

**DER EINFLUß CYCLISCHER RGD-PEPTIDE AUF DIE
WECHSELWIRKUNG FIBRONECTIN-INTEGRIN $\alpha_5\beta_1$**

Bei der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld eingereichte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor Rerum Naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dunja Zimmermann geboren am
19. Februar 1973 in Bielefeld

Herzebrock-Clarholz im November 2003

*Auch auf steinigen Pfaden blühen Blumen.
(I. Erath)*

Meinen Eltern und Michael

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2000 bis November 2003 an der Fakultät für Chemie an der Universität Bielefeld unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. N. Sewald angefertigt.

Danksagung

Mein Dank gilt als Erstes Herrn Prof. Dr. N. Sewald für das interessante Thema und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Seine Entschlussfreudigkeit und sein entgegengebrachtes Vertrauen haben es ermöglicht, alle organisatorischen sowie fachlichen Probleme schnell zu lösen.

Dr. Katherina Sewald möchte ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den SPR-Experimenten und allen biochemischen Fragen herzlich danken. Sie hat mir häufig Mut gemacht und mir wichtige Wege aus vermeintlichen Sackgassen aufgezeigt.

Anke Nieß, Miroslav Malesevic, Annett Müller, Christian Riedel und Marco Wissbrock danke ich für die Synthese und Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe OC III für das gute Arbeitsklima und die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Tanja Beschnitt, Kai Jenssen, Michael Kahler und Sylwia Urman danke ich für das kritische und sorgfältige Lesen dieses Manuskriptes, sowie für ihre Anregungen und Kommentare, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Tanja Beschnitt und Daniela Lindemeier für ihre unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente und die angenehme Arbeitsatmosphäre im „Biolabor“.

Darüber hinaus möchte ich Carolin Heggemann für ihre Mitarbeit an diesem Projekt danken. Die während ihres Blockpraktikums erzielten Ergebnisse waren ein wichtiger Beitrag.

Außerdem danke ich Prof. Dr. J. Frey und seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei den FACS-Messungen und ihre „Starthilfe“ bei der Zellkultur. An dieser Stelle möchte ich besonders Christina Geerds danken, die mir den Einstieg in die Zellkultur erleichtert hat.

Bei Dr. J. Bartsch und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für ihre Hilfe bei der RT-PCR-Analyse bedanken und dafür, dass ich für einige Wochen in ihrem Zellkulturlabor zu Gast sein durfte. Hierbei gilt mein besonderer Dank Dirk Wildeboer und Angela Perz.

Prof. Dr. J. Wienands und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die „Starthilfe“ bei der Western-Blotting-Analyse, sowie die Möglichkeit zur Nutzung der Ultrazentrifuge und des Ultraschallstabes.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Ulf Brüggemeier und Dr. Michael D. Pierschbacher für die Protokolle zum Mikrotiterplatten-basierten $\alpha_v\beta_3$ Integrin-Bindungstest.

Dem Sonderforschungsbereich 549 (Prozessierung und Signalwirkung extrazellulärer Makromoleküle) danke ich für seine finanzielle Unterstützung.

Zum Schluss möchte den Menschen danken, ohne die ich diesen Weg nicht gegangen wäre: meinen Eltern und Michael. Meine Eltern haben mich während des Studiums und der letzten drei Jahre bedingungslos unterstützt und sind mit ihrer Liebe und Gelassenheit mein(e) Fels(en) in der Brandung. Michael danke ich für seine Geduld, seine Liebe und dafür, dass er mir auch in schwierigen Situationen immer wieder Mut gemacht hat.

1	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	1
1.1	Allgemein	1
1.2	Aminosäuren	3
1.3	DNA- und RNA-Basen	4
2	<u>Allgemeiner Teil</u>	5
2.1	Zellen und ihre Organisation in Geweben	5
2.2	Formen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion	5
2.3	Integrine	6
2.3.1	Integrine und ihre Liganden	10
2.3.2	Signalübertragung durch Integrine	11
2.4	Das $\alpha_5\beta_1$ Integrin als klassischer Fibronectin-Rezeptor	13
2.4.1	Die Rolle des $\alpha_5\beta_1$ Integrins in biologischen Prozessen	15
2.5	Zellen in Kultur	16
2.5.1	K562 als Modellzelllinie für das $\alpha_5\beta_1$ Integrin	18
2.5.2	Aktivierungsstadien des Integrins $\alpha_5\beta_1$	19
2.6	Die RGD-Sequenz	20
3	<u>Zielsetzung</u>	23
4	<u>Materialien</u>	24
4.1	Technische Ausrüstung	24
4.1.1	Materialien für die Zellkultur	24
4.1.2	Sonstige Materialien	25
4.1.3	Software	27
4.2	Chemikalien	28
4.3	Reagenzien für die Zellkultur	29
4.3.1	Zelllinien	29
4.3.2	Sonstige Reagenzien	30
4.4	Reagenzien für die Molekularbiologie	30
4.4.1	Primer	30
4.4.2	Sonstige Reagenzien	31
4.5	Antikörper	31
4.5.1	Antikörper für Western Blotting	31
4.5.2	Antikörper für Durchflusszytometrie	32

4.6	Proteine, Standards, Kits	32
4.6.1	Proteine	32
4.6.2	Standards	33
4.6.3	Kits	33
4.7	Peptide	34
4.8	Puffer - und Salzlösungen	35
5	Methoden	36
5.1	Zellkultur	36
5.1.1	Allgemeine Hinweise zur Steriltechnik	36
5.1.2	Auftauen von gefrorenen Zellkulturen	36
5.2.3	Die Kultivierung humaner Zelllinien	37
5.2.4	Einfrieren und Lagerung humaner Zelllinien	38
5.2.5	Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer (Hämocytometer)	39
5.2.6	Trypanblaufärbung als Vitalfärbung	39
5.2.7	Sporenfärbung nach Rakette	40
5.2	Durchflusszytometrie	41
5.2.1	Charakterisierung der M21 Zellen	42
5.2.2	K562 Zellen: Überprüfung der Integrinexpression und der Integrinaktivität	43
5.2.3	Kompetitionsexperimente mit K562 Zellen	44
5.2.4	Durchführung und Auswertung der FACS-Messung	44
5.3	Der Zelladhäsionstest	45
5.3.1	Testauswertung	47
5.4	Proteinchemische Methoden	47
5.4.1	Zellaufschluss und Herstellung von Membranextrakten	47
5.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	50
5.4.3	Seminative Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
5.4.4	Proteinfällung mit organischen Substanzen	56
5.4.5	Quantitative Proteinbestimmung	57
5.5	Immunchemische Methoden	58
5.5.1	Western Blotting	58
5.6	Molekularbiologische Methoden	63
5.6.1	Isolierung der Gesamt-RNA	63
5.6.2	Reverse Transkription	64
5.6.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	64
5.6.4	Agarose-Gelelektrophorese	65
5.7	Oberflächenplasmonresonanz	66
5.7.1	Prinzipien der Oberflächenplasmonresonanz	67
5.7.2	Applikationen der Oberflächenplasmonresonanz	68
5.7.3	Experimente mit K562 Zellen	69
5.7.4	Experimente mit Membranextrakten aus K562 Zellen	71
5.7.5	Auswertung der Experimente	74

5.8	Mikrotiterplatten-basierter Integrin-Bindungstest	74
5.8.1	Biotinylierung des Fibronectins	74
5.8.2	Mikrotiterplatten-basierter Bindungstest für das $\alpha_5\beta_1$ Integrin	75
6	<u>Resultate und Diskussion</u>	77
6.1	Durchflusszytometrie	77
6.1.1	Charakterisierung der M21 Zellen	77
6.1.2	K562: Überprüfung der Integrinexpression und der Integrinaktivität	79
6.1.3	Kompetitionsassay zur Untersuchung des Inhibierungspotenzials cyclischer RGD-Peptide	81
6.2	Zelladhäsionstest	83
6.2.1	Vorexperimente	84
6.2.2	Aktivitätsstudien zum Integrin $\alpha_5\beta_1$	85
6.2.3	Zelladhäsionstest zur Untersuchung der inhibierenden Eigenschaften von Peptiden	87
6.3	Die Anreicherung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins	91
6.3.1	Verfahren zur Anreicherung integrinhaltiger Membranextrakte	92
6.3.2	Quantifizierung des angereicherten Integrins	95
6.4	Oberflächenplasmonresonanz	97
6.4.1	Immobilisierung von Fibronectin über Aminokupplung	97
6.4.2	Bindungsexperimente mit intakten K562 Zellen	100
6.4.3	Interaktionsstudien mit Membranextrakten	103
6.4.4	Kompetitionsexperimente mit cyclischen Peptiden	105
6.4.5	Elutionsexperimente mit cyclischen Peptiden	107
6.4.6	Immobilisierung von M220 via Aminokupplung	108
6.4.7	Interaktionsstudien am M220 -Chip	110
6.4.8	Kompetitionsexperimente in Lösung	112
6.5	Analyse der Integrinexpression durch Reverse-Transkriptase-PCR	113
6.6	Immunchemische Analyse der Integrinexpression	117
6.5	Mikrotiterplatten-basierter Integrin-Bindungstest	120
6.5.1	Mikrotiterplatten-basierter $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Bindungstest zur Evaluierung des inhibitorischen Potenzials cyclischer RGD-Peptide	120
7	<u>Zusammenfassung</u>	124
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	130

1 Abkürzungsverzeichnis

1.1 Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B ₅₀	Substanzkonzentration, die zur 50 %igen Elution einer gebundenen Komponente führt
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DFZ	Durchflusszytometrie
d-NTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
Fc-Fragment	Antikörperfragment mit konstanter Sequenz
FCS	Fötales Kälberserum
Fn	Fibronectin

GMP	Gute Mikrobiologische Praxis
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HBS	HEPES gepufferte Lösung
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
I.A.Z.	Institut für angewandte Zellkultur
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration von 50 %
kD	Kilodalton
M	molar, Mol pro Liter
MALDI	<i>matrix assisted desorption ionization</i>
MAP	mikrotubuliassoziiertes Protein
ME	Membranextrakt
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-RNA
NHS	N-Hydroxysuccinimid
β-OG	Octyl-β-D-glucopyranosid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Ponceau S	(3-Hydroxy-4-[2-sulfo-phenylazo]phenylazo)- 2,7-naphthalindisulfonsäure)
PtdIns	Phosphatidyl-Inositol
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
RU	<i>response units</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin

TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
(v/v)	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
VLA	<i>very late (activated) antigen</i>
(w/v)	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent)
ZAT	Zelladhäsionstest

1.2 Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
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

1.3 DNA- und RNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

2 Allgemeiner Teil

2.1 Zellen und ihre Organisation zu Geweben

Während der Evolution multizellulärer Organismen haben sich spezialisierte Zellen gebildet, die in Geweben oder Organen spezifische Funktionen übernehmen (Bader, 1997). Innerhalb dieser Zellaggregationen bilden die Zellen Verbindungen aus, die einerseits den Verbund stabilisieren und andererseits die Kommunikation zwischen den Zellen ermöglichen.

Bei tierischen Geweben wird der Raum zwischen den Zellen durch die extrazelluläre Matrix (EZM) gefüllt. Sie wird aus von den Zellen sezernierten Proteinen und Polysacchariden gebildet und stabilisiert den Zellverbund. Darüber hinaus fungiert die extrazelluläre Matrix als Reservoir für verschiedene Verbindungen, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung steuern (Lodish et al., 2001).

2.2 Formen der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Interaktion

Die Zelladhäsion wird durch Zelloberflächenproteine vermittelt (*CAMs* für *Cell Adhesion Molecules*), die sich in fünf Hauptklassen einteilen lassen: die Cadherine, die Immuno-Globulin-Superfamilie (Williams, 1987), die Selectine (Lasky, 1992), die Mucine und die Integrine.

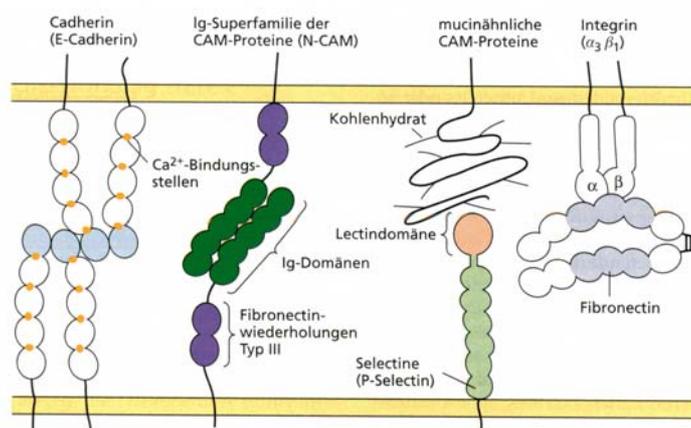


Abb. 1: Zelladhäsionsmoleküle
(Lodish et al., 2001).

Durch das komplizierte Zusammenspiel von Zelloberflächenproteinen und Matrixproteinen kommen die vielfältigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zustande.

Bei den Zell-Zell-Interaktionen kommt den Cadherinen als Calciumabhängige CAMs eine entscheidende Rolle zu (Takeichi, 1991). Die Menge und Art der Cadherine auf den Zelloberflächen kann bei verschiedenen biologischen und pathologischen Prozessen variieren, wodurch die Zelladhäsion und Zellbeweglichkeit maßgeblich beeinflusst werden.

Spezialformen der Zell-Zell-Interaktion stellen die *tight junctions* und *gap junctions* dar. *Tight junctions* werden durch epitheliale Zellverbände ausgebildet und ermöglichen die vollständige Versiegelung der Zellzwischenräume. Diese Art der interzellulären Wechselwirkung ist z. B. für die Auskleidung des Dünndarms von Bedeutung. *Gap junctions* zeichnen sich durch spezielle Verknüpfungsstellen zwischen den Zellmembranen aus, die eine kleine Lücke aufweisen und so einen Stoffaustausch zwischen den Zellen ermöglichen. So wird z. B. durch den Austausch von als *second messenger* wirkender Substanzen eine effiziente hormonelle Stimulierung von Zellen möglich (Lodish *et al.*, 2001).

Zell-Matrix-Interaktionen sind nicht nur für die Stabilität des Gewebes, sondern auch für die Wanderung von Zellen und die Aktivierung von Signaltransduktionswegen von Bedeutung. Sie werden überwiegend durch Vertreter der Integrin-Familie vermittelt, die im Folgenden einer detaillierteren Betrachtungsweise unterzogen werden.

2.3 Integrine

Integrine sind Typ I transmembrane Glykoproteine, die aus einer α -Untereinheit (120 – 180 kD) und einer β -Untereinheit (90 – 110 kD) bestehen. Beide Untereinheiten sind nichtkovalent zu einem Komplex assoziiert (Hynes, 1992). Sie bestehen aus einer großen extrazellulären, einer transmembranen und einer kleinen cytoplasmatischen Domäne. Die einzige Ausnahme bildet die große intrazelluläre Domäne der β_4 -Untereinheit, die auf den Kontakt des Keratin-Cytoskeletts spezialisiert ist und Fibronectin Typ III Domänen enthält (de Pereda *et al.*, 1999).

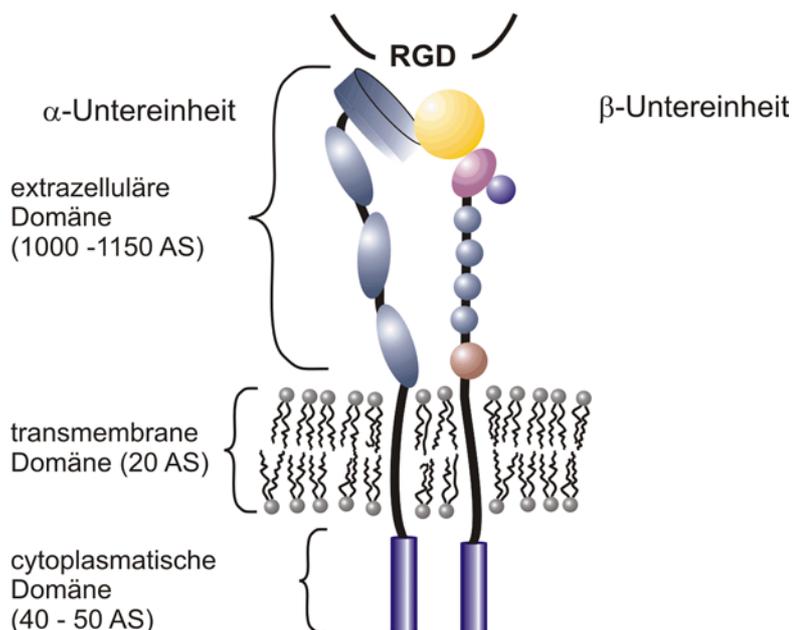


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Integrine.

Für die Ligandenbindung der Integrine ist das globuläre Kopfstück verantwortlich, das durch zwei lange Stelzen-Regionen mit den transmembranen und cytoplasmatischen Domänen verbunden ist.

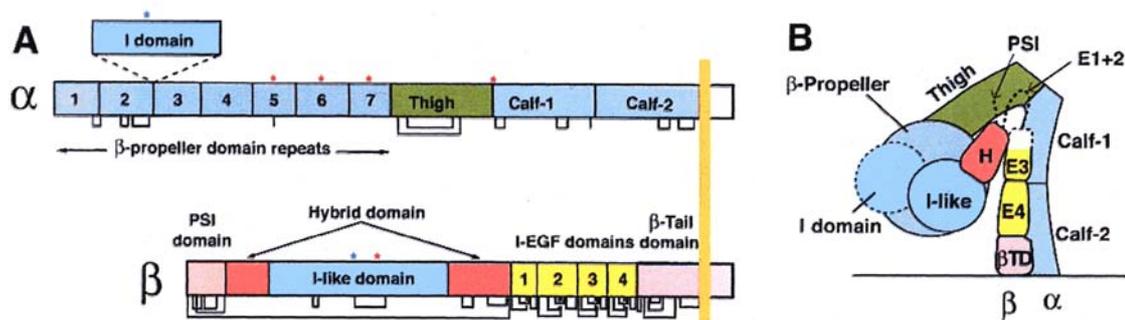


Abb. 3: Die Architektur der Integrine (Takagi & Springer, 2002). In (A) ist die Organisation der Domänen in der Primärstruktur der Integrine dargestellt. Die blauen Sterne markieren Bindungsstellen für Magnesiumionen, die roten Sterne Bindungsstellen für Calciumionen. (B) zeigt die Anordnung der Domänen in der dreidimensionalen Kristallstruktur (Xiong *et al.*, 2001). Die Domänen sind wie in (A) coloriert (Takagi & Springer, 2002).

Die N-terminale Region der α -Untereinheit beinhaltet sieben Segmente, die untereinander eine schwache Homologie aufweisen und in Form einer siebenblättrige β -Propellerdomäne gefaltet sind (Takagi & Springer, 2002).

α -Untereinheiten können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe enthält eine I-Domäne zwischen dem zweiten und dritten Faltblatt der β -Propellerdomäne, während die andere Gruppe eine posttranslationale Spaltstelle in der Nähe der transmembranen Domäne aufweist (Fernandez *et al.*, 1998). Die I-Domäne zeigt eine hohe Homologie zur A-Domäne des von Willebrandfaktors und enthält bei den entsprechenden Integrinen die Hauptbindungsstellen für Liganden (Michishita *et al.*, 1993; Diamond *et al.*, 1993), sowie eine Bindungsstelle für divalente Kationen, die als MIDAS (*Metal Ion-Dependent Adhesion Site*) bezeichnet wird. An die β -Propellerdomäne schließt sich ein Bereich an, der aus drei β -Sandwich-Domänen besteht (*Tight, Calf-1, Calf-2*) und mit der Stelzen-Region korrespondiert (Lu *et al.*, 1998).

