-2,3-Gal-1,3-(S-Lac2,6) (1,2)DidesoxyGal	20.10 µM	1,61 mM	136	4096	256	10 Hz	105 Hz
2-Benzyl, 9-Benzamido-Neuraminosid	5.6 µM	560 µM	4096	32768	-	1.5 Hz	-

8 LITERATUR

1. Ramon y Cajal, S. (1928) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. Oxford Univ. Pres, London. Zitiert nach: Filbin, M.T. (2000) Axon regeneration: Vaccinating against spinal cord injury. *Curr Biol*, **10**, R100-3.
2. National Spinal Cord Injury Association <http://www.spinalcord.org>
3. Benzel, E. C. (2002) Spinal Cord Injury (SCI): Aftermath and Diagnosis, <http://www.spineuniverse.com/displayarticle.php/article1445.html>
4. Fenrich, K. and Gordon, T. (2004) Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. *Can J Neurol Sci*, **31**, 142-56.
5. Tello, F. (1911) La influencia del neurotropismo en la regeneracion de los centros nerviosos. *Trab. Lab. Invest. Biol.*, **9**, 123-159. Zitiert nach: Kapfhammer, J.P. (1997) Axon sprouting in the spinal cord: growth promoting and growth inhibitory mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*, **196**, 417-26.
6. Berry, M., Maxwell, W.L., Logan, A., Mathewson, A., McConnell, P., Ashhurst, D.E. and Thomas, G.H. (1983) Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, **32**, 31-53.
7. Pschyrembel, W. (2002) *Klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 1150-3.
8. Staiger ZNS Vorlesungsreihe, www.anatomie.net
9. Pschyrembel, W. (2002) *Klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 1165.
10. Pschyrembel, W. (2002) *Klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 1468-9.
11. Masuhr, K.F. and Neumann, M. (1996) *Neurologie*. 3. Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart, pp. 349 ff.
12. Kapfhammer, J.P. (1997) Axon sprouting in the spinal cord: growth promoting and growth inhibitory mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*, **196**, 417-26.
13. Schwab, M.E. and Caroni, P. (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci*, **8**, 2381-93.
14. Caroni, P., Savio, T. and Schwab, M.E. (1988) Central nervous system regeneration: oligodendrocytes and myelin as non-permissive substrates for neurite growth. *Prog Brain Res*, **78**, 363-70.
15. Dou, C.L. and Levine, J.M. (1994) Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci*, **14**, 7616-28.
16. Niederost, B.P., Zimmermann, D.R., Schwab, M.E. and Bandtlow, C.E. (1999) Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci*, **19**, 8979-89.

17. Stichel, C.C., Wunderlich, G., Schwab, M.E. and Muller, H.W. (1995) Clearance of myelin constituents and axonal sprouting in the transected postcommissural fornix of the adult rat. *Eur J Neurosci*, **7**, 401-11.
18. Reier, P.J., Stensaas, L.J. and Guth, L. (1983) *Spinal Cord Reconstruction*. Raven Press, New York.
19. Rudge, J.S. and Silver, J. (1990) Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci*, **10**, 3594-603.
20. Shearer, M.C. and Fawcett, J.W. (2001) The astrocyte/meningeal cell interface--a barrier to successful nerve regeneration? *Cell Tissue Res*, **305**, 267-73.
21. Bregman, B.S. (1998) Regeneration in the spinal cord. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 800-7.
22. Filbin, M.T. (2000) Axon regeneration: Vaccinating against spinal cord injury. *Curr Biol*, **10**, R100-3.
23. Aquino, D.A., Margolis, R.U. and Margolis, R.K. (1984) Immunocytochemical localization of a chondroitin sulfate proteoglycan in nervous tissue. I. Adult brain, retina, and peripheral nerve. *J Cell Biol*, **99**, 1117-29.
24. Yamada, H., Fredette, B., Shitara, K., Hagihara, K., Miura, R., Ranscht, B., Stallcup, W.B. and Yamaguchi, Y. (1997) The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *J Neurosci*, **17**, 7784-95.
25. Meyer-Puttlitz, B., Junker, E., Margolis, R.U. and Margolis, R.K. (1996) Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol*, **366**, 44-54.
26. Alonso, G. and Privat, A. (1993) Neuropeptide Y-producing neurons of the arcuate nucleus regenerate axons after surgical deafferentation of the mediobasal hypothalamus. *J Neurosci Res*, **34**, 510-22.
27. Stichel, C.C. and Muller, H.W. (1994) Relationship between injury-induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain. *J Neurocytol*, **23**, 615-30.
28. Frisen, J., Fried, K., Sjogren, A.M. and Risling, M. (1993) Growth of ascending spinal axons in CNS scar tissue. *Int J Dev Neurosci*, **11**, 461-75.
29. Li, Y. and Raisman, G. (1995) Sprouts from cut corticospinal axons persist in the presence of astrocytic scarring in long-term lesions of the adult rat spinal cord. *Exp Neurol*, **134**, 102-11.
30. Stichel, C.C., Hermanns, S., Luhmann, H.J., Lausberg, F., Niermann, H., D'Urso, D., Servos, G., Hartwig, H.G. and Muller, H.W. (1999) Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur J Neurosci*, **11**, 632-46.
31. Davies, S.J., Goucher, D.R., Doller, C. and Silver, J. (1999) Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*, **19**, 5810-22.
32. Stryer, L. (1996) *Biochemie*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp. 289.
33. Caroni, P. and Schwab, M.E. (1988) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol*, **106**, 1281-8.