Die N-terminale cysteinreiche Region der β -Untereinheit weist Sequenzhomologien mit anderen Membranproteinen auf und wird deshalb als PSI (Plexin, Semaphorin, Integrin)-Domäne bezeichnet (Bork *et al.*, 1999). Sie enthält sieben Cysteinreste und enthält als Strukturelemente zwei α -Helices. β -Untereinheiten enthalten eine Domäne, die eine schwache Homologie zur I-Domäne der α -Untereinheit aufweist und ein Metallbindungsmotiv, ähnlich der MIDAS-Region beinhaltet (Ponting *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1995). Diese I-like-Domäne ist Ziel vieler Punktmutationen, die z. B. bei β_2 -Untereinheiten zu Defekten in der Leukozytenadhäsion führen können. Sie hat darüber hinaus einen großen Einfluss auf die Ligandenbindung. Bei Integrinen, die keine I-Domäne haben, erfolgt die Ligandenbindung direkt über die I-like-Domäne. Bei Integrinen, die eine I-Domäne beinhalten, regulieren sie die Ligandenbindung indirekt. Dieser Einfluss der I-like-Domäne ist möglich, da sich zwischen der β -Propellerdomäne und der I-like-Domäne eine große Schnittstelle befindet (Xiong *et al.*, 2001). Die Hybrid-Domänen sind β -Sandwich-Domänen, die kovalente Verbindungen zur I-like-Domäne aufweisen. Diesen Verbindungen misst man eine gewisse Bedeutung bei Konformationsänderungen der Integrine bei. Über die Aminosäurereste 435 bis 600 erstrecken sich vier cysteinreiche Bereiche, die als Integrin-EGF-Domänen bezeichnet werden. Sie haben gleiche strukturelle Eigenschaften und sind für die Übersetzung von strukturellen Änderungen in Signale verantwortlich (Takagi *et al.*, 2001). So binden z. B. zahlreiche aktivierende Antikörper an diesen Bereich der β -Untereinheit (Humphries, 2000). Ebenfalls cysteinreich ist die β -tail-

Domäne. Sie enthält eine α -Helix, die über eine Disulfidbrücke mit einem β -Faltblatt verbunden ist.

Bis heute sind bei Säugetieren 24 Integrine bekannt, die sich gemäß Abbildung 4 aus 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten zusammensetzen (Hynes, 2002). Bei einigen Untereinheiten treten zusätzlich Isoformen auf, die durch alternatives Spleißen der cytosolischen oder der extrazellulären Domänen entstehen.

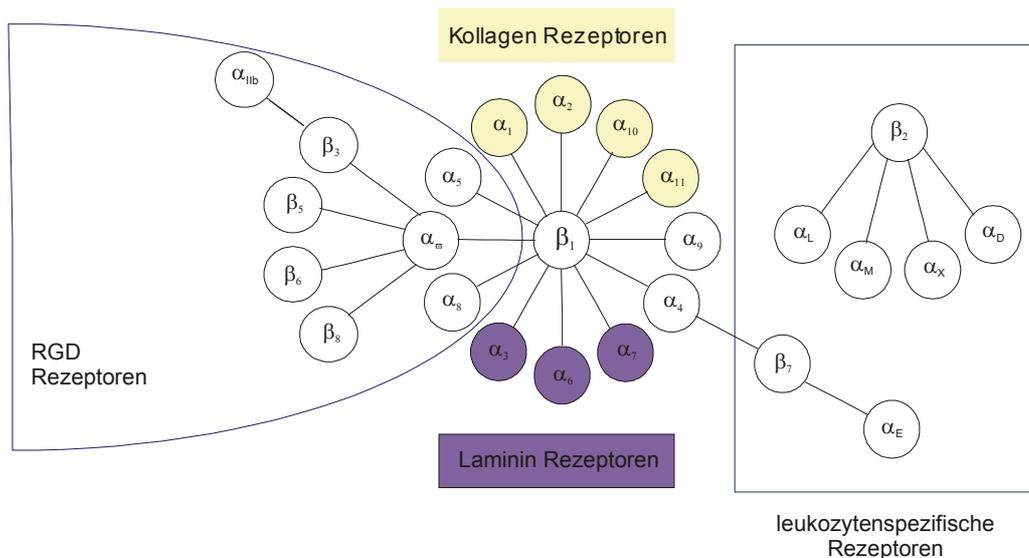


Abb. 4: Die Familie der Integrine (nach Hynes, 2002).

Jedes der 24 Integrine scheint seine eigene, spezifische Funktion zu haben, was besonders aus den Phänotypen entsprechender *knock-out* Mäuse ersichtlich wird (De Arcangelis & Georges-Labouesse, 2000; Sheppard, 2000). Dabei reicht die Serie der Phänotypen von der vollständigen Blockierung der Präimplantationsentwicklung (β_1 -*knock-out*), über schwere Fehlentwicklungen (α_4^- , α_5^- , α_v^- , β_8 -*knock-out*) bis hin zu Defekten in der Leukozytenfunktion (α_L^- , α_M^- , α_E^- , β_2^- , β_7 -*knock-out*) (Hynes, 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Integrine in zahlreiche Abläufe auf zellulärer Ebene wie Zellwanderung, Zelldifferenzierung und Genexpression eingreifen und so an verschiedenen biologischen Prozessen wie z. B. der Wundheilung, Blutgerinnung und der Immunantwort maßgeblich beteiligt sind. Geraten diese sensiblen Systeme aus dem Gleichgewicht, kommt es zu pathologischen Prozessen, die unter anderem in der Entstehung und dem Verlauf der Osteoporose, akuter und chronischer Entzündungen sowie verschiedener Krebs-

arten involviert sind. Infolgedessen stellen Integrine einen guten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Diagnostika und Therapeutika dar.

2.3.1 Integrine und ihre Liganden

Die Integrine zeigen in ihrer Ligandenbindung starke Unterschiede. Während einige Integrine nur einen oder wenige Liganden binden, weisen andere ein großes Spektrum an Liganden auf (Eble, 1997). Darüber hinaus tritt eine große Variationsbreite an Erkennungssequenzen und Erkennungssequenzstrukturen auf, sodass eine Klassifizierung der Integrine schwierig ist.

Tab. 1: Ausgewählte Integrine und ihre Liganden. In der Tabelle sind einige Integrine mit ihren Liganden und der minimalen Erkennungssequenz aufgeführt (Schaffner & Dard, 2002; Ruoslahti, 1996).

Integrin	Liganden	minimale Erkennungssequenzen
$\alpha_1\beta_1$	Kollagene, Laminin	RGD
$\alpha_2\beta_1$	Kollagene, Laminin	YYGDLR/FYFDLR (RGD)
$\alpha_4\beta_1$	Fibronectin, VCAM-1	LDV/IDS, (RGD)
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin, L1	RGD, (LDV/IDS)
$\alpha_8\beta_1$	Fibronectin, Vitronectin, Tenascin	RGD
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, L1, Kollagene, Laminin, Osteopontin	RGD
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, L1, Thrombospondin, von Willebrand Faktor	RGD, KQAGDV
$\alpha_v\beta_3$	Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, L1, von Willebrand Faktor, Osteopontin, Thrombospondin, Kollagene, Tenascin	RGD, RLD/KRLDGS
$\alpha_v\beta_6$	Fibronectin, Vitronectin	RGD

L1: Zelladhäsionsmolekül L1; VCAM-1: vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1

Eine Möglichkeit zur Subklassifizierung ist das Zusammenfassen in 8 Unterfamilien basierend auf den β -Untereinheiten (Elangbam, 1997). Die am häufigsten untersuchten Unter-

familien sind die der β_1 -, β_2 -, β_3 - und β_7 -Integrine. Die Mitglieder der β_1 -Unterfamilie werden auch als VLA Integrine (*Very Late (Activated) Antigens*) bezeichnet und vermitteln überwiegend Zell-Matrix-Interaktionen. Leukozyten-Integrine haben eine β_2 -Kette und sind in Zell-Zell-Interaktionen involviert. In der β_3 -Unterfamilie sind die Cytoadhäsions-Integrine gruppiert, die verschiedene adhäsive Funktionen ausüben. β_7 -Integrine vermitteln Wechselwirkungen zwischen Zellen.

Das Integrinprofil einer Zelle determiniert ihre Möglichkeit verschiedene adhäsive Substrate zu erkennen, was im nichtpathogenen Fall mit ihren Funktionen im Organismus in Einklang steht.

Integrine weisen im Gegensatz zu hoch affin bindenden Hormonrezeptoren (Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-9} und 10^{-11} M) eine relativ niedrige Ligandenaffinität auf (Dissoziationskonstanten zwischen 10^{-6} und 10^{-8} M). Dennoch sorgen die zahlreichen Interaktionen zwischen den Integrinen und Proteinen der EZM für eine feste Verankerung der Zellen. Andererseits ermöglichen die schwachen Wechselwirkungen das schnelle Ausbilden und Lösen von Kontakten, sodass die Wanderung von Zellen möglich wird.

2.3.2 Signalübertragung durch Integrine

Die Kommunikation zwischen Zellen und ihrer Umgebung ist für höhere Organismen von essenzieller Bedeutung. Denn Adhäsionsprozesse wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen stabilisieren nicht nur die Zellformation, sondern haben gleichzeitig einen regulatorischen Einfluss auf Zelldifferenzierung, Zellteilung, Zellwanderung und Zelltod.

Integrine sind aufgrund ihrer bidirektionalen Signalübertragung wichtige Werkzeuge zur Vereinigung intrazellulärer und extrazellulärer Prozesse. Beim *Outside-in Signalling* führt die Ligandenbindung zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Schwartz & Ginsberg, 2002). Die spezifischen Kontakte zwischen dem Integrin-Rezeptor, Proteinen der intrazellulären Matrix und den Aktinfilamenten werden dabei in Multiproteinkomplexen hergestellt, die als so genannte *Focal Adhesion Points* bezeichnet werden (Krauss, 2001).

Als Konsequenz der Ligandenbindung und der Clusterbildung werden verschiedene Signalwege initiiert:

- Aktivierung von Nichtrezeptor-Tyrosin-Kinasen
- Aktivierung von Serin/Threonin-Kinasen
- Erhöhung der Calcium-Ionen-Konzentration
- Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade
- Erhöhte Bildung von Phosphatidyl-Inositol-messenger Substanzen

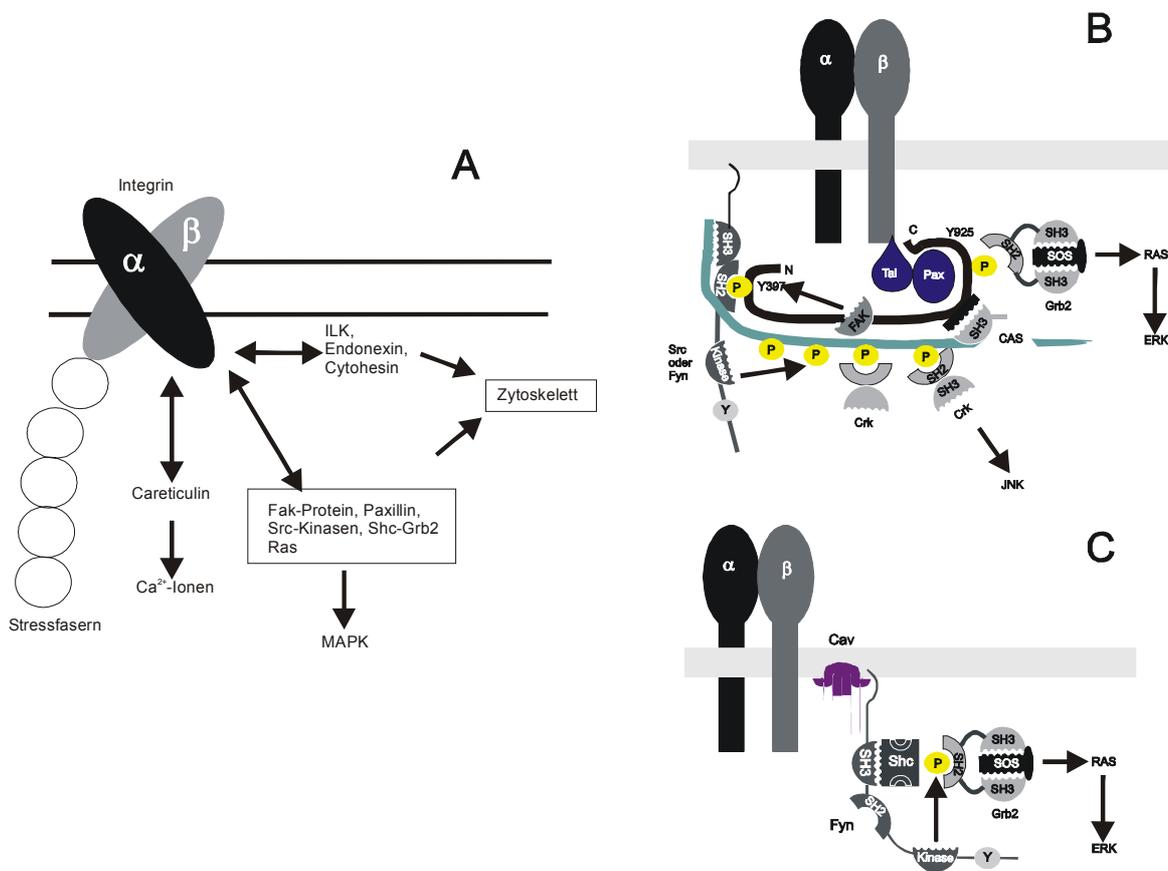


Abb. 5: Signalübertragungswege der Integrine. (A) Modell für die Signaltransduktion via Integrine (Krauss, 2001), (B) Modell für den FAK-Signalübertragungsweg (Giancotti & Ruoslahti, 1999), (C) Modell für den Shc-Signalübertragungsweg (Giancotti & Ruoslahti, 1999).

Das *Inside-out Signalling* hingegen wird dadurch charakterisiert, dass Signale anderer Rezeptoren intrazelluläre Signalwege auslösen, welche so auf die cytoplasmatischen Domänen der Integrine einwirken, dass die extrazellulären Domänen für eine Ligandenbindung aktiviert (Hughes & Pfaff, 1998). Die genauen Mechanismen sind noch unbekannt. Allerdings scheinen bei den Signalwegen die Protein Kinase C und die Phosphatidylinositol 3-Kinase beteiligt zu sein (Turner et al., 1995).

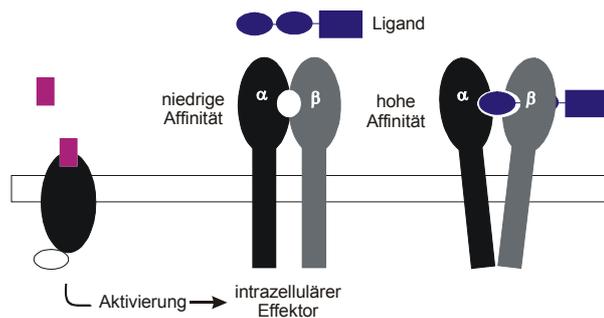


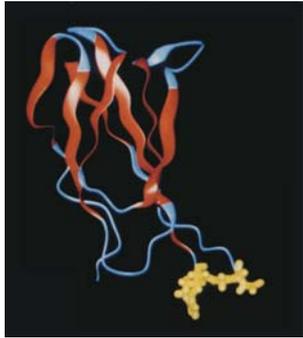
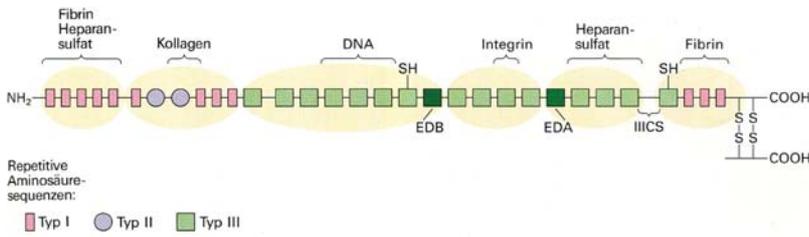
Abb. 6: Inside-out Signalling.

Intrazelluläre Effektoren binden an die intrazelluläre Domäne des Integrins und induzieren eine Konformationsänderung, die zu einer Affinitätssteigerung führt (nach Gimond & Sonnenberg, 1997).

2.4 Das $\alpha_5\beta_1$ Integrin als klassischer Fibronectin Rezeptor

Das Integrin $\alpha_5\beta_1$ war das erste Integrin, das intensiv untersucht wurde (Horwitz et al., 1985; Tamkun et al., 1986). Es bindet ausschließlich an Fibronectin und ist in die aktive Deposition der perizellulären Fibronectin-Matrix und ihre Rekonstruktion involviert (Akiyama et al., 1989).

Die Bindungsstelle des $\alpha_5\beta_1$ Integrins befindet sich in einer *Loop*-Struktur der zehnten Typ III Domäne des Fibronectins, welche die lineare Peptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD) enthält (Main et al., 1992; Dickinson et al., 1994). Diese lineare Sequenz war die Erste, die als Integrin Erkennungssequenz identifiziert wurde (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984). Ebenfalls wichtig für die Interaktion zwischen Fibronectin und dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin ist eine *Synergy Site* in der neunten Typ III Domäne mit der Sequenz Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN), die sich räumlich gesehen in der Nähe des RGD-Motivs befindet (Aota et al., 1994).

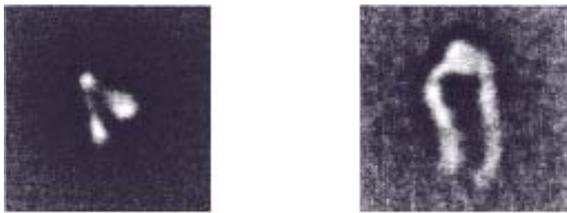


A

B

Abb. 6: Die Struktur von Fibronectin. In (A) ist eine der beiden Ketten des Fibronectin-Dimers dargestellt. Die sich wiederholenden Aminosäuresequenzen sind entsprechend gekennzeichnet (Lodish *et al.*, 2001). (B) zeigt die dreidimensionale Struktur der zehnten Typ III Domäne, welche die für die Bindung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins essenzielle RGD-Sequenz enthält (Main *et al.*, 1992).

Takagi *et al.* (2003) gelang es kürzlich mittels einer Kombination aus elektronenmikroskopischen Beobachtungen und kinetischen Messungen, tiefere Einblicke in die Interaktion zwischen dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin und Fibronectin zu erhalten. Die Ergebnisse zeigten die gleiche Konformationsänderung, die Takagi *et al.* (2002) am $\alpha_v\beta_3$ Integrin beobachtet hatten.



A

B

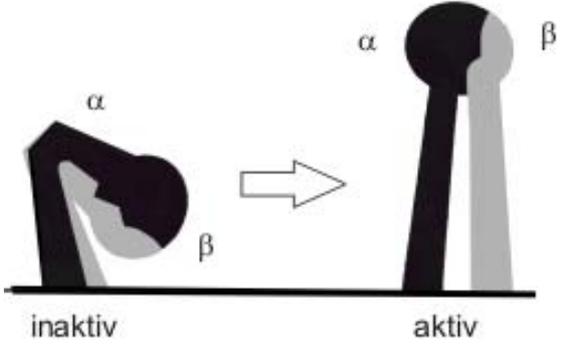
Abb. 7: Die Integrin Aktivierung.

(A) Elektronenmikroskopbild $\alpha_v\beta_3$ in der inaktiven Konformation.

(B) Elektronenmikroskopbild $\alpha_v\beta_3$ in der aktiven Konformation.

(C) Modell für die Integrin Aktivierung.

(Alle Abbildungen aus Takagi & Springer (2002))



C

Das weit verbreitete *two-site* Bindungsmodell, das davon ausgeht, dass der RGD-Loop und die *Synergy Site* weit voneinander entfernte Bindungstaschen haben, konnte nicht bestätigt werden. Die Resultate deuten vielmehr daraufhin, dass die *Synergy Site* eher indirekt die Interaktion beeinflusst. Das entspricht Studien von Altroff *et al.* (2001, 2003) und Copie *et al.* (1998), die gezeigt haben, dass die *Synergy Site* einen stabilisierenden Effekt auf die Orientierung des RGD-Loops ausübt, die für eine Bindung an das Integrin optimal ist.

Verbleibende Unklarheiten bezüglich der Beteiligung einzelner Domänen und Reste an der Komplexbildung können nur durch eine hochauflösende Röntgenstruktur des $\alpha_5\beta_1$ -Fibronectin-Komplexes beseitigt werden.

Fibronectine stellen eine wichtige Gruppe von Multiadhäsionsmolekülen in der EZM dar. Sie haben ein Molekulargewicht von 440 bis 550 kD und spielen bei zellulären Haftprozessen wie z. B. der Wundheilung und der Zellwanderung eine wichtige Rolle.

Fibronectine sind Dimere, die aus zwei ähnliche, am C-Termini über zwei Disulfidbrücken verbundenen Ketten bestehen. Sie werden als so genannte Mosaikproteine bezeichnet, da sie aus drei sich wiederholenden Aminosäuresequenzen aufgebaut sind (Typ I, Typ II und Typ III Domäne). Bis heute sind 20 Fibronectine bekannt, die durch alternatives Spleißen des RNA-Trankripts aus einem Fibronectingen entstehen. Dabei sind häufig die EDB- und die EDA-Domäne sowie der IIICS-Abschnitt betroffen.

2.4.1 Die Rolle des $\alpha_5\beta_1$ Integrins in biologischen Prozessen

Die Interaktion zwischen dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin und seinem natürlichen Liganden Fibronectin ist für die Anordnung der extrazellulären Matrix und für die Zelladhäsion von essenzieller Bedeutung (Akiyama *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1993). So führt das Fehlen von Fibronectin oder dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin zum frühzeitigen Sterben von Embryonen, was die Wichtigkeit dieser Interaktion für die Säugarentwicklung unterstreicht (George *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993). Darüber hinaus ist das $\alpha_5\beta_1$ Integrin in die Zellmigration (Agraves *et al.*, 1986; Bauer *et al.*, 1992), die Regulierung des Zellwachstums (Schwartz *et al.*, 1991), sowie die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen involviert (Shimizu *et al.*, 1990).

Diese molekularen Abläufe sind nicht nur Bestandteile von apathogenen, biologischen Prozessen wie z. B. der Wundheilung, der Embryogenese und der Immunabwehr, sondern

spielen außerdem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten.

Neueste Studien zeigen, dass die Expression des $\alpha_5\beta_1$ Integrins durch Tumorzellen an der Metastasenentwicklung in den Nieren und den Ovarien maßgeblich beteiligt ist (Casey *et al.*, 2001; Tani *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse verschiedener *in-vitro* Studien deuten auf eine Beteiligung des Integrins $\alpha_5\beta_1$ an der Entstehung und dem Verlauf verschiedener Entzündungskrankheiten hin (Cardarelli & Lobl, 1996). Ein Beispiel dafür sind allergisch bedingte Entzündungen, bei denen das $\alpha_5\beta_1$ Integrin die Eosinophiladhäsion an Epithelzellen fördert und damit eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von allergischem Asthma spielt (Burke-Gaffney *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte bei Menschen, die an rheumatoider Arthritis erkrankt sind, nachgewiesen werden, dass während der Entzündungsprozesse das $\alpha_5\beta_1$ Integrin an Mechanismen zur Akkumulation und Erhaltung von T-Lymphozyten in der synovialen Flüssigkeit beteiligt ist (Garcia-Vicuna *et al.*, 1992).

Alles in allem ist das Integrin $\alpha_5\beta_1$ auch zwanzig Jahre nach seiner Entdeckung ein wichtiges Forschungsobjekt. Selektive Liganden zur Blockierung dieses Integrins bilden nicht nur die Grundlage für die Entwicklung von Therapeutika und Diagnostika, sondern bieten zusätzlich die Möglichkeit, einen tieferen Einblick in die Mechanismen zu erhalten, an denen das $\alpha_5\beta_1$ Integrin beteiligt ist.

2.5 Zellen in Kultur

Zell- und Gewebekulturen sind ein wichtiges Instrument der modernen Zell- und Molekularbiologie. Seit der Entwicklung erster Zellkulturtechniken von Carrell (1912) haben sich die Methoden ständig weiterentwickelt. So ist es heute möglich Zellen so zu kultivieren, dass sie zu komplexen Differenzierungs- und Stoffwechsellleistungen fähig sind und damit *in vivo* Bedingungen in vielen Aspekten nahe kommen (Wobus, 1997).

Grundsätzlich lassen sich nicht alle Zellen in eine Zellkultur überführen und als Zelllinie etablieren. Sie unterliegen beim Übergang vom Wachstum in Gewebeverbänden zum isolierten Zellwachstum in Kulturen verschiedenen Veränderungen und Adaptationsprozessen. Darüber hinaus ist die Auswahl entsprechender Zellkulturmedien, Seren und Zusätzen nicht tri-

vial und muss an die spezifischen Bedürfnisse der Zellen, sowie an die Aufgabenstellung angepasst werden (Freshney, 1992).

Die Lebensdauer von Zellen in Kultur ist von verschiedenen Faktoren wie z. B. dem Zelltyp, der Spezies und dem Alter des Spenders abhängig. Hayflick & Moorhead beschrieben 1961, dass Mensch- und Mauszellen in *in vitro* Kulturen unterschiedliche Wachstumsphasen durchlaufen (Hayflick & Moorhead, 1961).

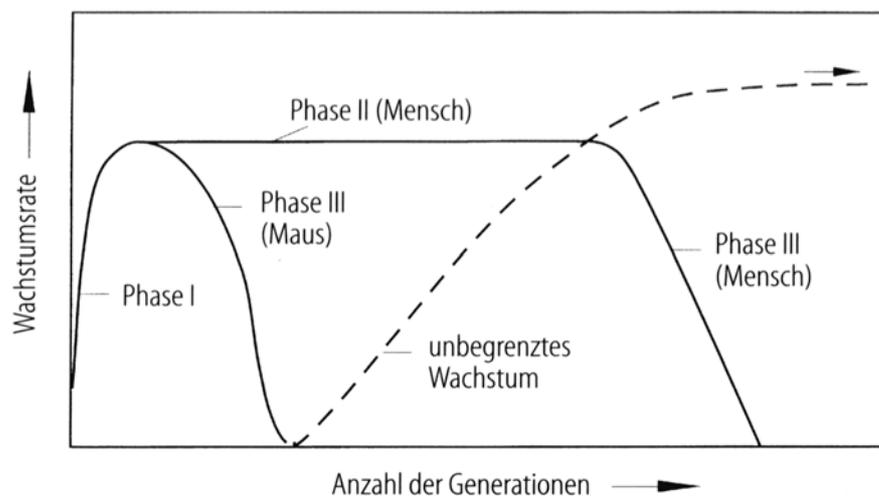


Abb. 8: Wachstumsphasen und Lebensdauer von Menschenzellen und Mauszellen in Kultur. In der Phase I, die als Adaptationsphase bezeichnet wird, adaptieren sich die explantierten Zellen an die Kulturbedingungen. Die Wachstumsphase (Phase II) beträgt beim Menschen 50 und bei der Maus 5–10 Passagen. In der Degenerationsphase (Phase III) sinkt die Proliferationsfähigkeit der Zellen und es kommt zu irreversiblen Zellveränderungen. Werden die Zellen in diesem Stadium transformiert, kann eine permanent wachsende Zelllinie etabliert werden (Wobbus, 1997).

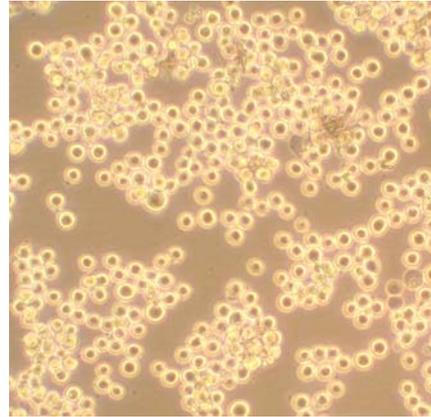
Werden die Zellen in der Phase III onkogenisch transformiert kann das Absterben der Kultur verhindert werden und eine permanente Zelllinie etabliert werden.

HeLa Zellen waren die ersten aneuploiden menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert werden konnte. Sie wurden 1952 aus einem malignen Tumor des Cervix uteri einer Patientin isoliert (Lodish, *et al.* 2001). Heute stehen unzählige permanente Zelllinien zur Verfügung, die aus verschiedensten Geweben und Organismen etabliert worden sind. Sie verfügen mehr oder weniger über zell- und gewebespezifische Eigenschaften und sind für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen von großer Bedeutung.

2.5.1 K562 Zellen als Modellzelllinie für das $\alpha_5\beta_1$ Integrin

Die permanente Zelllinie K562 wurde von 1975 von Lozzio & Lozzio etabliert. Als Ausgangsmaterial diente die Pleuraleffusion einer Frau mit chronisch myeloischer Leukämie in der terminalen Blastenkrise (Lozzio & Lozzio, 1975).

K562 Blasten sind multipotenzielle, hämatopoetische, maligne Zellen, die spontan in Vorläufer der Erythrozyten-, Granulozyten- und Monozyten-Serie differenzieren (Lozzio *et al.*, 1981). Darüber hinaus ist die Induktion und Steuerung der Differenzierung durch Reagenzien wie Butyrate (Erythrozyten-Serie) und Phorbol ester (Megakaryozyten-Serie) möglich (Andersson *et al.*, 1979; Tatteroo *et al.*, 1984). Ein Hinweis auf den Differenzierungszustand von Zellen gibt das Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Undifferenziert Zellen zeichnen sich durch ein hohes Kern-



**Abb. 9: K562 Zellen in
10-facher Vergrößerung**

Zytoplasma-Verhältnis aus, d. h., in diesen Zellen nimmt der Zellkern im Verhältnis zum Zytoplasma einen wesentlich größeren Anteil der Zelle ein, als in differenzierten Zellen (Wobus, 1997). Dieser Unterschied kann durch eine Hämatoxylin-Eosin- oder eine Pappenheimer-Färbung nachgewiesen werden kann (Böck, 1989) werden.

K562 Zellen sind als hoch sensitive Ziele in *Natural Killer Assays* weit verbreitet (Jondal & Pross, 1975; West *et al.*, 1977). Außerdem dienen sie als Modellzelllinie für die Untersuchung von Integrin $\alpha_5\beta_1$ -Fibronectin-Interaktionen, da sie überwiegend das Integrin $\alpha_5\beta_1$ exprimieren (Danen *et al.*, 1995; Nath *et al.*, 1999; Barry *et al.*, 2000).

2.5.2 Aktivierungsstadien des Integrins $\alpha_5\beta_1$

Die Regulierung der Integrin Aktivität basiert auf komplexen Mechanismen, von denen bis heute nur ein Bruchteil bekannt ist. Zirkulierende Zellen, wie die in Suspension wachsenden K562 Zellen exprimieren Integrine häufig in einer inaktiven Form. Folglich ist für eine Integrin-Ligand-Interaktion eine Aktivierung des Integrins notwendig. Für das Integrin $\alpha_5\beta_1$ stehen verschiedene Reagenzien zur Verfügung, die potenziell zu einer Aktivitätssteigerung führen können (Gimond & Sonnenbert, 1997).

Es ist allgemein bekannt, dass divalente Kationen die Integrin-vermittelte Zelladhäsion regulieren können. Dabei wurde gezeigt, dass die Aktivierung durch Kationen mit einer Konformationsänderung der Integrin-Untereinheiten einhergeht (Altieri, 1991; Dransfield *et al.*, 1992). Von Davis & Camarillo und Mould *et al.* konnte gezeigt werden, dass im Integrin $\alpha_5\beta_1$ unterschiedliche Bindungsstellen für Calcium-, Magnesium- und Manganionen vorhanden sind (Davis & Camarillo, 1993; Mould *et al.*, 1995). Demnach können Manganionen die Ligandenaffinität des Integrins stark erhöhen, während Magnesium- und Calciumionen nur zu einer geringen Erhöhung der Affinität führen. Weiterhin wurde deutlich, dass eine hohe Calciumionen-Konzentration vermieden werden sollte, da sie zu einer Inhibition der Zelladhäsion führt (Mould *et al.*, 1995a).

Einen weitere Möglichkeit zu Erhöhung der Aktivität bestimmter Integrine stellen aktivierende Antikörper dar. Der Antikörper TS2/16 sorgt für eine erhöhte Liandenaffinität des Integrins $\alpha_5\beta_1$, indem er den Einfluss der *Synergy Site* auf die Interaktion zwischen dem Integrin und dem Fibronectin minimiert (Danan *et al.*, 1995). Das Bindungsepitop des Antikörpers TS2/16 liegt in einem schmalen Bereich der β_1 -Untereinheit, der sich zwischen zwei Sequenzen befindet, die für die Ligandenerkennung essenziell sind (Mould *et al.*, 1995b).

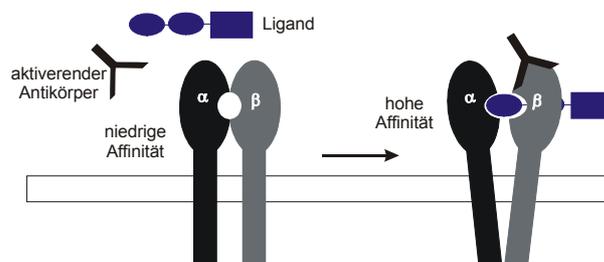


Abb. 10: Der Wirkungsmechanismus aktivierender Antikörper (nach Gimond & Sonnenberg, 1997).

Phorbolster sind als potenzielle Aktivatoren der Protein Kinase C in der Lage, die Effekte vieler Integrin-Agonisten nachzuahmen (Nishizuka, 1984, 1988). Dabei beeinflussen sie die Integrinaktivität auf zweifache Weise. Einerseits scheinen sie die Ligandenaffinität der Integrine dadurch zu erhöhen, dass sie Konformationsänderungen im extrazellulären Bereich der Integrine induzieren. Andererseits steigern sie die Avidität der Integrine, indem sie ihre Clusterbildung auslösen. In vielen Fällen ist der Anstieg der Zelladhäsion auf beide Effekte zurückzuführen.

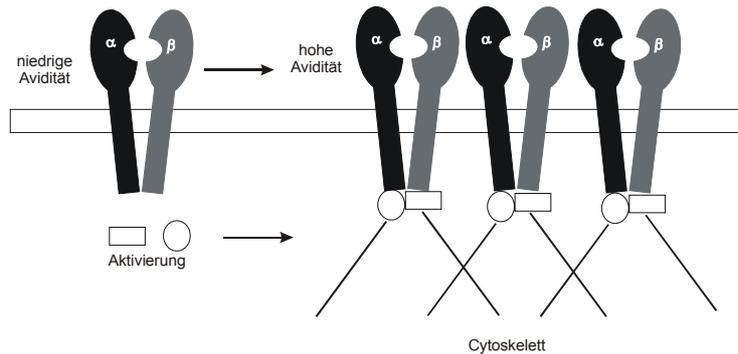


Abb. 11: Integrin-Clustering. Aktivierende Signale können über eine Interaktion mit dem Cytoskelett ein *Clustering* der Integrine induzieren. (nach Gimond & Sonnenberg, 1997)

Für das $\alpha_5\beta_1$ Integrin zeigen die Ergebnisse von Danen *et al.*, dass die Adhäsion von K562 Zellen durch die Inkubation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat effektiv erhöht werden konnte (Danen *et al.*, 1995). Allerdings liegen bis heute keine Resultate vor, die zeigen, welcher Effekt für die Aktivitätssteigerung verantwortlich ist.

2.6 Die RGD-Sequenz

Seit der Identifizierung der Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) als zentrale Zellerkennungssequenz des Fibronectins sind zahlreiche Proteine der EZM untersucht worden (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984; Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Dabei stellte sich heraus, dass die RGD-Sequenz bei vielen weiteren Matrixproteinen eine Schlüsselrolle in der Zellerkennung einnimmt (Plow *et al.*, 1985; Yamada & Kennedy, 1987).

Einige Jahre später wurde gezeigt, dass kleine Peptide, welche die RGD-Sequenz tragen, Zelladhäsionsmoleküle nachahmen können (Craig *et al.*, 1995). Daraufhin folgten viele Studien, die das biomedizinische Potenzial dieser Peptide evaluierten (Schaffner & Dard, 2003). So stellt die RGD-Sequenz z. B. Grundlage für die Entwicklung verschiedener Integrin-Antagonisten in Form von Peptiden dar (Haubner *et al.*, 1997). Da lineare Peptide nur eine relativ geringe Affinität zu Integrinen zeigen, ist es notwendig sie zu modifizieren (Hautanen *et al.*, 1989).

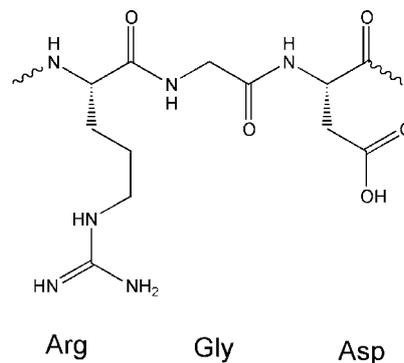


Abb. 12: Die RGD-Sequenz

Eine Möglichkeit zur Modifizierung von Peptiden ist die Cyclisierung. Die daraus resultierenden Ringsysteme präsentieren die RGD-Sequenz in spezifischen Konformationen, wodurch die Aktivität und die Spezifität der Peptide erhöht wird. Cyclische Peptide zeichnen sich darüber hinaus durch eine hohe Proteolysestabilität aus, sodass ihr Metabolismus in Säugetierorganismen limitiert ist (Sewald & Jakubke, 2002).

D-Aminosäuren als nichtproteinogene Bausteine stellen ein weiteres wichtiges Hilfsmittel dar, um die Flexibilität von Peptiden einzuschränken und damit ihre Spezifität, sowie Aktivität zu steigern (Müller *et al.*, 1992). Darüber hinaus bewirken sie eine Erhöhung der Proteasenstabilität des Peptids.

β -Aminosäuren können ebenfalls dazu dienen Peptide zu modifizieren. So ermöglicht das Einfügen von β -Aminosäuren in cyclische Peptide eine Feinabstimmung der Ringgröße in C_1 -Schritten (Müller *et al.*, 1997). Außerdem sind β -Aminosäuren Strukturbildner (z. B. γ -Turn Mimetika), die in Peptiden bestimmte Konformationen induzieren können und die gesamte Sekundärstruktur stabilisieren (Schumann *et al.*, 2000).

Die Vielzahl an Modifizierungsmöglichkeiten machen Peptide zu wertvollen Werkzeugen, um bioaktive Konformationen von Proteinen zu bestimmen und selektive Antagonisten zu entwickeln. Einen Ansatz zur Ermittlung der bioaktiven Konformation der RGD-Sequenz im rezeptorgebundenen Zustand stellt das von Kessler *et al.* entwickelte *Spatial Screening* dar (Haubner *et al.*, 1997). Dabei werden Bibliotheken stereoisomerer cyclischer Peptide synthetisiert, die eine Eingrenzung der für einen Rezeptortypen optimalen Struktur ermöglichen. Die Korrelation der biologischen Aktivität mit der Peptidkonformation liefert wichtige Informationen über die aktiven Peptide und erlauben Rückschlüsse auf den Rezeptor.

Die modifizierten Peptide können, entweder selbst als Therapeutika eingesetzt werden, oder aber als Leitstrukturen für nicht-peptidische Verbindungen wie z. B. Peptidomimetika dienen. Bis heute sind verschiedene Integrin-Antagonisten entwickelt worden, die bereits zugelassen sind oder sich in klinischen Studien befinden (Tab. 2).

Tab. 2: Ausgewählte Anti-Integrin-Therapeutika (Curley *et al.*, 1999; Sewald, 2002).

Integrin	Indikation	Entwickler	Antagonist	Status
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Thrombose	Cor Therapeutics	Integrilin Cyclopeptid	zugelassen
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Myokardinfarkt	Centocor/Eli Lilly	REOPRO	zugelassen
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Akutes Koronarsyndrom	Roche/Genentech	Sibrafian	Phase III
$\alpha_4\beta_1$	Asthma	Biogen/Merck & Co.	BIO1211 Peptidomimetikum	Phase I
$\alpha_4\beta_1$	chronische Entzündungskrankheiten	Cytel	CY9652 Peptidomimetikum	vorklinisch
$\alpha_v\beta_3$	Krebs, Thrombose	E. Merck KGaA	Cyclopeptid Peptidomimetikum	vorklinisch
$\alpha_v\beta_3$	Osteoporose	Hoechst Marion Roussel	Peptidomimetikum	vorklinisch

3 Zielsetzung

Integrine sind Zelloberflächenproteine, die als Vermittler zwischen dem Zellinneren und der extrazellulären Matrix fungieren. Über die Interaktion mit ihren Liganden sind Integrine an vielen apathogenen Prozessen, wie der Wundheilung, der Embryogenese und der Immunantwort, aber auch an pathogenen Prozessen wie der Entstehung und dem Verlauf von Krebs, von Osteoporose und den pathologischen Veränderungen des Immunsystems beteiligt. Trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte sind die Mechanismen, die an der Pathogenese verschiedener Krankheiten beteiligt sind, größtenteils unverstanden. Potenzielle Antagonisten beteiligter Proteine könnten nicht nur als Leitstrukturen für entsprechende Diagnostika und Therapeutika dienen, sondern darüber hinaus zur Aufklärung der beteiligten Mechanismen beitragen.

Das Schlüsselprotein dieser Arbeit stellt das Integrin $\alpha_5\beta_1$ dar. Als klassischer Fibronectinrezeptor ist es in die Metastasenbildung von Krebs und die Pathogenese von Entzündungskrankungen involviert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Testsysteme etabliert werden, welche die Evaluierung cyclischer RGD-Peptide hinsichtlich ihres Einflusses auf die Wechselwirkung zwischen dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin und Fibronectin ermöglichen. Die zu untersuchenden Peptide präsentieren die RGD-Sequenz mit einer definierten Sekundärstruktur, wobei es der Einsatz von β -Aminosäuren als Bausteine im rationalen Design ermöglicht, biologische Aktivität und molekulare Struktur zu korrelieren.