34. Caroni, P. and Schwab, M.E. (1988) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, **1**, 85-96.
35. Chen, M.S., Huber, A.B., van der Haar, M.E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F. and Schwab, M.E. (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, **403**, 434-9.
36. GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T. and Strittmatter, S.M. (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*, **403**, 439-44.
37. McKerracher, L., David, S., Jackson, D.L., Kottis, V., Dunn, R.J. and Braun, P.E. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron*, **13**, 805-11.
38. Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F.S., Crocker, P.R. and Filbin, M.T. (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*, **13**, 757-67.
39. Kottis, V., Thibault, P., Mikol, D., Xiao, Z.C., Zhang, R., Dergham, P. and Braun, P.E. (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem*, **82**, 1566-9.
40. Wang, K.C., Koprivica, V., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R.L. and He, Z. (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*, **417**, 941-4.
41. Ramon y Cajal, S. (1909) *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine, Paris. Zitiert nach: Tennyson, V.M. (1970) The fine structure of the axon and growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo. *J Cell Biol*, **44**, 62-79.
42. Fawcett, J.W., Rokos, J. and Bakst, I. (1989) Oligodendrocytes repel axons and cause axonal growth cone collapse. *J Cell Sci*, **92 (Pt 1)**, 93-100.
43. Prinjha, R., Moore, S.E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D.L. and Walsh, F.S. (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature*, **403**, 383-4.
44. Fournier, A.E., GrandPre, T. and Strittmatter, S.M. (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*, **409**, 341-6.
45. Domeniconi, M., Cao, Z., Spencer, T., Sivasankaran, R., Wang, K., Nikulina, E., Kimura, N., Cai, H., Deng, K., Gao, Y., He, Z. and Filbin, M. (2002) Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron*, **35**, 283-90.
46. Liu, B.P., Fournier, A., GrandPre, T. and Strittmatter, S.M. (2002) Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science*, **297**, 1190-3.
47. Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R. and He, Z. (2002) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, **420**, 74-8.
48. Wong, S.T., Henley, J.R., Kanning, K.C., Huang, K.H., Bothwell, M. and Poo, M.M. (2002) A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci*, **5**, 1302-8.

49. Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R.L., McCoy, J.M. and Pepinsky, R.B. (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, **7**, 221-8.
50. Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629-35.
51. Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. and Moolenaar, W.H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol*, **126**, 801-10.
52. Tigyi, G., Fischer, D.J., Sebok, A., Yang, C., Dyer, D.L. and Miledi, R. (1996) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho. *J Neurochem*, **66**, 537-48.
53. Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A. and Negishi, M. (1998) p160 RhoA-binding kinase ROK α induces neurite retraction. *J Biol Chem*, **273**, 2489-92.
54. Mackay, D.J., Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) The Rho's progress: a potential role during neuritogenesis for the Rho family of GTPases. *Trends Neurosci*, **18**, 496-501.
55. Leeuwen, F.N., Kain, H.E., Kammen, R.A., Michiels, F., Kranenburg, O.W. and Collard, J.G. (1997) The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol*, **139**, 797-807.
56. Mackay, D.J. and Hall, A. (1998) Rho GTPases. *J Biol Chem*, **273**, 20685-8.
57. Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G. and McKerracher, L. (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci*, **19**, 7537-47.
58. Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B.S. and Filbin, M.T. (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci*, **21**, 4731-9.
59. Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. and Bertoglio, J. (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J*, **15**, 510-9.
60. Johnson, P.W., Abramow-Newerly, W., Seilheimer, B., Sadoul, R., Tropak, M.B., Arquint, M., Dunn, R.J., Schachner, M. and Roder, J.C. (1989) Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function. *Neuron*, **3**, 377-85.
61. Hasegawa, Y., Fujitani, M., Hata, K., Tohyama, M., Yamagishi, S. and Yamashita, T. (2004) Promotion of axon regeneration by myelin-associated glycoprotein and Nogo through divergent signals downstream of Gi/G. *J Neurosci*, **24**, 6826-32.
62. Jones, L.L., Oudega, M., Bunge, M.B. and Tuszynski, M.H. (2001) Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol*, **533**, 83-9.
63. Ramer, M.S., Priestley, J.V. and McMahon, S.B. (2000) Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature*, **403**, 312-6.

-
64. Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y.A. and Schwab, M.E. (1994) Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature*, **367**, 170-3.
 65. Bradbury, E.J., King, V.R., Simmons, L.J., Priestley, J.V. and McMahon, S.B. (1998) NT-3, but not BDNF, prevents atrophy and death of axotomized spinal cord projection neurons. *Eur J Neurosci*, **10**, 3058-68.
 66. Frail, D.E. and Braun, P.E. (1984) Two developmentally regulated messenger RNAs differing in their coding region may exist for the myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem*, **259**, 14857-62.
 67. Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M. and Martini, R. (1995) Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity. *Eur J Neurosci*, **7**, 511-5.
 68. Spagnol, G., Williams, M., Srinivasan, J., Golier, J., Bauer, D., Lebo, R.V. and Latov, N. (1989) Molecular cloning of human myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci Res*, **24**, 137-42.
 69. Stebbins, J.W., Jaffe, H., Fales, H.M. and Moller, J.R. (1997) Determination of a native proteolytic site in myelin-associated glycoprotein. *Biochemistry*, **36**, 2221-6.
 70. Salzer, J.L., Holmes, W.P. and Colman, D.R. (1987) The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol*, **104**, 957-65.
 71. Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M.T., Tang, S., de Bellard, M.E., Schnaar, R.L., Mahoney, J.A., Hartnell, A., Bradfield, P. and et, a.l. (1994) Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol*, **4**, 965-72.
 72. Yang, L.J., Zeller, C.B., Shaper, N.L., Kiso, M., Hasegawa, A., Shapiro, R.E. and Schnaar, R.L. (1996) Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 814-8.
 73. Vinson, M., van der Merwe, P.A., Kelm, S., May, A., Jones, E.Y. and Crocker, P.R. (1996) Characterization of the sialic acid-binding site in sialoadhesin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **271**, 9267-72.
 74. May, A.P., Robinson, R.C., Vinson, M., Crocker, P.R. and Jones, E.Y. (1998) Crystal structure of the N-terminal domain of sialoadhesin in complex with 3' sialyllactose at 1.85 Å resolution. *Mol Cell*, **1**, 719-28.
 75. May, A.P., Robinson, R.C., Aplin, R.T., Bradfield, P., Crocker, P.R. and Jones, E.Y. (1997) Expression, crystallization, and preliminary X-ray analysis of a sialic acid-binding fragment of sialoadhesin in the presence and absence of ligand. *Protein Sci*, **6**, 717-21.
 76. Tang, S., Shen, Y.J., DeBellard, M.E., Mukhopadhyay, G., Salzer, J.L., Crocker, P.R. and Filbin, M.T. (1997) Myelin-associated glycoprotein interacts with neurons via a sialic acid binding site at ARG118 and a distinct neurite inhibition site. *J Cell Biol*, **138**, 1355-66.
 77. Vyas, A.A., Patel, H.V., Fromholt, S.E., Heffer-Lauc, M., Vyas, K.A., Dang, J., Schachner, M. and Schnaar, R.L. (2002) Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8412-7.