Bei den Testsystemen sollten sowohl klassische, mikrotiterplatten-basierte Testsysteme, als auch moderne Verfahren, wie z. B. auf der Oberflächenplasmonresonanz basierende Testsysteme zum Einsatz kommen. Dabei sollte auf Zelloberflächen gebundenes Integrin, in Extrakten angereichertes Integrin und isoliertes Protein eingesetzt werden, um differenzierte Aussagen über das zu untersuchende System machen zu können.

4 Materialien

4.1 Technische Ausrüstung

4.1.1 Materialien für die Zellkultur

Brenner

Gasprofi 1

WLD-TEC (Göttingen)

Cryobehälter

ARPEGE 40AIRLIQUIDE

(Marne-la-Vallée, Frankreich)

Inkubator

Direct Heat CO₂ Incubator Model 311

Forma Scientific, Inc. (Marietta, USA)

Mikroskop

Olympus CK 40

Olympus (Hamburg)

Petrischalen

GREINER GmbH (Frickenheim)

Sterilbank

HERAsafe

Kendro (Hanau)

Zellkulturflaschen

CM⁺ Gewebekulturflaschen
(Kulturfläche: 25 cm², 75 cm²)

Sarstedt (Nümbrecht)

Flaschen für Suspensions- und
Hybridomzellen

(Kulturfläche: 25 cm², 75 cm²)

Sarstedt (Nümbrecht)

4.1.2 Sontige Materialien

Analytische HPLC

Autosampler:

Thermo Separation Products AS 100 ThermoQuest (Egelsbach)

Pumpe:

Thermo Separation Products P 4000 ThermoQuest (Egelsbach)

Controller:

Thermo Separation Products SN 4000 ThermoQuest (Egelsbach)

Detektor:

Thermo Separation Products UV 6000 ThermoQuest (Egelsbach)

Säulen:

Vydac™ 300 C₁₈ (218 TPB)

Phenomex, Jupiter C₁₈

Vydac™ 218TP54 efficiency C₁₈

Autoklav

Vertikaler Standautoklav Systec GmbH (Wettenberg)

Typ 2540 ELV

BIACORE® 3000

BIACORE (Freiburg)

BioChem-VakuuCenter

vakuubrand (Wertheim)

BioPhotometer

Eppendorf (Hamburg)

Blotting Membran

Hybond™ ECL™

Amersham PHARMACIA Biotech (Freiburg)

Nitrocellulose membrane

Digitalkamera C-4040 Zoom

Olympus (Hamburg)

FacSCAN

Becton Dickinson (Meylan Cedex, Frankreich)

Geltrockner

BIO-RAD (München)

Fluorometer

SPEKTRAFLUOR PLUS

Tecan (Crailsheim)

Horizontalschüttler

IKA® VIBRAX VXR basic IKA LABORTECHNIK (Dresden)

MALDI-ToF Massenspektrometer

Voyager-DE™ BioSpectrometry™ PerSeptive Biosystems (Darmstadt)
Workstation

Mikrotiterplatten

Polystyrolplatte MicroWell™ NUNC (Wiesbaden)

Immunoplatten Maxisorp™ NUNC (Wiesbaden)

Immuniplatten Polysorp™ NUNC (Wiesbaden)

pH-Meter MP 220 METTLER TOLEDO (Gießen)

Inlab® 420 pH-Elektrode METTLER TOLEDO (Gießen)

PAGE-Apparatur BIO-RAD (München)

Reinstwasseranlage Milli Q Millipore (Eschborn)

Sensorchips

CM5-Sensorchip, research grade BIACORE (Freiburg)

C1-Sensorchip BIACORE (Freiburg)

F1-Sensorchip BIACORE (Freiburg)

Stromversorgungsgerät

POWER PAC 200 BIO-RAD (München)

Thermocycler

Trio Thermoblock Biometra (Göttingen)

Thermomixer compact Eppendorf (Hamburg)

Tiefgefrierschrank

Forma-ULT-Plus-Tiefkühlschrank ThermoQuest (Egelsbach)

Vakuum-Filtrationsgerät aus Glas Schleicher&Schuell (Dassel)

Waagen

Analysenwaage Kern (Bulinger-Frommern)

Laborwaage SATORIUS (Göttingen)

Western-Blotting-Apparatur

Semi-Dry Trans-Blot[®]SD BIO-RAD (München)

Zentrifuge

Centrifuge 5804 R Eppendorf (Hamburg)

Zentrifugenkonzentratoren

CENTRIPLUS[™] YM-30 Millipore (Eschborn)

CENTRIPLUS[™] YM-50 Millipore (Eschborn)

Zentrifugenrotoren

F45-30-11 Eppendorf (Hamburg)

A-4-44 Eppendorf (Hamburg)

4.1.3 Software

BIACORE 300 Control Software
Version 3.0 BIACORE (Freiburg)

BIAevaluation Version 3.0.2 BIACORE (Freiburg)

CELLQuest[™] Version 3.3 Becton Dickinson (Meylan Cedex, Frankreich)

GraphPad Prism Version 4.0 GraphPad Software Inc. (San Diego, USA)

Microsoft[®] Office 2000 MICROSOFT (Redmond, USA)

Primer3 Whitehead Institute for Biomedical Research

4.2 Chemikalien

40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Bio-Rad (München)
6-Aminohexansäure	Fluka (Neu-Ulm)
Bromphenolblau	ICN (Eschwege)
Coomassie Blue G-250	ICN (Eschwege)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma (Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ICN (Eschwege)
N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid-hydrochlorid (EDC)	Biacore (Freiburg)
D-Glucose	ICN (Eschwege)
Glutaraldehyd	Fluka (Neu-Ulm)
Glycin	ICN (Eschwege)
Glycerin	ICN (Eschwege)
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	ICN (Eschwege)
Maleinsäure	AppliChem (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	ICN (Eschwege)
2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES)	Sigma (Deisenhofen)
Natriumazid	Fluka (Neu-Ulm)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN (Eschwege)
Natriumhydrogencarbonat	ICN (Eschwege)
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Biacore (Freiburg)
Octyl- β -D-glucopyranosid (β -OG)	AppliChem (Darmstadt)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA)	AppliChem (Darmstadt)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)
Silbernitrat	Fluka (Neu-Ulm)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Färbelösung (POD-Färbelösung)	Roche (Mannheim)
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	ICN (Eschwege)
Paraformaldehyd	ICN (Eschwege)

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Fluka (Neu-Ulm)
TMB-Substrat	KPL (Wedel)
TMB Stop Solution	KPL (Wedel)
Trägerflüssigkeit für die Durchflusszytometrie	Becton Dickinson (Meylan Cedex, Frankreich)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN (Eschwege)
Tris-HCl	Sigma (Deisenhofen)
Tween 20	ICN (Eschwege)
Wolframatokieselsäure Hydrat	Fluka (Neu-Ulm)

Alle hier nicht erwähnten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen und waren mindestens analysenrein (p.A.).

4.3 Reagenzien für die Zellkultur

4.3.1 Zelllinien

M21	John Wayne Cancer Institute (Santa Monica, USA)
K562	I.A.Z (München)
MOLT-4	I.A.Z (München)
Ramos	DSZM (Braunschweig)
WM-115	ATCC (Manassas, USA))

4.3.2 Sonstige Reagenzien

Amphotericin B	Sigma (Deisenhofen)
----------------	---------------------

EMEM-Medium mit L-Glutamin	Sigma (Deisenhofen)
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	PAA (Cölbe)
Fötale Kälberserum Kategorie „EU“	PAA (Cölbe)
Gentamicinsulfat	AppliChem (Darmstadt)
Natriumpyruvatlösung (100 mM)	Sigma (Deisenhofen)
Normocin TM	Cayla (Toulouse, Frankreich)
Streptomycinsulfat	ICN (Eschwege)
Penicillin G	ICN (Eschwege)

4.4 Spezielle Reagenzien für die Molekularbiologie

4.4.1 Primer

Die Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

Name	Integrin-Untereinheit	Sequenz
hlt2b.f	α_{11b}	5'-AggTgAgAgggAgCgAACA
hlt2b.r	α_{11b}	5'-TCCACCTTgAgAgggTTgAC
Italpha3.s	α_3	5'-gCCTgCCAAgCTAATgAgAC
Italpha3.a	α_3	5'-CACCAgCgAgTgAggATCA
Italpha4.s	α_4	5'-gAgTgCAATgCgACCTTgA
Italpha4.a	α_4	5'-TggATTTggCTCTggAAAAC
hItga5.s	α_5	5'-AgCgACTggCATCCCCgAgA
hItga5.as	α_5	5'-ACCCTCgggATCCAACCTCCA
Italpha8.s	α_8	5'-CACATTCTggTggACTgTgg
Italpha8.a	α_8	5'-AATCCCTTgTTgTTgCgTTC
Italphav.s	α_v	5'-ACgACCCCAATgTTACAgC
Italphav.a	α_v	5'-gTCCTTgCTgCTCTTggAAC
Itbeta1.s	β_1	5'-ATCTgCgTgTggTgTCTg
Itbeta1.a	β_1	5'-ggggTAATTTgTCCCgACTT
hltb6.f	β_6	5'-TgCgACCATCgTgAAgAAg
hltb6.r	β_6	5'-gACAACCCCgATgAgAAgAA

4.4.2 Reagenzien

Oligo(dT)-Primer	Roche (Mannheim)
dNTP-Mix	Roche (Mannheim)
Expand Reverse Transkriptase	Roche (Mannheim)
Taq PCR-Mastermix	Qiagen (Hilden)

4.5 Antikörper

4.5.1 Antikörper für Western-Blotting

Tab. 3: Primäre Antikörper.

Name	Integrin-Untereinheit	Spezies	Verdünnung
I-19	α_3	Ziege	1:200
H-210	α_4	Kaninchen	1:200
H-104	α_5	Kaninchen	1:200
K-18	α_{IIb}	Ziege	1:200
Q-20	α_v	Ziege	1:200
M-106	β_1	Kaninchen	1:150
C-20	β_3	Ziege	1:200

Die Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg) bezogen und mit PBS-Tween verdünnt.

Tab. 4: Sekundäre Antikörper.

Name	Verdünnung	Firma
Esel-anti-Ziege	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
Anti-Kaninchen	1:10000	Rockland (Gilbertsville, USA)

Beide Antikörper sind mit Meerrettichperoxidase konjugiert und wurden mit PBS-Tween verdünnt.

4.5.2 Antikörper für Durchflusszytometrie

Name	Integrin	Firma
LM609	$\alpha_v\beta_3$	Chemicon (Hofheim)
P1F6	$\alpha_v\beta_5$	Chemicon (Hofheim)
3S3	β_1	Serotec Ltd (Oxford, Uk)
MOPC-21	Isotypkontrolle IgG1	Sigma (Deisenhofen)

Alle Antikörper sind mit Fluoresceinisothiocyanat konjugiert.

4.6 Proteine, Standards und Kits

4.6.1 Proteine

Humanes $\alpha_5\beta_1$ Integrin	Chemicon (Hofheim)
Humanes $\alpha_v\beta_3$ Integrin	Chemicon (Hofheim)
Humanes Plasmafibronektin (Zelladhäsionstest, SPR)	Gibco-BRL (Eggenstein)
Humanes Plasmafibronektin (Zelladhäsionstest, SPR)	ICN (Eschwege)
Humanes Plasmafibronektin (Zelladhäsionstest)	Sigma ((Deisenhofen)
Humanes Plasmafibronektin (SPR)	Biomol (Hamburg)
Rinderserumalbumin	PAA (Cölbe)
Trypsin	Sigma (Deisenhofen)

4.6.2 Standards

DNA-Längenstandard (100 bis 5000 Basenpaare)	MBLL (Bielefeld)
Hyperladder IV TM (100 bis 1000 Basenpaare)	Bioline GmbH (Luckenwalde)
Nondenatured Protein Molecular Weight Marker Kit (14 bis 545 kD)	Sigma (Deisenhofen)
SeeBlue [®] Plus2 Pre-Stained Standard (4 bis 250 kD)	Invitrogen (Karlsruhe)
Precision Plus Protein Standard (10 bis 250 kD)	BIO-RAD (München)

4.6.3 Kits

MicroBC Assay: protein quantitation kit	Interchim (Montluçon, Frankreich)
NucleoSpin [®] RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
EZ-Link TM Sulfo-NHS Biotinylation Kit	PERBIO Science (Bonn)

4.7 Peptide

Peptidsequenz	Chiffre	Verwendungszweck
c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)	P1	DFZ, ZAT, SPR
c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-β-Leu-)	P3	ZAT
c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-β-Ala-)	P4	DFZ, ZAT, SPR
c-(-Arg-Gly-Asp-D-β-Phe-Val-)	P5	ZAT, SPR
c-(-Arg-Gly-Asp-D-β-Phe-Val-Gly-)	P6	ZAT
c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Gly-)	P9	DFZ, ZAT
c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-β-Leu-Gly-)	P10	DFZ, ZAT
c-(-Arg-Gly-Asp-D-β-HPhe-)	P11	DFZ, ZAT
c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-β-Leu-Ala-)	P14	ZAT
c-(-Arg-Gly-Asp-D-1-Nal-) ^[a]	M154	ZAT
H-Gly-Ala-c-(Cys ^[S-S] -Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys ^[S-S])-Gly-Ala-O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂ -NH ₂	M215	ZAT, SPR
Ac-Gly-Ala-c-(Cys ^[S-S] -Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys ^[S-S])-Gly-Ala-O(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂ -NH ₂ ^[b]	M220	SPR

DFZ = Durchflusszytometrie, ZAT = Zelladhäsionstest, SPR = Oberflächenplasmonresonanz,
[a] D-1-Nal: D-1-Naphthylalanine, [b] Acetylrest

Die Peptide wurden von Anke Nieß, Miroslav Malesevic, Annett Müller, Christian Riedel, sowie Marco Wißbrock synthetisiert und charakterisiert.

4.8 Puffer- und Salzlösungen

Pucks Salzlösung

5.4 mM KCl
136 mM NaCl
4.1 mM NaHCO₃
5.6 mM D-Glucose

PBS

7.5 mM K₂HPO₄
1.5 mM KH₂PO₄
136 mM NaCl

HBSS

5.4 mM KCl
0.4 mM KH₂PO₄
136 mM NaCl
4.1 mM NaHCO₃
0.3 mM Na₂HPO₄

TBS

137 mM NaCl
100 mM Tris-HCl (pH 7.3)

HBS

10 mM HEPES (pH 7.4)
150 mM NaCl
1 mM MnCl₂
1 mM MgCl₂

5 Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Allgemeine Hinweise zur Steriltechnik

Bei der Kultivierung von Zellen ist die gute mikrobiologische Praxis von grundlegender Bedeutung. Nur durch strenge Einhaltung ihrer einzelnen aseptischen Arbeitsschritte lässt sich sowohl eine mikrobiologische Kontamination, als auch eine Kreuzkontamination mit anderen Zellarten verhindern.

Einige Grundsätze der guten mikrobiologischen Praxis (GMP) sind:

- Verwendung einer Reinraumwerkbank für alle sterilen Arbeitsschritte
- Ausschließliche Verwendung von autoklavierten bzw. sterilisierten Materialien für alle sterilen Arbeitsschritte
- Gründliche Desinfektion des Arbeitsmaterials
- Gründliche Hygiene in den entsprechenden Arbeitsbereichen
- Tragen von entsprechender Schutzkleidung
- Entsprechende Inaktivierung und Entsorgung der anfallenden Abfälle

5.1.2 Auftauen von gefrorenen Zellkulturen

Nach der Lagerung in flüssigem Stickstoff müssen die Zellen nach einem bestimmten Schema aufgetaut werden, um ein optimales Anwachsen der Kultur zu gewährleisten.

Durchführung

Das entsprechende Tiefgefrier Röhrchen wird dem Stickstoffbehälter entnommen und unmittelbar in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Sobald die Suspension aufgetaut ist, wird die Kultur in 8 ml auf 37 °C vorgewärmtem Medium resuspendiert und 5 min bei 150 x g zentrifugiert. Dann wird der Überstand abgesaugt, die Zellen in 5 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und in die entsprechende Kulturflasche überführt.

5.1.3 Kultivierung humaner Zelllinien

K562 ZELLEN

Die K562 Zellen werden bei 37 °C in einer Atmosphäre bestehend aus 5 % CO₂ und 95 % Luft kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche = 75 cm²). Das Medium besteht aus 90 % RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 10 % fötalem Kälberserum und NormocinTM (100 µgml⁻¹). Die Subkultivierungsdichte der Zellen beträgt zwischen 1·10⁵ und 1·10⁶ Zellen pro Milliliter.

RAMOS ZELLEN

Für die Kultivierung der Ramos Zellen werden die gleichen Bedingungen eingehalten und das gleiche Medium, wie bei der Kultivierung der K562 Zellen verwendet. Die Subkultivierungsdichte liegt zwischen 3·10⁵ und 9·10⁵ Zellen pro Milliliter.

MOLT-4 ZELLEN

Die MOLT-4 Zellen werden bei analogen Bedingungen wie die K562 Zellen und die Ramos Zellen kultiviert. Die Subkultivierungsdichte liegt zwischen 3·10⁵ und 9·10⁵ Zellen pro Milliliter.

M21 ZELLEN

Die Kultivierungsbedingungen entsprechen denen für die K562 Zellen. Als Medium wird RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin verwendet, dem 10 % fötales Kälberserum und Streptomycin-sulfat/Penicillin G (100 µgml⁻¹; 100 Uml⁻¹) zugesetzt wird. Subkonfluente Kulturen werden 1:3 bis 1:6 geteilt, so dass die Zelldichte 2 – 3 · 10⁴ Zellen pro Milliliter beträgt.

WM 115 ZELLEN

Die Zellen werden unter den gleichen Bedingungen wie die K562 Zellen kultiviert. Als Medium wird EMEM-Medium mit 2 mM L-Glutamin, 1 % nichtessenzielle Aminosäuren, 1 % Natriumpyruvat, 10 % fötales Kälberserum und NormocinTM (100 µgml⁻¹) verwendet. Die Zellen werden bei 70-80 %iger Konfluenz kultiviert und dann zwischen 1:3 und 1:6 geteilt. Die Zelldichte nach der Teilung beträgt 2-3·10⁴ Zellen pro Milliliter.

5.1.4 Einfrieren und Lagerung humaner Zelllinien

Die Lagerung von Zellkulturen erfolgt vorzugsweise in flüssigem Stickstoff (T = -196 °C), weil so die Vitalität der Zellen über Jahre hinweg gewährleistet ist. Als Schutzsubstanzen dienen Glycerin und Dimethylsulfoxid, die einerseits die Kristallbildung innerhalb der Zellen und andererseits die partielle Dehydratation des Cytoplasmas verhindern.

Durchführung

Einfriermedium

Kulturmedium

10 % (v/v) DMSO

Die Zellen werden zentrifugiert und in so viel Einfriermedium resuspendiert, dass ihre Dichte ideal für eine spätere Kultivierung ist.

Jeweils 1.8 ml der Suspension werden in ein Tiefgefrier Röhrchen gegeben und 2 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Medium wird bis auf 0.8 ml abgesaugt und die Röhrchen in einem Styroporbehälter über Nacht bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag werden sie in einen Flüssigkeitsstickstoffbehälter überführt.

5.1.5 Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer (Hämocytometer)

Die Ausgangszellzahl ist für die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen von großer Bedeutung und sollte mittels Zählung bestimmt werden. Eine Möglichkeit ist die Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer.

Durchführung

Auf die gereinigte Zählkammer wird das Deckglas so aufgelegt, dass die so genannten „Newtonringe“ sichtbar werden. Nur dann ist die Tiefe der Kammer optimal eingestellt und eine genaue Zählung möglich. Anschließend wird die Zählkammer mit Zellsuspension gefüllt und auf ein Mikroskop gelegt. Bei der Zählung der Zellen sollten mindestens vier große Quadrate ausgewertet werden; Zellen, die auf Linien liegen, werden nur einmal gezählt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgt über Mittelwertbildung und unter Anwendung der vom Hersteller angegebenen Auswertungsformel für die jeweilige Zählkammer.

5.1.6 Trypanblaufärbung als Vitalfärbung

Die Färbung von Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau ist dazu geeignet, die Lebensfähigkeit von Zellen zu bestimmen. Der Test basiert darauf, dass der Farbstoff nicht in das Innere von lebenden Zellen gelangen kann, während sich tote Zellen mit dem Farbstoff anfärben.

Durchführung (Lindl, 2000)

Die Zellen werden geerntet, einmal mit HBSS gewaschen und in 10 ml HBSS resuspendiert. Zu einem bestimmten Volumen an Zellsuspension in HBSS (ohne Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen) wird die 30fache Menge an 0.5 %iger Trypanblaulösung gegeben. Der Ansatz wird mit einer

Pipette durchmischt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Suspension noch einmal gut durchmischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Mit der Zählung wird sofort begonnen, weil die Zytotoxizität des Trypanblaus zu einer Ergebnisverfälschung führen könnte.

5.1.7 Sporenfärbung nach Rakette

Die Sporenfärbung nach Rakette (Winkle, 1979) ermöglicht die Anfärbung von Kontaminationen in der Zellkultur. Pilzsporen erscheinen grün, während Bakterienleiber rosarot gefärbt werden.

Durchführung

Malachitgrünlösung

1 g Malachitgrün
in 19 ml *Aqua dest.* lösen

Eosinlösung

0.5 g Eosin G
in 20 ml *Aqua dest.* lösen

Die zu untersuchende Probe wird auf einem Objektträger hitzefixiert und im Anschluss 20 sec in der Malachitgrünlösung „aufgekocht“. Nach 30 sekündigem Einwirken wird der Objektträger mit *Aqua dest.* abgespült. Zur Gegenfärbung wird das Präparat für 1 min in die Eosinlösung gegeben. Anschließend wird der Objektträger mit *Aqua dest.* gespült, getrocknet und unter dem Mikroskop betrachtet.

5.2 Durchflusszytometrie

Die in den sechziger Jahren entwickelte Durchflusszytometrie stellt ein wichtiges Werkzeug der Zellbiologie dar. Sie ist universell einsetzbar und ermöglicht es jeden zellulären Parameter, der sich in Fluoreszenzintensität ausdrücken lässt, zu erfassen. Darüber hinaus ist es möglich, die Zellen anhand bestimmter Kriterien zu sortieren und anzureichern. Zur Messung wird ein sogenannter Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (*FACS*) eingesetzt, dessen schematischer Aufbau in Abbildung 14 dargestellt ist.

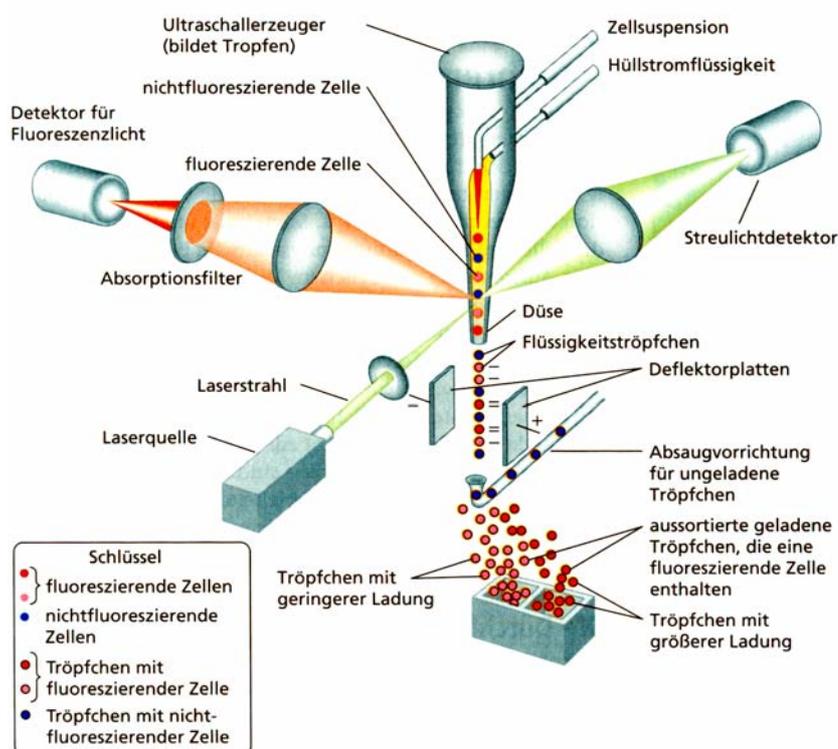


Abb. 14: Darstellung eines Fluoreszenzaktivierten Zellsortierers (Lodish et al., 2001)

Bevor die eigentliche Messung im *FACS* stattfindet, werden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper, der z. B. gegen ein Zelloberflächenprotein gerichtet ist, inkubiert. Exprimieren die Zellen dieses Protein, wird der Antikörper gebunden. Bei der Messung selbst wird dann die Zellsuspension mit einer Trägerflüssigkeit verdünnt und die Zellen passieren einen Laserstrahl. Dabei wird das von jeder Zelle emittierte Fluoreszenzlicht gemessen. Parallel zur Fluoreszenz wird die Lichtstreuung gemessen, um so eine Aussage über die

Größe und Gestalt der Einzelzellen und damit der gesamten Zellpopulation machen zu können.

Viele FACS-Geräte bieten darüber hinaus die Möglichkeit Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenz zu sortieren. Hierzu wird die Zellsuspension mittels einer Düse so fein aufgetrennt, dass jedes Flüssigkeitströpfchen nur eine Zelle enthält. Diese Tröpfchen werden in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung, die proportional zu ihrer Fluoreszenz ist, abgelenkt und können so sortiert werden. Auf diese Weise können Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften getrennt und in einer homogenen Zellkultur weiterkultiviert werden.

Da bei Fluoreszenzmessungen mithilfe der Durchflusszytometrie nur relative Fluoreszenzen ermittelt werden, ist es unerlässlich, entsprechende Negativkontrollen mitzuvermessen:

- a) Kontrolle zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz
Probe ohne Antikörper
- b) Spezifitätskontrolle
Probe mit einem für das Experiment irrelevanten Antikörper derselben Subklasse wie der spezifische Antikörper

Die Negativkontrollen liefern bei der Auswertung der Messergebnisse den Bezugspunkt, ohne den keine fundierte Deutung der Ergebnisse möglich wäre.

5.2.1 Charakterisierung der M21 Zellen

Bindungspuffer

PBS

2 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂

Die M21 Zellen werden zweimal mit Bindungspuffer gewaschen und mit einer 0.5 mM EDTA-Lösung vom Boden der Petrischalen abgelöst. Nach Zugabe der neunfachen Menge an Bindungspuffer werden die Zellen zentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt und die Zellen werden zweimal mit Bindungspuffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen in Bin-

dungspuffer resuspendiert und auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter eingestellt.

Zur Untersuchung der Integrinexpression werden die Zellen entweder mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper LM609 ($15 \mu\text{gml}^{-1}$) oder mit dem $\alpha_v\beta_5$ -Antikörper P1F6 ($15 \mu\text{gml}^{-1}$) inkubiert. Als Isotypkontrolle wird das gereinigte Immunglobulin MOPC-21 ($15 \mu\text{gml}^{-1}$) verwendet. Die Zellen werden 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Hinzufügen von 1 ml Bindungspuffer werden die Proben zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird in $500 \mu\text{l}$ Bindungspuffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

5.2.2 K562 Zellen: Überprüfung der Integrinexpression und der Integrinaktivität

Bindungspuffer

Pucks Salzlösung

2 mM MgCl_2

2 mM MnCl_2

Zu Beginn des Experiments werden die K562 Zellen mit unterschiedlichen Reagenzien (Tab. 5) behandelt, welche die Aktivität des exprimierten $\alpha_5\beta_1$ Integrins erhöhen sollen.

Tab. 5: Aktivierungsreagenzien und -bedingungen

Substanz	effektive Konzentration	Bedingungen
Manganionen	1 – 2 mM	30 min auf Eis
DTE	1 mM	30 min bei 37°C
TPA	8 – 16 nM	18 h bei 37°C

Dann werden die Zellen in so viel Bindungspuffer resuspendiert, dass die Zellkonzentration $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter beträgt. $200 \mu\text{l}$ Zellsuspension werden mit der empfohlenen Menge des β_1 -Antikörpers 3S3 ($10 \mu\text{gml}^{-1}$) versetzt und 45 min im Dunkeln bei

Raumtemperatur geschüttelt. Zur Isotypkontrolle wird das gereinigte Immu-noglobulin MOPC-21 ($10\mu\text{gml}^{-1}$) eingesetzt, das mit analogen Proben versetzt wird. Nach der Inkubation wird zu den Proben jeweils 1 ml Bindungspuffer hinzugegeben. Die Proben werden 10 min bei 20 °C und 130 x g zentrifugiert; der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 500 μl Bindungspuffer resuspendiert.

Die Proben werden bis zur Messung im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

5.2.3 Konkurrenzexperimente mit K562 Zellen

Die Konkurrenzexperimente werden analog dem für die Untersuchung der β_1 -Expression entwickelten Protokoll durchgeführt. Der einzige Unterschied besteht im Inkubationsschritt mit den Peptiden. Sie werden der Zellsuspension vor der Inkubation mit dem Antikörper bzw. der Isotypkontrolle in unterschiedlichen Konzentrationen (1.5 μM - 150 μM) zugesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

5.2.4 Durchführung und Auswertung der FACS-Messung

DURCHFÜHRUNG DER FACS-MESSUNG

Zu Beginn der Messung müssen zunächst die Lichtstreuparameter eingestellt werden, um die für das Experiment relevante Zellpopulation vermessen zu können. Hierzu werden die Detektoren FSC (*Forward Scatter*) und SSC (*Side Scatter*) so eingestellt, dass die Punkteschar der vitalen Zellen in der Mitte des Bildschirms liegt, während sich die Zelltrümmer im linken äußeren und die Zellaggregate im rechten äußeren Bereich befinden.

Für die Messung von FITC-markierten Proben wird der Filter FL1 verwendet, welcher einen Messbereich von 515 – 545 nm aufweist. Pro Probe werden 10000 Ereignisse vermessen.

AUSWERTUNG DER FACS-MESSUNG

Für die Auswertung der Messergebnisse wird das Programm *CELLQuestTM* verwendet. Damit sich die tief gehendere Analyse der Ergebnisse nur die vitalen Zellen bezieht, ist es als Erstes notwendig, diese Zellen auszuwählen. Dazu wird in einem *Dot Plot* der x-Parameter FSC gegen den y-Parameter SSC aufgetragen, wobei der FSC ein Maß für die Zellgröße und der SSC ein Maß für die interne Granularität oder Komplexität der Zellen ist. Im *Dot Plot*, in dem jeder Punkt einem vom FACS analysierten Ereignis entspricht, wird der Bereich der relevanten Zellen durch das Einrahmen der entsprechenden Region (*Gate*) ausgewählt.

Zum Vergleich der vermessenen Proben werden Fluoreszenz-Histogramme verwendet, in denen die ausgewählten Ereignisse (y-Achse) gegen die relative Fluoreszenzintensität (x-Achse) aufgetragen werden. Durch das Übereinanderlegen der einzelnen Histogramme oder durch die Auswahl einer geeigneten Markerregion können die einzelnen Messergebnisse verglichen werden.

5.3 Der Zelladhäsionstest

Der Zelladhäsionstest ist eine weitverbreitete Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei wird das eine Protein auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert, während das andere Protein an der Zelloberfläche präsentiert wird. In Konkurrenzexperimenten können so Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion untersucht werden.

TESTVORBEREITUNGEN

18 h vor Durchführung des Tests werden die K562 Zellen mit TPA behandelt, wobei die effektive TPA-Konzentration im Medium 10 nM ist. Der Test wird in Mikrotiterplatten (MaxisorpTM, NUNC) durchgeführt, deren Vertiefungen über Nacht bei 37 °C mit Fibronectin (20 µgml⁻¹) beschichtet werden.

TESTVORBEREITUNGEN AM TESTTAG

Zum Blockieren der unbesetzten Stellen auf der Mikrotiterplatte wird die Fibronectinlösung aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfernt und durch eine 1 %ige (w/v) BSA-Lösung in *Aqua dest.* ersetzt. Die Platte wird 2 h bei 37 °C inkubiert.

Die K562 Zellen werden geerntet und zweimal mit Pucks Salzlösung gewaschen. Dann werden Zellen gezählt und die Suspension auf eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt. Im Anschluss wird der Zellsuspension so viel einer 0.1 M $MnCl_2$ -Stammlösung hinzugefügt, bis die effektive Konzentration 2 mM ist. Die Zellen werden 20 min auf Eis inkubiert. Dann wird der β_1 -aktivierende Antikörper TS2/16 ($10 \mu\text{gml}^{-1}$) hinzugefügt und die Zellsuspension wird weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

TESTDURCHFÜHRUNG

Die Zellsuspension wird mit den unterschiedlichen Peptiden ($0.7 \text{ ngml}^{-1} - 70 \mu\text{gml}^{-1}$) versetzt und bei Raumtemperatur 30 min geschüttelt. Anschließend wird die BSA-Lösung von der Mikrotiterplatte entfernt und die mit den Peptiden behandelten Zellen in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Die Platte wird bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 1 h wird die Zellsuspension abgesaugt und die adhärenen Zellen werden 30 min mit einer 5 %igen (v/v) Glutaraldehydlösung in Wasser fixiert. Dann werden die Vertiefungen zweimal mit Pucks Salzlösung gewaschen und 1 h mit einer Färbelösung bestehend aus 0,1 % (w/v) Kristallviolett und 200 mM MES (pH 6.0) gefärbt (Mould *et al.*, 1995a). Im Anschluss wird die Farbelösung abgesaugt und die Vertiefungen werden zweimal mit *Aqua dest.* gewaschen. Zum Extrahieren der Färbung aus den Zellen wird eine 0.1 M Zitronensäurelösung in Ethanol verwendet. Nach 30 min ist die Entfärbung abgeschlossen und die Absorption der Lösung wird bei 560 nm mithilfe eines Spektrometers (Tecan) vermessen.

5.3.1 Testauswertung

Im ersten Schritt der Testauswertung werden die Blindwerte von den anderen Werten subtrahiert, um die Ergebnisse der drei, unabhängig voneinander durchgeführten Plattentests vergleichen zu können. Dann werden die Messergebnisse durch Mittelwertbildung ausgewertet. Als Maß für die Reproduzierbarkeit des Tests dient die Standardabweichung der Werte. Zur Berechnung der IC_{50} -Werte und zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wird das Programm *GraphPad PRISM 4.0* (GraphPad Software Inc.) verwendet.

5.4 Proteinchemische Methoden

5.4.1 Zellaufschluss und Herstellung von Membranextrakten

Der Aufschluss der Zellen und die folgende Solubilisierung der Proteine sind für die Gewinnung von Membranextrakten von entscheidender Bedeutung (Schrattenholz, 2001). Bei allen Schritten der Präparation muss eine chemische Veränderung des biologischen Materials verhindert werden. Dabei sollte beachtet werden, dass das Zellmaterial möglichst schnell nach der Gewinnung homogenisiert bzw. lysiert wird und alle Puffer, die während der Präparation verwendet werden, Proteaseinhibitoren enthalten.

STANDARDMETHODE (Bollag *et al.*, 1996)

Bei dieser Methode werden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Schwingungen führen zu einer Zerstörung der Zellmembran. Dabei besteht allerdings die Gefahr der Denaturierung des Proteins durch Schäumen und Überhitzung.

Durchführung

Extraktionspuffer

HBS

0.5 % (w/v) Triton X-100

Die folgenden Schritte werden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt.

Die Zellsuspension wird zweimal mit HBS gewaschen und anschließend in dem dreifachen Pelletvolumen Extraktionspuffer resuspendiert. Dann werden die Zellen unter Verwendung eines Ultraschallstabes aufgeschlossen (drei 10 sekundige Pulse bei Raumtemperatur). Die Suspension wird 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Pellets wird der Überstand 1.5 h bei 90000 x g zur Membransedimentierung zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet in dem doppelten Volumen Extraktionspuffer resuspendiert und zum Extrahieren der Membranproteine über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wird die Suspension 20 min bei 15000 x g zur Sedimentation der Kernproteine, des Cytoskeletts und der extrazellulären Matrix zentrifugiert. Der Überstand enthält die gewünschten Membranproteine und wird für weitere Untersuchungen verwendet.

MODIFIZIERTE METHODE NACH BELKIN (Belkin *et al.*, 1990)

Bei dieser Methode werden die Zellen mit Hilfe von Detergenzien aufgeschlossen. Diese Art des Zellaufschlusses ist weitverbreitet, da sie im Vergleich zu mechanischen Methoden schonender für die Proteine ist.

Durchführung

a) Zellernte

Die Zellen werden aus der Flasche entnommen und zentrifugiert; der Überstand wird verworfen. Um Medienreste zu entfernen, werden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Da sich die Volumina der in den folgenden Schritten verwendeten Puffer am Nassgewicht des Zellpellets orientieren, wird das Pellet gewogen. Zur Vorbereitung auf den folgenden Pufferwechsel wird das Pellet mit 0.5 mM PMSF in sterilem *Aqua dest.* gewaschen.

b) Extraktion der peripheren Membranproteine

Dieser Extraktionsschritt mit einem Puffer, der eine geringe Ionenstärke aufweist, dient der Abtrennung peripherer Membranproteine wie z. B. Vinculin und der Desaktivierung von Matrixmetalloproteinasen (Feramisco & Burrige, 1979; Koteliansky *et al.*, 1985; Kelly *et al.*, 1987). 200 mg Pellet werden mit 1.5 ml eines Puffers bestehend aus 20 mM Tris (pH 9.0), 1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF versetzt und bei 37 °C 1 h geschüttelt.

c) Entfernung des Puffers und Waschen des Pellets

Die Zellsuspension wird bei 20000 x g 10 min zentrifugiert und mit 1.7 ml 0.5 mM PMSF in sterilem *Aqua dest.* gewaschen.

d) Extraktion der integralen Membranproteine

Bei diesem Schritt werden die integralen Membranproteine einschließlich der Integrine extrahiert. Dazu wird das Pellet mit 400 µl eines Extraktionspuffers bestehend aus 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF und 0.5 % (w/v) Triton X-100 oder 100 mM Octyl-β-D-glucopyranosid versetzt und 15 h bei 4 °C geschüttelt.

e) Klärung des Membranextraktes

Die Suspension wird bei 20000 x g und 4 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand enthält die integralen Membranproteine und kann direkt verwendet werden.

f) Lagerung des Membranextraktes

Der Membranextrakt kann bei -80 °C für mehrere Wochen gelagert werden.

MODIFIZIERTE METHODE NACH PYTELA (Pytela *et al.*, 1987)

Der Zellaufschluss erfolgt bei dieser Methode ebenfalls mittels Detergenzien.

Durchführung

a) Zellernte

Die Zellen werden aus der Flasche entnommen und zentrifugiert; der Überstand wird verworfen. Um Medienreste zu entfernen, werden die Zellen zweimal mit PBS, das 1 mM CaCl₂ und 1 mM MgCl₂ enthält, gewaschen.

d) Extraktion der Membranproteine

Das Pellet wird mit der doppelten Menge Extraktionspuffer bestehend aus PBS (pH 7.4), 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF und 100 mM Octyl-β-D-glucopyranosid versetzt und 15 h bei 4 °C geschüttelt.

e) Klärung des Membranextraktes

Die Suspension wird bei 20000 x g und 4 °C 20 min zentrifugiert. Der Überstand enthält die integralen Membranproteine und kann direkt verwendet werden.

f) Lagerung des Membranextraktes

Der Membranextrakt kann bei -80 °C für mehrere Wochen gelagert werden.

5.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei wirken die Poren des Gels als Sieb. Die Porengröße hängt vom Mischungsverhältnis der beiden monomeren Komponenten des Acrylamidgels, dem Acrylamid und dem N,N'-Methylen-bisacrylamid, ab und wird nach der molaren Masse der Proteine ausgewählt.

Bei dieser Form der Elektrophorese hat die Nettoladung der Proteine keinen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit, weil die Proteine vor der Elektrophorese mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt werden. Dieses Detergens sorgt für eine vollständige „Entfaltung“ des Proteins und führt zu einer negativen Ladung des Proteins. Die negative Ladung des Proteins ist proportional zu seinem Molekulargewicht, so dass eine Auftrennung der Proteingemische nach Größe der Einzelkomponenten möglich ist. Über mit aufgetragene Standards mit bekannten Molekulargewichten kann das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine berechnet werden.

SDS-PAGE UNTER REDUZIERENDEN BEDINGUNGEN

Bei der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen werden dem Probenpuffer reduzierende Thiolverbindungen wie z. B. β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol zugesetzt. Diese Substanzen führen zur Aufspaltung der Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten und damit zum Auflösen der Tertiärstruktur von Proteinen.

Durchführung**Trenngelpuffer**

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

Sammelgelpuffer

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

Probenpuffer

1.75 ml Sammelgelpuffer

1.5 ml Glycerin

5 ml 10 % (w/v) SDS

0.5 ml β -Mercaptoethanol

1.25 ml gesättigte Bromphenolblaulösung

Elektrodenpuffer

190.0 mM Glycin

25.0 mM Tris

0.1 % (w/v) SDS

MolekulargewichtsstandardSeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)

Bereich: 4 - 250 kD

Der Standard wird gebrauchsfertig geliefert.