78. Vinson, M., Strijbos, P.J., Rowles, A., Facci, L., Moore, S.E., Simmons, D.L. and Walsh, F.S. (2001) Myelin-associated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *J Biol Chem*, **276**, 20280-5.
79. Yamashita, T., Higuchi, H. and Tohyama, M. (2002) The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol*, **157**, 565-70.
80. DeBellard, M.E., Tang, S., Mukhopadhyay, G., Shen, Y.J. and Filbin, M.T. (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol Cell Neurosci*, **7**, 89-101.
81. Mayer, M. and Meyer, B. (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc*, **123**, 6108-17.
82. Mayer, M. and Meyer, B. (1999) Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1784-88.
83. Meyer, B. and Peters, T. (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 864-90.
84. Jayalakshmi, V. and Krishna, N.R. (2002) Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J Magn Reson*, **155**, 106-18.
85. Meyer, B., Dependence of the STD effect on kinetic constants of the binding reaction and on NMR relaxation parameters., unpublished work.
86. Goddard, T. D. and Kneller, D. G. (2004) Sparky, University of California, San Francisco .
87. Collins, B.E., Kiso, M., Hasegawa, A., Tropak, M.B., Roder, J.C., Crocker, P.R. and Schnaar, R.L. (1997) Binding specificities of the sialoadhesin family of I-type lectins. Sialic acid linkage and substructure requirements for binding of myelin-associated glycoprotein, Schwann cell myelin protein, and sialoadhesin. *J Biol Chem*, **272**, 16889-95.
88. Kline, P.C. and Serianni, A.S. (1990) ¹H-¹H-internuclear distance measurements in carbohydrates: proton transient nuclear Overhauser enhancement and spin-lattice relaxation in (¹³C)- and (²H)-substituted compounds. *Can J Chem*, **68**, 2171-82.
89. Kelm, S. (2001) Ligands for siglecs. *Results Probl Cell Differ*, **33**, 153-76.
90. Streng, K., Schauer, R., Bovin, N., Hasegawa, A., Ishida, H., Kiso, M. and Kelm, S. (1998) Glycan specificity of myelin-associated glycoprotein and sialoadhesin deduced from interactions with synthetic oligosaccharides. *Eur J Biochem*, **258**, 677-85.
91. Collins, B.E., Yang, L.J., Mukhopadhyay, G., Filbin, M.T., Kiso, M., Hasegawa, A. and Schnaar, R.L. (1997) Sialic acid specificity of myelin-associated glycoprotein binding. *J Biol Chem*, **272**, 1248-55.
92. Avanti Polar Lipids Inc. Preparation of Liposomes, <http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html>
93. Avanti Polar Lipids Inc. The Mini-Extruder, <http://www.avantilipids.com/Extruder.html>

-
94. Sillerud, L.O., Schafer, D.E., Yu, R.K. and Konigsberg, W.H. (1979) Calorimetric properties of mixtures of ganglioside GM1 and dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem*, **254**, 10876-80.
 95. Correa-Freire, M.C., Freire, E., Barenholz, Y., Biltonen, R.L. and Thompson, T.E. (1979) Thermotropic behavior of monoglucocerebroside--dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar liposomes. *Biochemistry*, **18**, 442-5.
 96. Brocca, P., Berthault, P. and Sonnino, S. (1998) Conformation of the oligosaccharide chain of G(M1) ganglioside in a carbohydrate-enriched surface. *Biophys J*, **74**, 309-18.
 97. Ito, M. and Yamagata, T. (1986) A novel glycosphingolipid-degrading enzyme cleaves the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids. *J Biol Chem*, **261**, 14278-82.
 98. Izu, H., Izumi, Y., Kurome, Y., Sano, M., Kondo, A., Kato, I. and Ito, M. (1997) Molecular cloning, expression, and sequence analysis of the endoglycoceramidase II gene from *Rhodococcus* species strain M-777. *J Biol Chem*, **272**, 19846-50.
 99. Ito, M. and Yamagata, T. (1989) Purification and characterization of glycosphingolipid-specific endoglycosidases (endoglycoceramidases) from a mutant strain of *Rhodococcus* sp. Evidence for three molecular species of endoglycoceramidase with different specificities. *J Biol Chem*, **264**, 9510-9.
 100. Huberty, M.C., Vath, J.E., Yu, W. and Martin, S.A. (1993) Site-specific carbohydrate identification in recombinant proteins using MALD-TOF MS. *Anal Chem*, **65**, 2791-800. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
 101. Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
 102. Wong, A.W., Cancilla, M.T., Voss, L.R. and Lebrilla, C.B. (1999) Anion dopant for oligosaccharides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, **71**, 205-11. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
 103. Wong, A.W., Wang, H. and Lebrilla, C.B. (2000) Selection of anionic dopant for quantifying desialylation reactions with MALDI-FTMS. *Anal Chem*, **72**, 1419-25. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
 104. Handa, S. and Nakamura, K. (1984) Modification of sialic acid carboxyl group of ganglioside. *J Biochem (Tokyo)*, **95**, 1323-9. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
 105. Powell, A.K. and Harvey, D.J. (1996) Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **10**, 1027-32. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
 106. Hakomori, S. (1964) A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by Methylsulfinyl carbanion in Dimethyl sulfoxide. *J Biochem (Tokyo)*, **55**, 205-8. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.

107. Daniel, P.F. (1987) Separation of benzoylated oligosaccharides by reversed-phase high-pressure liquid chromatography: application to high-mannose type oligosaccharides. *Methods Enzymol*, **138**, 94-116. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
108. Kuster, B., Wheeler, S.F., Hunter, A.P., Dwek, R.A. and Harvey, D.J. (1997) Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, **250**, 82-101. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
109. Kuster, B., Hunter, A.P., Wheeler, S.F., Dwek, R.A. and Harvey, D.J. (1998) Structural determination of N-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels: application to species-specific glycosylation of alpha1-acid glycoprotein. *Electrophoresis*, **19**, 1950-9. Zitiert nach: Zaia, J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev*, **23**, 161-227.
110. Schnell, L., Fearn, S., Klassen, H., Schwab, M.E. and Perry, V.H. (1999) Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*, **11**, 3648-58.
111. Loeb, G.E. (2001) Learning from the spinal cord. *J Physiol*, **533**, 111-7.

9 APPENDIX

9.1 VERWENDETE PULSPROGRAMME

WATERGATE

```
;p3919gp
;avance-version (00/02/07)
;1D sequence
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., Series A 102, 241 -245
(1993)
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
```

```
1 ze
2 d1 p11:f1
  p1 ph1
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 p118:f1
  p27*0.231 ph3
  d19*2
  p27*0.692 ph3
  d19*2
  p27*1.462 ph3
  d19*2
  p27*1.462 ph4
  d19*2
  p27*0.692 ph4
  d19*2
  p0*0.231 ph4
  46u
  p16:gp1
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  wr #0
exit
```

```

ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;      use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;NS: 8 * n
;DS: 4

```

```

;use gradient ratio:   gp 1 : gp 2
;                      20 : 20

```

```

;for z-only gradients:
;gpz1: 20%
;gpz2: 20%

```

```

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100

```

WATERGATE mit Spinlock

```

;p3919gpsl.mm
;avance-version
;1D sequence
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson., Series A 102, 241 -245
(1993)
;spin locking to suppress protein resonances

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

```

```

1 ze
2 4u BLKGRAD
  d1 p11:f1
  p1 ph1
  20u p110:f1
  p10 ph2
  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 p118:f1
  p28*0.231 ph3
  d19*2
  p28*0.692 ph3
  d19*2
  p28*1.462 ph3
  d19*2
  p28*1.462 ph4
  d19*2
  p28*0.692 ph4
  d19*2
  p0*0.231 ph4
  46u
  p16:gp2
  d16
  go=2 ph31
  wr #0
  4u BLKGRAD
exit

```

```

ph1=0 2
ph2=1 3
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 2 2 0

```

```

;*****POWER LEVEL*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p110 : spin lock power level (10-15 dB)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;
;*****PULSE*****
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;          use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p10 : spin lock pulse (10-15 ms, depending on the protein)
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;