Tab. 6: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen.

	Trenngel 8.5 %	Trenngel 9 %	Trenngel 9.5 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
<i>Aqua dest.</i>	4.47 ml	4.35 ml	4.22	4.1	2.89
Trenngelpuffer	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	1.26 ml
10 % SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	50 μ l
40 % Acrylamid/ Bisacrylamid 29 :1	2.13 ml	2.25 ml	2.38 ml	2.5 ml	0.5 ml
1.5 % APS ^{*)}	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.3 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
insgesamt (für 2 Gele)	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	5 ml

*) Starter der Polymerisation, erst unmittelbar vor der Verwendung hinzufügen

Die Herstellung der Gele erfolgt im Idealfall einen Tag vor ihrer Verwendung, da die Komponenten erst nach mehreren Stunden vollständig durchpolymerisiert sind. Sollen die Gele noch am gleichen Tag verwendet werden, kann die Polymerisation durch einstündiges Inkubieren bei 37 °C beschleunigt werden.

Für die Herstellung der Gele werden zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten aufeinander gelegt und in die Gelgießapparatur eingespannt. In den Zwischenraum zwischen den Glasplatten wird anschließend so viel Trenngellösung gegeben, bis 4/5 des Volumens befüllt ist. Unmittelbar nach dem Befüllen wird das Trenngel mit 2-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wird das 2-Propanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegeben und der Probenkamm eingesetzt. Das polymerisierte Gel wird in feuchte Papiertücher eingeschlagen und in einen Folienbeutel gegeben. In dieser Form ist es im Kühlschrank bis zu 14 Tage haltbar.

Für die Elektrophorese wird das polymerisierte Gel in die Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt, die Kammern werden mit Elektrodenpuffer befüllt und die Probenaschen mit Elektrodenpuffer gespült. Vor dem Auftragen der Proteinproben werden diese 3 : 1 (Protein : Probenpuffer) mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Zur Konzentrierung der Proben in den Probenaschen wird die Elektrophorese zuerst für 5 min bei 60 V durchgeführt. Dann wird die Spannung auf 100 V erhöht. Nach 15 min haben die Proben das Sammelgel durchlaufen; die Auftrennung der Proben erfolgt ca. 50 min bei 200 V.

SDS-PAGE UNTER NICHT REDUZIERENDEN BEDINGUNGEN

Bei der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen wird auf reduzierende Thiolverbindungen im Probenpuffer verzichtet. Die Proteine werden zwar ebenfalls durch Zugabe von SDS und Erhitzen denaturiert, aber die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten bleiben erhalten.

Durchführung

Probenpuffer

1.75 ml Sammelgelpuffer

1.5 ml Glycerin

1.25 ml gesättigte Bromphenolblaulösung

Die restlichen Puffer, die Zusammensetzung der Gele und die Durchführung entsprechen der Versuchsvorschrift für die SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen.

SILBERFÄRBUNG NACH MERRIL

Die Silberfärbung basiert auf der Komplexbildung zwischen den Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cystein-Resten der Proteine und den in der Färbelösung enthaltenen Silberionen. Der Vorteil dieser Färbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit. In diesem Fall wurde das Protokoll von Merril *et al.* (Merril *et al.*, 1981) verwendet, dessen Nachweisgrenze bei ca. 5 ng Protein pro Bande liegt.

Durchführung

Fixierer

200 ml Methanol
40 ml Ethansäure
40 ml Glycerin (50 % (w/w))
120 ml *Aqua dest.*

Silberkomplexlösung

2 % (w/v) AgNO₃
2 % (w/v) NH₄NO₃

Moderator

10 % (w/v) Wolframatokieselsäure

Entwickler

3 % (w/v) Methanal

Beschleuniger

5 % (w/v) Na₂CO₃

Stopplösung

5 % (v/v) Ethansäure

Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel 20 min im Fixierer bewegt. Nach dem Entfernen des Fixierers wird das Gel zweimal für je 10 min mit *Aqua dest.* gewaschen. Im Anschluss kann das Gel gefärbt werden. Dafür werden jeweils 5 ml Silberkomplexlösung, 5 ml Moderator und 5 ml Entwickler in 35 ml *Aqua dest.* gegeben. Diese Lösung wird unmittelbar vor Beginn des Färbungsprozesses mit 50 ml Beschleunigerlösung vermischt. In der entstandenen Färbelösung wird das Gel so lange entwickelt, bis die Banden die gewünschte Intensität aufweisen. Dann wird das Gel in eine Stopplösung überführt, in der es bis zum Trocknen gelagert werden kann.

COOMASSIE BRILLIANT BLUE FÄRBUNG

Die Empfindlichkeit der verwendeten Coomassie Färbung liegt bei 100 ng Protein pro Bande. Der Vorteil dieser Lösung liegt darin, dass sie kein Methanol enthält und sich einfach mit Wasser entfärben lässt.

Durchführung

Färbelösung

0.05 % (w/v)	Coomassie Blue G-250
10 % (v/v)	Ethansäure
25 % (w/v)	2-Propanol

Nach der Elektrophorese wird das Trenngel analog zur Silberfärbung fixiert und gewaschen. Im Anschluss wird das Gel mit ca. 200 ml Färbelösung für 2 h gefärbt. Zur Entfärbung wird das Gel unter mehrmaligem Wasserwechsel über Nacht auf einem Horizontalschüttler bewegt.

REVERSIBLE KOLLOIDALE COOMASSIE BRILLIANT BLUE FÄRBUNG NACH MOLLOY

Die kolloidale *Coomassie* Färbung nach Molloy *et al.* (Molloy *et al.*, 1999) hat eine Empfindlichkeit von mindestens 25 ng Protein pro Bande und liegt damit zwischen der Silberfärbung und der klassischen *Coomassie* Färbung.

Durchführung

Färbelösung

0.1 % (w/v)	Coomassie Blue G-250
17 % (w/v)	Ammoniumsulfat
34 % (v/v)	Methanol
3 % (v/v)	ortho-Phosphorsäure

Die einzelnen Schritte dieser Färbung entsprechen denen der klassischen *Coomassie* Färbung. Allerdings wird das Gel über Nacht gefärbt und benötigt zum Entfärben in Wasser lediglich

2 h. Bei einer längeren Entfärbungszeit besteht die Gefahr, dass die Proteinbanden entfärbt werden.

5.4.3 Seminataive Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ziel der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist es, die native Form der zu trennenden Proteine zu erhalten. Deshalb wird auf sämtliche denaturierende (z. B. SDS) und reduzierende Substanzen (z. B. β -Mercaptoethanol) verzichtet. Darüber hinaus sollten alle Schritte bei 4 °C ablaufen, um die Denaturierung der Proteine durch Wärme zu verhindern.

In vorliegenden Fall wird eine seminataive Form der Gelelektrophorese durchgeführt, da zwar auf denaturierende und reduzierende Substanzen verzichtet wird, die Elektrophorese aber bei Raumtemperatur erfolgt.

Durchführung

Tennelpuffer

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Sammelgelpuffer

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Probenpuffer

3.1 ml Sammelgelpuffer

5 ml Glycerin

0.5 ml 1 %ige Bromphenolblaulösung

Elektrodenpuffer

192.0 mM Glycin

25.0 mM Tris

Molekulargewichtsstandard

Als Molekulargewichtsstandard wird das *Nondenatured Protein Molecular Weight Marker Kit* von Sigma für den Bereich von 14 - 545 kD verwendet. Die Lyophilisate der einzelnen Proteine werden entsprechend der Herstellerangaben rekonstituiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor der Elektrophorese wurden die entsprechenden Standardproteine aufgetaut und direkt auf das Gel aufgetragen, wobei jedes Protein in eine separate Tasche gegeben wird.

Tab. 7: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen.

	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
<i>Aqua dest.</i>	3.89 ml	2.13 ml
Trenngelpuffer	2.5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1.0 ml
40 % Acrylamid/ Bisacrylamid 29 :1	3.33 ml	0.67 ml
1.5 % APS ^{*)}	333.33 µl	200 µl
TEMED	10 µl	5 µl
insgesamt (für 2 Gele)	10 ml	4 ml

***) Starter der Polymerisation, erst unmittelbar vor der Verwendung hinzufügen**

Die Vorgehensweise bei der Herstellung und Durchführung der Elektrophorese entspricht denen bei der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Der einzige Unterschied liegt in der Probenvorbereitung: Die Proteinproben werden 4 : 1 (Protein : Probenpuffer) mit Probenpuffer vermischt und sofort ohne Erhitzen auf das Gel aufgetragen.

5.4.4 Proteinfällung mit organischen Substanzen

Proteine lassen sich z. B. durch Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke oder durch Zugabe von mit Wasser unmischbaren organischen Lösungsmitteln ausfällen. Dieser Schritt dient der Abtrennung der Proteine von anderen gelösten Komponenten wie Detergenzien, Kohlenhydraten oder Nukleinsäuren und steht meist am Anfang der Proteinaufreinigung.

Durchführung

Der Membranextrakt wird mit der sechsfachen Menge Aceton versetzt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wird die Probe bei 4 °C und 20000 x g 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet für weitere Analysen verwendet.

5.4.5 Quantitative Proteinbestimmung

PROTEIN-QUANTIFIZIERUNG DURCH EINEN BCA-TEST NACH SMITH

Dieser Test nach Smith *et al.* (1985) basiert auf der Komplexbildung zwischen Proteinen und Cu^{2+} -Ionen, wobei letztere zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Die Cu^+ -Ionen bilden mit 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der spektrometrisch vermessen werden kann. Dieser Test toleriert bis zu einer gewissen Menge Detergenzien, so dass er besonders für die quantitative Bestimmung von Membranproteinen von Bedeutung ist. Dabei sollte auf komplexbildende Reagenzien (z. B. EDTA), reduzierende Stoffe (z. B. β -Mercaptoethanol) und Ammoniumsulfat in den verwendeten Lösungen verzichtet werden, da sie die Reaktion stören.

Durchführung

Für die Durchführung des Tests wird das *MicroBC ASSAY : protein quantitation kit* von Interchim verwendet. Die Proben und Reagenzienlösungen werden entsprechend der Firmenvorschrift vermischt, auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und bei einer Wellenlänge von 560 nm vermessen.

EINZELPROTEINQUANTIFIZIERUNG IN PROTEINGEMISCHEN

Zur Quantifizierung von Proteinen in Proteingemischen eignet sich die Methode von Bhowan & Bennett (1983). Sie besteht aus einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der anschließenden Elution der Proteine aus dem Gel. Die Konzentration der auf diese Weise getrennten Proteine kann dann z. B. durch einen BCA-Test bestimmt.

Durchführung

a) Seminataive Polyacrylamidelektrophorese

Als Erstes wurde eine seminataive Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Proteingemische aufzutrennen. SDS-PAGE sind ebenfalls geeignet; allerdings können Substanzen wie β -Mercaptoethanol den BCA-Test stören.

Im Anschluss an die Elektrophorese wird das Gel, wie bereits beschrieben, mit der Coomassie Brilliant Blue Färbung gefärbt.

b) Elution der Proteine aus dem Gel

Die Proteinbanden werden mithilfe eines Skalpellens aus dem Gel herausgeschnitten, in Reaktionsgefäße gegeben und mit 300 µl *Aqua dest.*, TBS oder PBS versetzt. Dann werden die Gelstücke zerkleinert und die Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur ca. 20 h geschüttelt. Nach der Elution werden die Proben zentrifugiert; der Überstand enthält die Proteine und kann im BCA-Test eingesetzt werden.

5.5 Immunchemische Methoden

5.5.1 Western Blotting

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Proteingemischen eignet sich das Western-Blotting (Towbin *et al.*, 1989; Egger & Bienz, 1994). Dabei werden die Proteine eines Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und anschließend einem immunchemischen Nachweis unterzogen.

ELEKTROBLOTTING DURCH SEMI-DRY-VERFAHREN

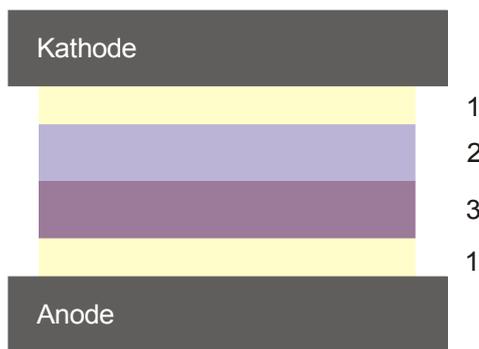
Der Transfer der Proteine auf eine proteinbindende Membran (z. B. Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluorid) durch Elektroblothing schließt sich unmittelbar an die Gelelektrophorese an. Dabei erfolgt der Transfer senkrecht zur Trennrichtung, um das Muster der getrennten Proteine exakt vom Gel auf die Membran zu übertragen.

Für den elektrischen Transfer gibt es zwei Verfahren: den Wet-Blot und den Semi-Dry-Blot. Das Semi-Dry-Verfahren zeichnet sich durch einen geringen Pufferverbrauch und eine kurze Transferzeit aus.

Durchführung**Transferpuffer**

39 mM	Glycin
48 mM	Tris
0.0375 % (w/v)	SDS
0.01 % (w/v)	NaN ₃
20 % (v/v)	Methanol

Die Nitrocellulosemembran und die Filterkartons werden entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten und 20 – 30 min mit Transferpuffer getränkt. Nach der Gelelektrophorese wird das Sammelgel abgetrennt. Das Trenngel wird kurz mit *Aqua dest.* gewaschen und anschließend für den Western-Blot verwendet.

**Abb. 15: Schematischer Aufbau eines Western-Blots nach dem Semi-Dry-Verfahren.**

(1) Filterpapiere, (2) Polyacrylamid-Gel, (3) Membran

Das Blotting-Sandwich wird, wie in Abbildung 15 dargestellt, aufgebaut. Hierfür werden ein bis vier der mit Transferpuffer getränkten Filterkartons auf den Boden der horizontalen Semi-Dry-Blotting-Apparatur gelegt. Dann folgt die Nitrocellulosemembran, auf welche luftblasenfrei das Gel gelegt wird. Den Abschluss bilden ein bis vier mit Transferpuffer getränkte Filterkartons.

Um mögliche Luftblasen aus dem Sandwich zu entfernen, wird mehrmals mit einem Kunststoffröhrchen über den Stapel gerollt. Der Transfer erfolgt für 40 min bei 16 V.

ÜBERPRÜFUNG DES TRANSFERS MIT PONCEAU S

Die Effizienz des Transfers lässt sich im Fall von Nitrocellulosemembranen mit Färbereagenzien wie z. B. Ponceau S überprüfen (Salinovich & Montelaro, 1986). Diese Färbereagenzien färben alle Proteine an, ohne mit der nachfolgenden Nachweisreaktion zu interferieren.

Durchführung

Ponceau S Lösung

0.1 % (w/v) Ponceau S

5 % (v/v) Ethansäure

Nach dem Transfer wird die Nitrocellulosemembran (nicht Polyvinylidendifluorid) mit Färbelösung überschichtet und so lange geschwenkt bis rote Banden entstehen. Die Hintergrundfärbung lässt sich durch Schütteln in *Aqua dest.* auflösen. Nach der Dokumentation lassen sich die gefärbten Proteinbanden durch Schütteln in TBS wieder entfärben und die Membran kann für die Nachweisreaktion verwendet werden.

NACHWEISREAKTION

Vor der eigentlichen Nachweisreaktion werden die Blots abgesättigt. Dabei werden überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran besetzt und damit eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien verhindert. Nach der Absättigung der Membran erfolgt als erster Teil der Nachweisreaktion die Bindung des Primärantikörpers an eines der transferierten Proteine. Zur Visualisierung der entstehenden Immunkomplexe schließt sich im zweiten Teil der Nachweisreaktion die Bindung eines Sekundärantikörpers an. Dieser Antikörper ist gegen konstante Bereiche des Primärantikörpers gerichtet und ist z. B. an Enzyme konjugiert, über welche die Bindung visualisiert werden kann.

Durchführung**PBS-Tween**

137 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
8.1 mM	Na ₂ HPO ₄
1.5 mM	KH ₂ PO ₄
0.1 % (w/v)	Tween 20

Blockierungspuffer

137 mM	NaCl
2.7 mM	KCl
8.1 mM	Na ₂ HPO ₄
1.5 mM	KH ₂ PO ₄
0.1 % (w/v)	Tween 20
5 % (w/v)	Trockenmilch

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran schließen sich folgende Schritte an:

a) Waschen der Membran

Die Membran wird mit PBS-Tween bedeckt und kurz geschwenkt.

b) Absättigung der Membran

Die Membran wird mit Blockierungspuffer überschichtet und unter langsamem Schwenken auf einem Horizontalschüttler 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt.

c) Waschen der Membran

Der Blockierungspuffer wird entfernt und die Membran wird einmal kurz mit PBS-Tween gewaschen.

d) Inkubation mit Primärantikörper

Die Primärantikörperlösung wird auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C unter langsamem Schütteln inkubiert.

e) Waschen der Membran

Die Primärantikörperlösung wird entfernt und die Membran dreimal 10 min bei Raumtemperatur mit reichlich PBS-Tween gewaschen.

f) Inkubation mit Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörperlösung wird auf die Membran gegeben und 1 h bei Raumtemperatur unter langsamem Schütteln inkubiert.

g) Waschen der Membran

Die Sekundärantikörperlösung wird entfernt und die Membran wird fünfmal 10 min bei Raumtemperatur mit reichlich PBS-Tween gewaschen. Anschließend kann der Blot gefärbt werden.

VISUALISIERUNG DURCH 3,3'-DIAMINOBENZIDIN (DAB)

Zur Visualisierung der Nachweisreaktion gibt es verschiedene Verfahren. Eines ist die Visualisierung durch DAB nach Harlowe & Lane (1988) und Brand *et al.* (1990). Bei dieser Methode setzt die an den Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP) eine Lösung aus DAB und Wasserstoffperoxid zu einer schwer löslichen, braunen Verbindung um.

Durchführung

Eine DAB-Tablette (Sigma) wird in 15 ml TBS gelöst. Dann werden 12 µl Wasserstoffperoxid hinzugefügt und die fertige Färbelösung unter Schwenken auf die Membran gegeben. Der Blot wird so lange mit der Färbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar sind. Dann wird die Färbelösung dekantiert und durch *Aqua dest.* ersetzt.

Da die Färbung lichtempfindlich ist, wird der Blot schnell zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und anschließend fotografiert.

VISUALISIERUNG DURCH 3,3',5,5'-TETRAMETHYLBENZIDIN (POD)

Ein weiteres Verfahren zur Visualisierung basiert auf dem Farbstoff POD (Brand *et al.*, 1990 ; Vargas *et al.*, 1993). Hierbei setzt die Meerrettichperoxidase eine Lösung aus POD, Wasserstoffperoxid und einem unbekanntem Präzipitationsverstärker zu einem blauen Farbstoff um.

Durchführung

Vom gebrauchsfertigen BM blue POD Substrat (Roche) wird so viel auf den Blot gegeben, bis dieser gerade bedeckt ist. Die Entwicklung erfolgt so lange, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind. Dann wird die Färbelösung verworfen und die Entwicklung durch *Aqua dest.* gestoppt. Der Blot wird zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und zügig fotografiert.

5.6 Molekularbiologische Methoden

5.6.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zellen

Für die Isolierung von RNA aus Geweben oder Zellen gibt es verschiedene Verfahren, die sich lediglich in der Art des Zellaufschlusses und in der Inaktivierung der RNAsen unterscheiden.

Durchführung

Für die RNA-Isolierung aus K562 Zellen wird das Kit *NucleoSpin RNA II* von Macherey-Nagel verwendet. Es ermöglicht eine schnelle Isolierung und Aufreinigung von RNA aus biologischen Proben. Dabei werden die Zellen mithilfe einer hohen Konzentration an chaotropen Ionen lysiert, und die RNA durch spezifische Bindung an eine Silikatmembran isoliert. Darüber hinaus werden auftretende RNAsen inaktiviert und die möglicherweise mit-isolierten Spuren an DNA entfernt. Die Menge an gewonnener RNA wird fotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

5.6.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Die so gewonnene DNA dient bei der sich anschließenden Polymerase Kettenreaktion als Matrize.