```

```

;*****DELAYS*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;NS: 8 * n
;DS: 4

```

```

;use gradient ratio:   gp 1 : gp 2
;                      20 : 20
;

```

1D STD Spektrum

```

;stdsp
;M. Mayer; B. Meyer, Department of Chemistry
;University of Hamburg, Germany
;email: bernd_meyer@sgi1.chemie.uni-hamburg.de
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan, defined by fq1 list
;define 1H on channel f2 in edasp

```

```

#include <Avance.incl>

```

```

1 ze
2 20u p1:f1
  d7 fq1:f2
3 p11:sp1:f2
  d11
  lo to 3 times l7
  p1 ph1
  go=2 ph31
  wr #0
exit

```

```

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
ph2=1 3 1 3 2 0 2 0
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1

```

```

;*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;

```

```

;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if necessary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;
;presaturation = (p11 + d11) * 17 (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(XXX HZ)
;on frequency list f1.
;NS = 16*n
;DS = 16

```

1D STD Spektrum mit WATERGATE

```

;std19sp
;M. Mayer; B. Meyer, Department of Chemistry
;University of Hamburg, Germany
;email: bernd_meyer@sg1.chemie.uni-hamburg.de
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
;frequency alternates after every scan, defined by fq1list
;water suppression by watergate, use p3919gp to optimize parameters
;define 1H on channel f2 in edasp

```

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

```

```

1 ze
2 20u p11:f1
   d7 fq1:f2
3 p11:sp1:f2
   d11
   lo to 3 times l7
   p1 ph1
   50u UNBLKGRAD
   p16:gp1
   d16 p18:f1
   p28*0.231 ph3
   d19*2
   p28*0.692 ph3
   d19*2

```

```

p28*1.462 ph3
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p0*0.231 ph4
46u
p16:gp2
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
wr #0
exit

```

```

ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 0 2 2

```

```

;*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB)
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;
;*****Pulse*****
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;          use for fine adjustment
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d19 should be around 150-220 usec.
;
;presaturation = (p11 + d11) * 17 (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ)

```

```
;on frequency list f1.  
;NS = 16*n  
;DS = 16  
;use gradient ratio  gp1 : gp2  
;                   20   20
```

1D STD Spektrum mit WATERGATE und Spinlock

```
;std19slsp  
;M. Mayer; B. Meyer, Department of Chemistry  
;University of Hamburg, Germany  
;email: bernd_meyer@sg1.chemie.uni-hamburg.de  
;avance-version  
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list  
;presaturation by shaped pulses  
;frequency alternates after every scan, defined by fq1list  
;spin lock for protein suppression  
;water suppression by watergate, use p3919gp to optimize parameters  
;define 1H on channel f2 in edasp
```

```
#include <Avance.incl>  
#include <Grad.incl>
```

```
1 ze  
2 20u p11:f1  
  d7 fq1:f2  
3 p11:sp1:f2  
  d11  
  lo to 3 times l7  
  p1 ph1  
  20u p110:f1  
  p10 ph2  
  50u UNBLKGRAD  
  p16:gp1  
  d16 p118:f1  
  p28*0.231 ph3  
  d19*2  
  p28*0.692 ph3  
  d19*2  
  p28*1.462 ph3  
  d19*2  
  p28*1.462 ph4  
  d19*2  
  p28*0.692 ph4  
  d19*2  
  p0*0.231 ph4  
  46u  
  p16:gp2
```



```

d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
wr #0
exit

```

```

ph1=0 2
ph2=1 3
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph31=0 0 2 2

```

```

;*****Power Level*****
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate 12dB)
;p110 : f1 channel - power level for spin lock pulse (10-15 dB)
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;between 50 - 60 dB depending on protein and ligand
;
;*****Pulse*****
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;      use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p10 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the protein)
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;*****Delays*****
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min 20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d19 should be around 150-220 usec.
;
;presaturation = (p11 + d11) * 17 (presaturation should be around 2 sec)
;
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
;O 499.87000 off resonance 1x(15-20000 HZ) on resonance 1x(xxx HZ)
;on frequency list f1.
;NS = 16*n
;DS = 16
;use gradient ratio  gp1 : gp2
;                    20   20

```

2D STD HSQC