Die reverse Transkription wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 2 µg RNA, 5.7 µl H₂O und 1 µl Oligo(dT)-Primer werden vermischt und 10 min bei 65 °C inkubiert.
- Die Proben werden 2 min auf Eiswasser gekühlt.
- 4 µl 5-fach Reaktionspuffer, 4 µl dNTP-Mix (2.5 mM), 2 µl DTT und 0.5 µl RNase Inhibitor werden vermischt und 2 min auf 43 °C erwärmt.
- Der Lösung wird 1 µl *Expand Reverse Transcriptase* (Roche) zugesetzt; die reverse Transkription erfolgt 1 h bei 43 °C.
- Zur Inaktivierung des Enzyms wird die Lösung 10 min bei 70 °C inkubiert.
- Die so hergestellte cDNA kann direkt in einer Polymerase Kettenreaktion eingesetzt werden.

5.6.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine der wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie (Saiki *et al.*, 1988). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der *in vitro* Amplifikation von DNA.

Für die PCR wird pro Probe folgender Reaktionsansatz verwendet:

7.2 µl H₂O

10 µl Taq PCR-Mastermix

0.4 µl sense-Primer

0.4 µl antisense-Primer

⇒ **18 µl insgesamt + 2 µl Probe**

Nachdem alle Proben pipettiert sind, werden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gegeben und die PCR nach dem in Tabelle 8 dargestellten Programm durchgeführt.

Tab. 8: PCR-Programm

Schritt-Nr.	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit]
1	Denaturierung	94	4 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Primer-Hybridisierung	64	45 sec
4	Polymerisation	72	45 sec
35-fache Wiederholung der Schritte 2-4			
5	Polymerisation	72	10 min

Wurden alle Reaktionsschritte der PCR durchlaufen, werden die Proben auf 20 °C abgekühlt und auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

5.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten und RNA-Proben.

Durchführung

Elektrophoresepuffer

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

Probenpuffer

0.25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol

30 % (v/v) Glycerin

in *Aqua dest.*

Agarose-Gel

2 % (w/v) Agarose in Elektrophoresepuffer

DNA-Längenstandard Hyperladder IV™

Der Standard wird gebrauchsfertig von Bioline geliefert und erstreckt sich über den Bereich von 100 bis 1000 Basenpaare.

Die Agarose-Suspension wird vorsichtig erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 50 – 60 °C wird diese luftblasenfrei in die entsprechende Gelkammer mit Taschenschablone gegossen. Nach 20 min ist das Gel erstarrt und die Taschenschablone kann entfernt werden. Das Gel wird mit Elektrophoresepuffer überschichtet und die Proben, die zuvor mit 1/5 ihres Volumens an Probenpuffer versetzt worden sind, werden aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgt zunächst 10 min bei 60 V und dann ca. 1 h bei 100 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel kurz mit *Aqua dest.* gewaschen und ca. 30 min mit einer Ethidiumbromidlösung (50 µgml⁻¹) gefärbt. Im Anschluss wird das Gel kurz mit *Aqua dest.* gewaschen und zur Dokumentation im durchscheinenden UV-Licht mit einer Kamera fotografiert.

5.7 Oberflächenplasmonresonanz

Nur wenige Techniken haben die biomolekulare Analytik so massiv beeinflusst wie die affinitätsbasierten Biosensoren (Baird & Myszka, 2001).

1990 brachte die Firma BIACORE AB (Uppsala, Schweden) den ersten kommerziellen Biosensor auf den Markt (Jönsson *et al.*, 1991), womit der Siegeszug dieser Technologie begann. Heute wird neben der Resonanzspiegel-Technik (*Resonant-Mirror*, RM) überwiegend die Oberflächenplasmonresonanz-Technik (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) eingesetzt (Sjölander & Urbaniczky, 1991; Malmqvist, 1999; Rich & Myszka, 2000; Weimar, 2000), um biochemische Interaktionen zu analysieren. Während der Messung wird in Echtzeit die Änderung des Brechungsindex in einer dünnen Pufferschicht oberhalb des Sensorchips geprüft, welcher sich in Abhängigkeit von der Bildung und Auflösung biologischer Komplexe ändert (Squillante, 1998; Huber *et al.*, 1999).

Einer der wesentlichen Vorteile dieser Detektionsmethode ist darin zu sehen, dass sie sowohl markierungsfrei als auch nichtinvasiv arbeitet und für eine Messung nicht zwingenderweise aufgereinigte Analyten/Liganden notwendig sind (Baird & Myszka, 2001).

Damit stellt diese Technologie eine wertvolle Ergänzung zu klassischen biochemischen Methoden dar, welche die Analyse von schwer zugänglichen Systemen wie z. B. teilaufgereinigte Zellextrakte ermöglicht.

5.7.1 Prinzipien der Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz-Technik verwendet als optische Methode evaneszierende Wellen, wodurch sich der Brechungsindex einer dünnen (Flüssigkeits-) Schicht über dem Sensorchip bestimmen lässt (Weimar, 2000). Die Spezifität des Sensors wird dadurch erreicht, dass die Chip-Oberfläche durch die Immobilisierung eines Liganden modifiziert wird. Im eigentlichen Experiment wird eine, den potenziellen Bindungspartner (Analyt) enthaltende Lösung über den Chip geleitet und der Brechungsindex bestimmt. Da dieser wiederum von der an den Sensorchip gebundenen Masse abhängt, kann direkt beobachtet werden, wie viel Material am Sensorchip angelagert wird.

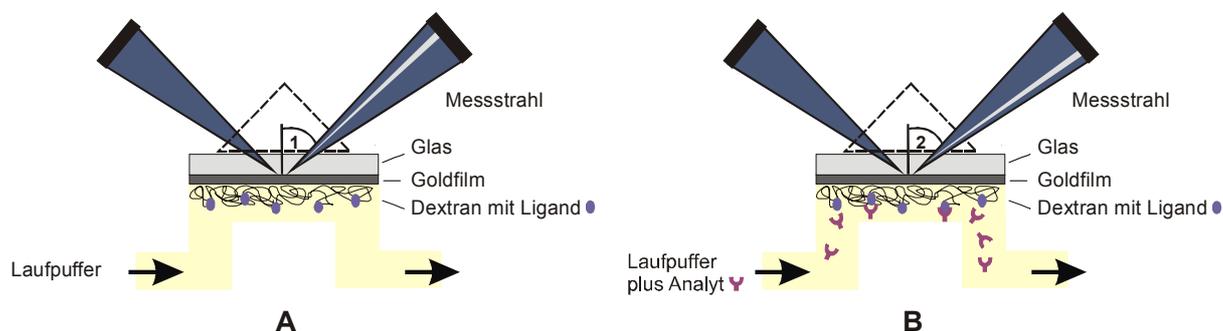


Abb. 16: Das Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz. In dieser Abbildung wird das Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz erläutert. (A) zeigt den Grundzustand: der Laufpuffer fließt über die Sensorchip-Oberfläche, welche den immobilisierten Liganden trägt. (B) demonstriert die Abläufe im Fall einer Interaktion zwischen Ligand und Analyt.

Die während der Messung aufgenommenen Daten werden simultan in Form eines so genannten Sensorgramms (Abb. 17) aufgezeichnet, so dass bereits während der Messung verfolgt werden kann, ob eine Wechselwirkung zwischen Analyt und Ligand stattfindet.

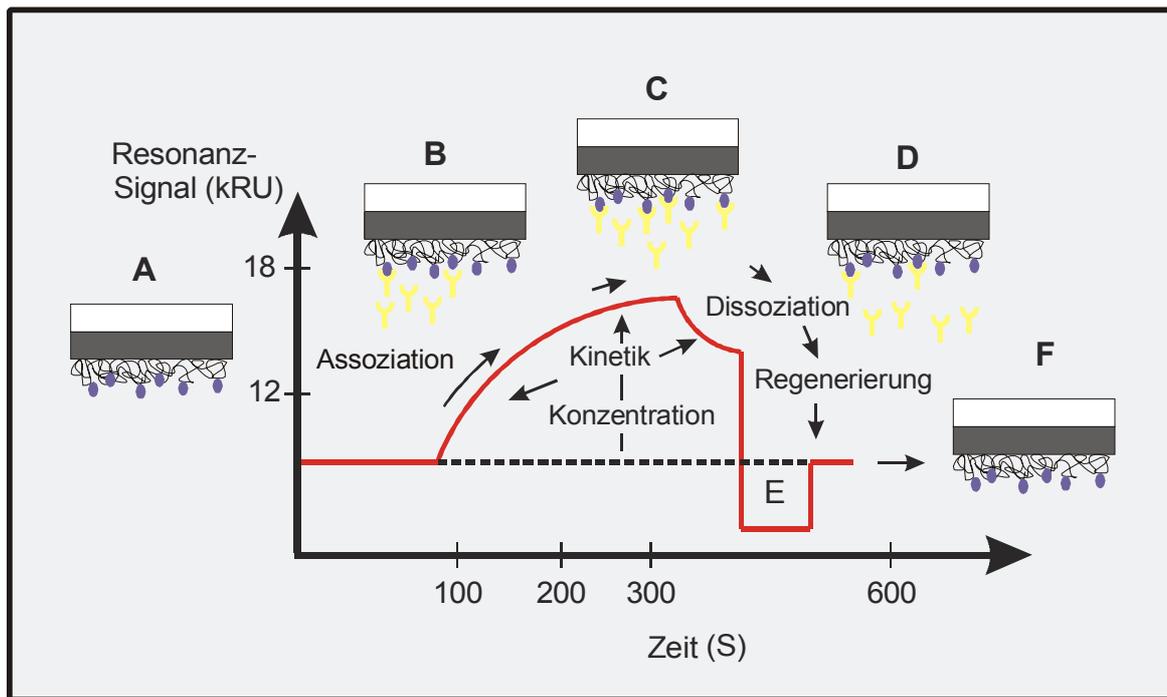


Abb. 17: Schematische Darstellung eines Sensorgramms. Die Kurve spiegelt den Signalverlauf während einer biosensorischen Messung wieder. Dabei wird das Resonanz-Signal (x-Achse) gegen die Zeit (y-Achse) aufgetragen. (A) vor der Injektion, (B) Assoziation während der Injektion (1 kRU entsprechen einer Bindung von 1 ngmm^{-2}), (C) Gleichgewicht, (D) Dissoziation nach Beendigung der Injektion, (E) Regenerierung, (F) Regenerierte Chip-Oberfläche

Die bei einer Messung erhaltenen Sensorgramme lassen sich je nach Qualität des Testaufbaus und der verwendeten Analyten/Liganden qualitativ oder quantitativ auswerten.

5.7.2 Applikationen der Oberflächenplasmonresonanz

Zwei Hauptanwendungsbereiche der Oberflächenplasmonresonanz sind die Detektion und Identifikation von biologischen Analyten und die biophysikalische Analyse von biomolekularen Interaktionen (Homola, 2003). In Tabelle 9 sind einige wichtige Applikationen der SPR zusammengefasst.

Tab. 9: SPR Biosensor Applikationen (Rich & Myszka, 2000)

<i>Qualitative Applikationen</i>	<i>Quantitative Applikationen</i>
Liganden-Fischen	Affinitäten
Verlauf einer Reinigung	Kinetik einer Interaktion
Spezifität von Interaktionen	Stöchiometrie einer Wechselwirkung
<i>Screenen</i> von kleinen Molekülen	Bindungsmechanismen
Epitop- <i>Mapping</i>	Bestimmung von Dissoziations- und Assoziations-Konstanten

Bei allen Anwendungen zeichnen sich Biosensor-Analysen durch einen geringen Materialverbrauch und eine zeitextensive Versuchsdurchführung aus.

5.7.3 Experimente mit K562 Zellen

IMMOBILISIERUNG VON FIBRONECTIN AM CM5 CHIP ÜBER AMINKUPPLUNG

Laufpuffer (HBS-N-Puffer)

0.01 M HEPES (pH 7.4)

0.15 M NaCl

Alle Immobilisierungsschritte finden bei einem Fluss von $5 \mu\text{min}^{-1}$ statt. Zur Aktivierung der Sensorchipoberfläche wird eine Lösung aus 0.05 M NHS (N-Hydroxysuccinimid) und 0.2 M EDC (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid) 7 min über Referenz- und Messzelle des Chips geleitet. Der eigentliche Immobilisierungsschritt findet dann ausschließlich in der Messzelle statt. Dafür wird das in Maleat-Puffer (5 mM, pH 5.0) gelöste humane Plasmafibronectin (Biomol, $20 \mu\text{gml}^{-1}$) 14 min injiziert. Die Desaktivierung über beide Flusszellen der Chipoberfläche erfolgt 14 min mit einer Lösung bestehend aus 1 M Glycin und 1 M NaCl (pH 4.8), gefolgt von einer Lösung aus 1 M Ethanolamin, 1 M NaCl (pH 8.5) für 7 min.

BINDUNGSEXPERIMENTE AM IMMOBILISIERTEN FIBRONECTIN**Lauf- und Bindungspuffer**

0.01 MHEPES (pH 7.4)	
0.15 M	NaCl
2 mM	MnCl ₂
2 mM	MgCL ₂
0.005 % (v/v)	Surfactant P20

Regenerierungslösung

10 mM	Glycin-HCl (pH 3.0)
-------	---------------------

Die K562 Zellen werden 18 h vor ihrer Verwendung mit TPA (effektive Konzentration: 10 nM) versetzt. Dann werden sie aus der Flasche entnommen, zentrifugiert und zweimal mit HBS-N-Puffer gewaschen. Dann werden sie in Bindungspuffer resuspendiert, auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter eingestellt und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wird der β_1 -aktivierende Antikörper TS2/16 ($10 \mu\text{gml}^{-1}$) hinzugefügt und die Zellsuspension wird 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so vorbereitete Zellsuspension wird sofort für die Bindungsexperimente eingesetzt, da die Zellen zur Aggregationsbildung neigen und nur eine begrenzte Lebensdauer haben.

Nach der Immobilisierung wird der Sensorchip und das ganze Gerätesystem gründlich mit Laufpuffer gespült.

Die Zellsuspension wird bei unterschiedlichen Flussraten ($20 \mu\text{lmin}^{-1}$ – $60 \mu\text{lmin}^{-1}$) und in unterschiedlichen Konzentrationen ($1 \cdot 10^6$ – $2.5 \cdot 10^5$) untersucht. Zur Regenerierung wird 2 – 3 mal 5 min Regenerierungspuffer über die Chipoberfläche geleitet.

5.7.4 Experimente mit Membranextrakten aus K562 Zellen

BINDUNGSEXPERIMENTE AM IMMOBILISIERTEN FIBRONECTIN (CM5 CHIP)

Laufpuffer		Bindungspuffer	
20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)	20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM	NaCl	150 mM	NaCl
1 mM	CaCl ₂	1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂	1 mM	MgCl ₂
2 mM	MnCl ₂	2 mM	MnCl ₂
0.125 % (w/v)	Triton X-100	0.125 % (w/v)	Triton X-100
alternativ:		alternativ:	
40 mM	β-OG	40 mM	β-OG
0.005 % (v/v)	Surfactant P20		

Für die Bindungsstudien werden entweder frisch präparierte oder (vorsichtig) auf Eis aufgetaute Membranextrakte verwendet. Sie werden vor der Durchführung der Experimente mit Mn²⁺-Ionen (effektive Konzentration: 2 mM) auf Eis inkubiert.

Da sich die hohe Konzentration an Detergenzien in den Membranextrakten negativ auf die Messungen auswirkt, werden sie so mit Bindungspuffer ohne Detergens verdünnt, dass die Konzentration an Triton X-100 0.125 % (w/v) bzw. die an Octyl-β-D-glucopyranosid 40 mM beträgt.

Zur Aufnahme einer Konzentrationsreihe werden die Membranextrakte mit unterschiedlichen Mengen an Bindungspuffer vermischt und anschließend bei einem Fluss von 20 μlmin⁻¹ injiziert. Die Chipoberfläche lässt sich durch ein bis zwei kurze Injektionspulse mit 25 mM NaOH vollständig regenerieren.

KOMPETITIONSEXPERIMENTE AM IMMOBILISIERTEN FIBRONECTIN (CM5 CHIP)

Die Puffer für die Konkurrenzexperimente entsprechen denen für die Bindungsexperimente. Die Konkurrenzexperimente werden in Lösung durchgeführt, so dass die Komplexbildung zwischen Integrin und Peptid vor der Injektion erfolgen kann.

Die Vorbereitung der Membranextrakte erfolgt analog zu den Bindungsexperimenten. Anschließend werden sie mit den Peptiden (Konzentrationsbereich: (100 μM – 1mM) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Dann werden die Lösungen injiziert und bei einem Fluss von 20 μlmin^{-1} über die Sensorchipoberfläche geleitet. Die Regenerierung der Chipoberfläche erfolgt durch ein bis zwei kurze Injektionspulse mit 25 mM NaOH.

ELUTIONSEXPERIMENTE MIT CYCLISCHEN PEPTIDEN

Bei den kompetitiven Elutionsexperimenten werden die gleichen Puffer, wie bei den Bindungsexperimenten verwendet.

Die Membranextrakte werden analog zu den Bindungsexperimenten vorbereitet und 4 min bei einem Fluss von 20 μlmin^{-1} über die Sensorchipoberfläche geleitet. Unmittelbar im Anschluss werden die unterschiedlichen Peptidlösungen (Konzentrationsbereich: 500 nM – 10 μM) injiziert und 5 min bei einem Fluss von 20 μlmin^{-1} über den am Fibronectin gebundenen Membranextrakt geleitet. Abschließend wurde die Sensorchipoberfläche durch einen kurzen Injektionspuls mit 25 mM NaOH regeneriert.

IMMOBILISIERUNG VON **M220** AM CM5 CHIP

Laufpuffer (HBS-N-Puffer)

0.01 M HEPES (pH 7.4)

0.15 M NaCl

Die einzelnen der Schritte der Immobilisierung von **M220** am CM5 Chip entsprechend denen der Immobilisierung von Fibronectin. Allerdings werden die einzelnen Schritte der Amino-

kupplung zweimal durchgeführt. Hierbei wird zunächst 6-Aminohexansäure (7 μM) an den Chip gekoppelt. Nach der Desaktivierung der Oberfläche mit Ethanolamin wird die Carboxylfunktion der 6-Aminohexansäure mithilfe von EDC/NHS aktiviert und das **M220** (0.7 μM) über den Linker an die Säure gekuppelt. Nach einer weiteren Desaktivierung mit Ethanolamin kann der Chip für Bindungsexperimente genutzt werden.

BINDUNGSEXPERIMENTE AM IMMOBILISIERTEN **M220**

Lauf- und Bindungspuffer

20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM	NaCl
1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂
2 mM	MnCl ₂
0.5 % (w/v)	Triton X-100

Die Durchführung der Bindungsexperimente am immobilisierten **M220** entspricht der am immobilisierten Fibronectin. Der Membranextrakt wird mit 0.01 % (w/v) CM5-Dextran versetzt, um die unspezifische Bindung am CM5-Dextran der Chip-Oberfläche zu minimieren.

KOMPETITIONSEXPERIMENTE MIT DEM PEPTID **P4** AM IMMOBILISIERTEN **M220**

Lauf- und Bindungspuffer

20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM	NaCl
1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂
2 mM	MnCl ₂
0.25 % (w/v)	Triton X-100

Die Durchführung der Konkurrenzexperimente gleicht denen am immobilisierten Fibronectin. Die Zugabe von 0.01 % (w/v) CM5-Dextran zum Membranextrakt dient der Reduzierung der unspezifischen Bindung am CM5-Dextran der Chip-Oberfläche.

5.7.5 Auswertung der Experimente

Für die Auswertung der Messergebnisse wird das Programm *BIAevaluation 3.0* von Biacore verwendet. Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse dient Programm *GraphPad PRISM 4.0* (GraphPad Software Inc.).

5.8 Mikrotiterplatten-basierter Integrin-Bindungstest

Mikrotiterplatten-basierte Integrin-Bindungstests werden häufig für die Untersuchung von Integrin-Ligand-Interaktionen eingesetzt. Ihr Aufbau ähnelt dem eines *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA), wobei der primäre Antikörper durch den markierten Liganden ersetzt wird. Für die Detektion des Liganden dienen Reagenzien, die entsprechend der Markierung ausgewählt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Verwendung eines biotinylierten Liganden, der durch ein Streptavidin-HRP-Konjugat erkannt und durch den Substratumsatz der HRP visualisiert wird.

5.8.1 Biotinylierung des Fibronectins

Zur Biotinylierung des Fibronectins wurde das *EZ-Link™ Sulfo-NHS Biotinylation Kit* von PERBIO Science verwendet. 500 µl einer Fibronectinlösung (1 mgml⁻¹) werden mit 10 µl einer Sulfo-NHS-Biotin-Lösung (2 mgml⁻¹) versetzt und zwei Stunden bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wird die Lösung auf die D-Salt™ Dextran Desalting Column aufgetragen und einer Säulenchromatografie mit 25 ml PBS unterzogen. Die aufgefangenen Fraktionen werden mittels Ultrafiltration (Microcon YM-50 mit 50 kD Ausschlussvolumen) so eingengt,

dass die Fibronectinkonzentration $100 \mu\text{gml}^{-1}$ beträgt. Die Fibronectinlösung wird bei 4°C gelagert.