```
;stdiitgpsi.mul
;avance-version (02/05/09)
;STD-HSQC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer using sensitivity improvement
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;with decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance, J. Magn. Reson. 93, 151-170 (1991)
;L.E. Kay, P. Keifer & T. Saarinen, J. Am. Chem. Soc. 114, 10663-5 (1992)
;J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky,
; S.J. Glaser, O.W. Sorensen & C. Griesinger, J. Biomol. NMR 4,
; 301-306 (1994)
;
;STD sequence on and off resonance recorded interleaved spectra.
;Frequency alternates after each increment
;Requires 2 frequency lists!!!
;See comments at the end of the file!!
;CHECK CAREFULLY YOUR SETTING FOR TD
;Written by A.J.Benie
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
```

```
"p4=p3*2"
```

```
"d0=3u"
```

```
"d4=1s/(cnst2*4)"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d13=4u"
```

```
"DELTA=p16+d16+50u+p2+d0*2"
```

```
"DELTA1=d13+p16+d16+4u"
```

```
"l0=0"
```

```
l ze
```

```

d11 p12:f2
2 d1 do:f2
      ;when l0 is odd perform on resoance spectra
if "l0 %2 == 1" goto 100
      ;perform off resoance spectra

d12 fq1:f1
5 p11:sp1:f1
d31
lo to 5 times l6
d12 fq1:f1
      ;jump past on resoance stuff

goto 101
      ;perform on resoance spectra

100 d12 fq2:f1
6 p11:sp1:f1
d31
lo to 6 times l6
d12 fq2:f1
101 d13
      ;end of STD stuffff

3 (p1 ph1)
d4 p12:f2
(p2 ph1) (p4 ph6):f2
d4
; p28 ph1 KEINE TRIMPULSE AUF CRYOKOPF !!!!!!!!!!!!!!!
d13
(p1 ph2) (p3 ph3):f2
d0
p2 ph7
d0
50u UNBLKGRAD
p16:gp1*EA
d16
(p4 ph4):f2
DELTA
(p1 ph1) (p3 ph4):f2
d24
(p2 ph1) (p4 ph1):f2
d24
(p1 ph2) (p3 ph5):f2
d4
(p2 ph1) (p4 ph1):f2
d4
(p1 ph1)
DELTA1
(p2 ph1)
d13
p16:gp2

```

```

d16 pl12:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
  F1I(iu0, 2)
  F1EA(igrad EA & ip5*2, id0 & ip3*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit

```

```

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0
ph7=0 0 2 2
ph31=0 2 2 0

```

```

;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;pl12: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;sp1: f1 channel - shaped pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - trim pulse
;d0 : incremented delay (2D)           [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O                [30 msec]
;d13: short delay                       [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d24: 1/(4J)XH for XH
;      1/(8J)XH for all multiplicities
;d31: delay between pulses for saturation
;l6 : overall irradiation time: (p11+d31) * l6
;cnst2: = J(XH)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: >= 16
;td1: total number of experiments
;      = number of experiments for each 2D*2
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

```

```
;use gradient ratio:  gp 1 : gp 2  
;                    80 : 20.1  for C-13  
;                    80 : 8.1   for N-15
```

```
;for z-only gradients:  
;gpz1: 80%  
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15
```

```
;use gradient files:  
;gpnam1: SINE.100  
;gpnam2: SINE.100
```

```
;define FQ1LIST (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/fl")  
;O spectrometer freq for 1H  
;off resonance freq  
;H2O freq  
;define FQ2LIST (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/fl")  
;O spectrometer freq for 1H  
;on resonance freq  
;H2O freq
```

```
;use AU-program splitinvnoe to seperate On and Off resoance spectra into different datasets  
;use AU-program 2dstd.mul to subtract On and Off spectra from one another
```

9.2 LEBENS LAUF

Geburtstag 31. Januar 1975

Geburtsort Hamburg

Nationalität Süd-Koreanisch

Ausbildung

1981 – 1985 Grundschule am Falkenberg, Hamburg

1985 – 1994 Friedrich-Ebert-Gymnasium, Hamburg

Jun. 1994 Abitur (Note: 2.1)

Okt. 1994 - Jun. 2000 Universität Hamburg, Fachrichtung Chemie

Sept. 1996 Diplomvorprüfung (Note: gut)

Okt. 1999 - Jun 2000 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. B. Meyer

Synthese eines CD4 bindenden Glycopeptids aus dem Glycoprotein gp120 des HIV

Jun. 2000 Diplomprüfung (Note: sehr gut)

Sept. 2000 – Dez. 2004 Dissertation am Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. B. Meyer

Analyse der Bindung von Gangliosid-Derivaten an das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG)

Anstellungsverhältnisse

1995 - 1996	Tutorien im Rahmen der Studieneingangsphase für Studienanfänger
1997 – 1999	Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Molekulare Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Universität Hamburg
2000 – 2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie

Veröffentlichungen

Shin, S., Gäthje, H., Schwardt, O., Ernst, B., Kelm, S., Meyer, B., Analysis of Specificity and Epitope of Ganglioside Oligosaccharides Binding to Myelin Associated Glycoprotein (MAG) by Saturation Transfer Difference NMR, submitted to Glycobiology

Schwardt, O., Gao, G., Kelm, S., Gäthje, H., Meyer, B., Shin, S., Peters, T., Bhunia, A., Ernst, B., Synthetic Sialic Acid Containing Oligosaccharides to Explore the Binding Site of the Myelin-associated Glycoprotein (MAG), submitted to JACS

Shin, S., Gäthje, H., Schwardt, O., Ernst, B., Kelm, S., Meyer, B., in preparation

Posterpräsentationen

Shin, S., Gäthje, H., Kelm, S., Meyer, B., **Binding Specificity of Myelin Associated Glycoprotein (MAG) by Saturation Transfer Difference-NMR Spectroscopy**, 2nd Internationales Symposium on Conformational Control of Biomolecular Function, Lübeck, October 2001

Shin, S., Gao, G., Gähje, H., Schwardt, O., Ernst, B., Kelm, S., Meyer, B., **Analysis of Binding Specificity of Oligosaccharides to Myelin Associated Glycoprotein (MAG) by Saturation Transfer Difference-NMR Spectroscopy**, 3rd International Symposium on Conformational Control of Biomolecular Function, Velen, May 2003

Shin, S., Gao, G., Gähje, H., Schwardt, O., Shelke, S., Ernst, B., Kelm, S., Meyer, B., **Analysis of Binding Specificity of Sialic Acid derivatives to Myelin Associated Glycoprotein (MAG) by Saturation Transfer Difference-NMR**, Lilly MedChem Workshop, Hamburg, July 2003

Shin, S., Gao, G., Gähje, H., Schwardt, O., Shelke, S., Ernst, B., Kelm, S., Meyer, B., **Analysis of Binding Specificity of Sialic Acid derivatives to Myelin Associated Glycoprotein (MAG) by Saturation Transfer Difference-NMR**, 25. Diskussionstagung der GDCh-Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie, Leipzig, October 2003

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung von einigen Personen, denen ich hiermit herzlich danken möchte.

Robert Meinecke und Heiko Möller, die immer ein offenes Ohr für viele NMR Fragen hatten.

Birgit Claasen, Britta Hünnefeld, Atilla Coksezen und Kolja Klein: Die die beiden NMR Geräte betreut haben und mir vielfach geholfen haben.

Jan Westermann, für die Hilfe mit Sybyl.

Mirko Lindner und Dr. Edzard Spillner für ihre Hilfe bei den biochemischen Aspekten der Arbeit.

Stefanie Derlin und Carsten Brandt, die mir bei den Experimenten zur Gangliosidspaltung und Liposomensynthese geholfen haben.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Soerge Kelm und dabei insbesondere Heiko Gäthje für die Expression von MAG und für viele Hilfestellungen bei Problemen mit dem Protein.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Ernst, dabei insbesondere Oliver Schwardt, Ganpan Gao und Sachin Shelke für das Synthetisieren und zur Verfügung stellen der Liganden.

Dr. Andrew J. Benie für das Schreiben des Pulsprogrammes für das STD HSQC und Hilfestellungen.

Anirban Bhunia und Prof. Dr. Thomas Peters für das Homologiemodell

Dem gesamten Arbeitskreis Meyer für die schöne und anregende Zeit.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg den 20. Januar 2005

So-Young Shin