5.8.2 Mikrotiterplatten-basierter Bindungstest für das $\alpha_5\beta_1$ Integrin

Bindungspuffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂
2 mM	MnCl ₂
2 mM	β -OG

Waschpuffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂
2 mM	MnCl ₂
2 mM	β -OG
0.05 % (w/v)	Tween 20

Blockierungspuffer

20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂
2 mM	MnCl ₂
2 mM	β -OG
0.5 % (w/v)	BSA

Zunächst wird die Oberfläche einer Mikrotiterplatte (MaxisorpTM, Nunc) mit dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin beschichtet. Dazu werden jeweils $120 \mu\text{l}$ der Integrinlösung ($0.5 \mu\text{gml}^{-1}$) in die Vertiefungen der Platte gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wird die Integrinlösung entfernt und die Platte dreimal 10 min mit Blockierungspuffer gewaschen. Dann werden in jede Vertiefung $50 \mu\text{l}$ Peptidlösung (Konzentrationsbereich: $200 \mu\text{gml}^{-1} - 2 \text{ngml}^{-1}$) gegeben. Anschließend werden jeder Vertiefung $50 \mu\text{l}$ einer Lösung des biotinylierten Fibronectins in Bindungspuffer hinzugefügt. Nach der Inkubation der Mikrotiterplatte über Nacht bei Raumtemperatur, werden die Fibronectin-Peptid-Lösungen aus den Vertiefungen entfernt und die Platte dreimal 5 min mit Waschpuffer und dreimal 5 min mit Blockierungspuffer gewaschen. Dann wurden in jede Vertiefung $100 \mu\text{l}$ einer HRP-Streptavidin-Lösung gegeben (10ngml^{-1}) und die Platte 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernen der Lösung wird die Platte dreimal 5 min mit Waschpuffer gewa-

schen. Zur Visualisierung der Ergebnisse wird die Platte mit TMB-Substratlösung versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbentwicklung wird durch die Zugabe einer TMB Stop Solution beendet. Die Absorption der Lösung wird bei 450 nm mithilfe eines Spektrometers (Tecan) vermessen.

Bei der Testauswertung wird wie bei der Auswertung des Zelladhäsionstests vorgegangen.

6 Resultate und Diskussion

6.1 Durchflusszytometrie

Auf Basis der Durchflusszytometrie sollten Testsysteme in Form von Kompetitionsassays etabliert werden, welche es ermöglichen neu synthetisierte Peptide hinsichtlich ihrer Affinität zu verschiedenen Integrinen zu untersuchen.

6.1.1 Charakterisierung der M21 Zellen

Die hier präsentierten Studien konzentrierten sich zunächst auf die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$. Beide Integrine spielen bei der Metastasenbildung eine wesentliche Rolle. Für die Tests wurde die humane Melanomzelllinie M21 (Spiro, 1987) ausgewählt, welche die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ exprimiert (Mitjans *et al.*, 1995). Diese Zelllinie wurde ursprünglich von Dr. D. L. Morton (John Wayne Cancer Institute, Santa Monica, USA) zur Verfügung gestellt und bereits in einer früheren Arbeit (Müller, 1999) verwendet. Dabei hatte sich gezeigt, dass die Zellen keine Integrine mehr exprimierten, was sich unter anderem auf eine mögliche Fehllagerung während des Transports zurückführen ließ.

Diese Zellen sollten durch andere Kultivierungsbedingungen erneut zur Expression angeregt und mithilfe der Durchflusszytometrie charakterisiert werden. Das Kulturmedium wurde von Dulbecco's MEM Medium mit Glutamax I, Natriumpyruvat und fötalem Kälberserum auf RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin und fötalem Kälberserum umgestellt. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz kultiviert, geernet und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit den empfohlenen Mengen an den mit Fluoresceinisothiocyanat konjugierten Antikörpern LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) und P1F6 (anti- $\alpha_v\beta_5$) versetzt. Einige Proben wurden ohne Antikörper belassen oder mit einer Isotypkontrolle versetzt, um bei der späteren Messung die unspezifische Fluoreszenz ermitteln zu können. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die überschüssigen Antikörper ausgewaschen und die Zellen mittels Durchflusszytometrie vermessen. Bei der Analyse wurden jeweils 10000 Zellen gezählt, von

denen sich 7000 im ausgewählten Bereich (*Gate*) befanden. Um bei der Auswertung ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurde das *Gate* so gewählt, dass es nur die vitalen Zellen enthielt.

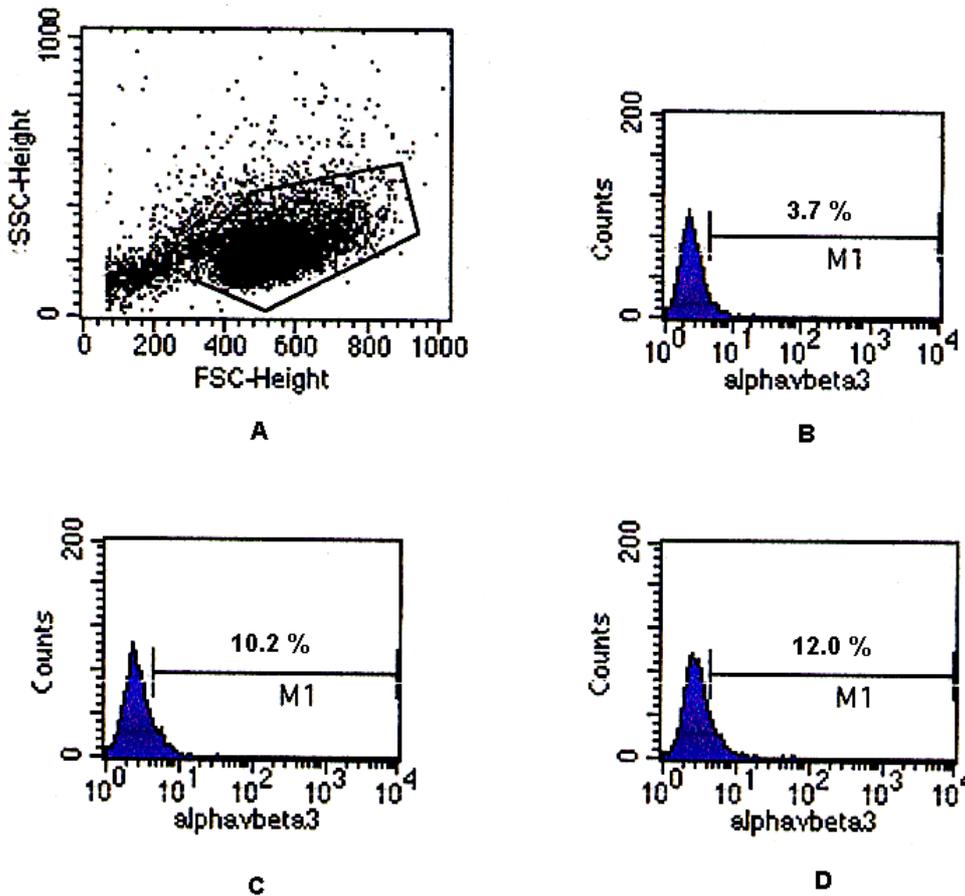


Abb. 18: Ergebnisse der $\alpha_v\beta_3$ -Analyse. Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse der M21-Charakterisierung. (A) *Dotplot* mit *Gate*, (B) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe ohne Antikörper, (C) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit Isotypkontrolle, (D) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit dem Antikörper LM 609.

Bei einer Expression der Integrine würde eine Interaktion zwischen den Integrinen und den FITC-markierten Antikörpern auftreten, und die Fluoreszenz der Probe würde steigen, was mit einer Erhöhung des prozentualen Anteils der Zellen in der Marker-Region einherginge.

Bei der Messung konnte weder bei der $\alpha_v\beta_3$ - noch bei der $\alpha_v\beta_5$ -Analyse eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse für die $\alpha_v\beta_3$ -Analyse zusammengefasst: die Proben mit den entsprechenden Antikörpern (D) wiesen

die gleiche Fluoreszenz wie die Proben mit Isotypkontrolle (C) und die Proben ohne Antikörper (B) auf. Vergleichbare Resultate wurden bei der $\alpha_v\beta_5$ -Analyse erzielt.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die M21 Zellen weder das $\alpha_v\beta_3$ noch das $\alpha_v\beta_5$ Integrin exprimieren und somit für die Etablierung eines entsprechenden Testsystems ungeeignet sind.

6.1.2 K562 Zellen: Überprüfung der Integrinexpression und der Integrinaktivität

Der Wildtyp der Zelllinie K562 (Lozzio & Lozzio, 1975) wird häufig zur Untersuchung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins verwendet, weil diese Zellen überwiegend das Integrin $\alpha_5\beta_1$ exprimieren (Barry *et al.*, 2000). Allerdings weisen diese Zellen differenzielle Aktivitätszustände des $\alpha_5\beta_1$ Integrins auf, sodass als Erstes eine Aktivitätsstudie bezüglich des exprimierten $\alpha_5\beta_1$ Integrins durchgeführt werden musste.

Dazu wurde der mit Fluoresceinisothiocyanat konjugierte Antikörper 3S3 verwendet, der gegen die β_1 -Untereinheit des Integrin gerichtet ist. Die Zellen wurden geerntet, aufgearbeitet und 1 h mit der entsprechenden Menge an Antikörper bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Entfernen des überschüssigen Antikörpers wurden die Proben mit FACS vermessen. Als Referenzen für die Messung dienten Proben ohne Antikörper und Proben mit Isotypkontrolle.

Erste Experimente zeigten, dass die Zellen das Integrin in einem schwach aktiven Zustand exprimieren, sodass in weiterführenden Experimenten Reagenzien zur Aktivitätssteigerung gefunden werden mussten. Dabei kamen Manganionen, 1,4-Dithioerythrit (DTE) und der Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA) in verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz. Darüber hinaus wurde bei den einzelnen Reagenzien die Inkubationszeit variiert.

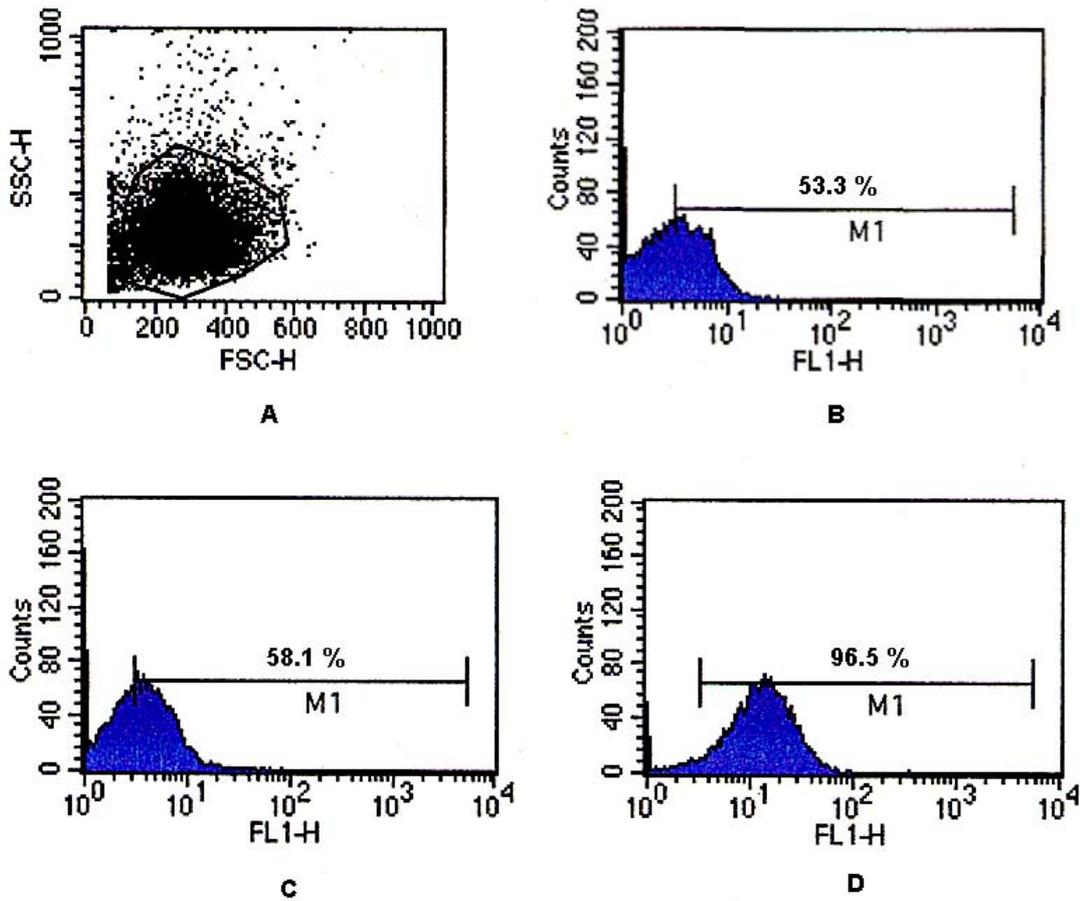


Abb. 19: Resultate der Experimente zur Expression und Aktivität des Integrins $\alpha_5\beta_1$.

Die Abbildung zeigt einen Teil der Ergebnisse zur Expressions- und Aktivitätsanalyse des von den K562 Zellen exprimierten Integrins $\alpha_5\beta_1$. (A) *Dotplot* mit *Gate*, (B) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe ohne Antikörper, (C) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit Isotypkontrolle, (D) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit dem Antikörper 3S3, wobei das Integrin mit TPA und Manganionen aktiviert worden ist.

Die Ergebnisse zeigten, dass die alleinige Aktivierung mit Manganionen nur zu einer geringen Aktivitätssteigerung des Integrins führte, wobei sich eine Konzentration von 2 mM als optimal erwies. TPA vermochte bei einer Inkubationszeit von 18 h die Aktivität drastisch zu erhöhen. Zwischen den TPA-Konzentrationen 6 ngml⁻¹ und 10 ngml⁻¹ konnte kein Unterschied beobachtet werden. Im Fall von DTE, das als Ersatz für DTT verwendet wurde, konnte keine Aktivitätssteigerung beobachtet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Manganionen (2 mM) führen zu einer geringen und TPA (6 ngml⁻¹) zu einer starken Aktivierung des Integrins $\alpha_5\beta_1$. Diese Unterschiede in der Effektivität der beiden Reagenzien sind vermutlich auf die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der beiden Substanzen zurückzuführen. Denn während die Manganionen lediglich eine Konformationsänderung im extrazellulären Bereich des Integrins bewirken, greift das TPA in intrazelluläre Prozesse ein (Gimond & Sonnenberg, 1997). DTE scheint für die Integrinaktivierung nicht geeignet zu sein, womit die Ergebnisse von Davis & Camarillo (1993) nicht bestätigt werden konnten.

Summa summarum erwies sich eine Kombination aus TPA und Manganionen zur Aktivierung des von den K562 Zellen exprimierten $\alpha_5\beta_1$ Integrins als günstig.

6.1.3 Kompetitionsassay zur Untersuchung des Inhibierungspotenzials cyclischer RGD-Peptide

Nachdem durch die in 6.1.2 beschriebenen Experimente die Expression und die Aktivität des Integrins $\alpha_5\beta_1$ untersucht und optimiert worden ist, sollte, basierend auf diesen Ergebnissen, ein Testsystem zur Untersuchung von Peptiden aufgebaut werden. Ein an beide Untereinheiten bindender, funktionsblockierender Antikörper stand für diese Experimente nicht zur Verfügung. Da aber für die Ligandenbindung der Integrine beide Untereinheiten essenziell sind, konnte der gegen die β_1 -Untereinheit gerichtete Antikörper 3S3 verwendet werden. Dieser Antikörper sollte laut Herstellerangaben die Funktion des $\alpha_5\beta_1$ Integrins blockieren. Allerdings lagen keine Informationen des Herstellers hinsichtlich des Bindungsepitops vor.

Bei der Durchführung des Tests wurden die Ergebnisse der Experimente zur Optimierung des Aktivitätszustands bei $\alpha_5\beta_1$ aufgegriffen und die K562 Zellen entsprechend mit TPA und Manganionen vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit den Peptidlösungen in einem Konzentrationsbereich von 1.5 μ M bis 150 μ M versetzt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde der Antikörper 3S3 hinzugefügt und die Proben für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für spätere Referenzmessungen wurden Proben mit Isotypkontrolle versetzt oder ohne Antikörper belassen. Nach der Inkubation wurde der nicht

gebundene Antikörper durch Waschen mit Puffer entfernt und die Proben mithilfe eines FACS vermessen.

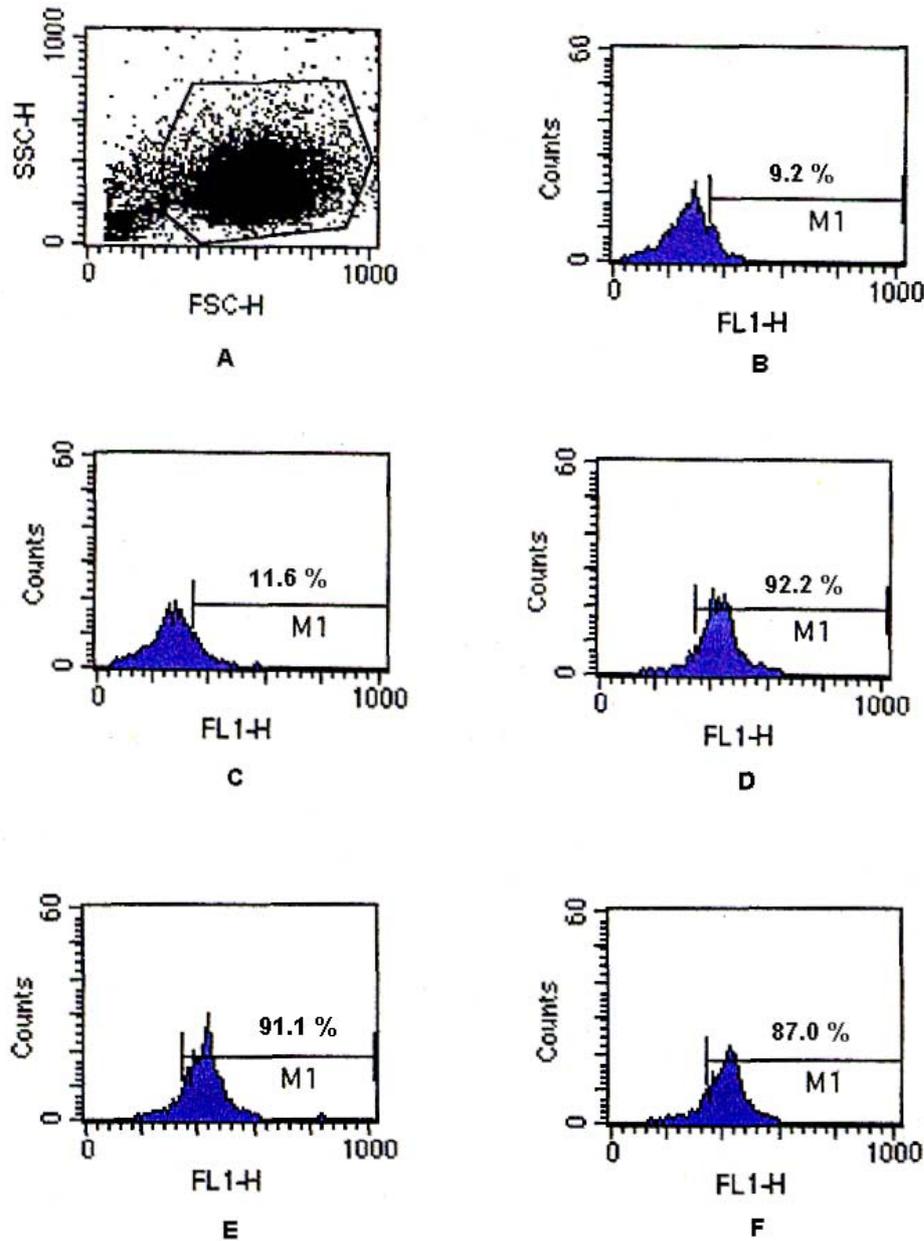


Abb. 20: Ergebnisse der Konkurrenzexperimente mit cyclischen Peptiden. In dieser Abbildung ist eine Auswahl der Ergebnisse des Wettbewerbsassays mit K562 Zellen und cyclischen Peptiden dargestellt. (A) *Dotplot* mit *Gate*, (B) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe ohne Antikörper, (C) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit Isotypkontrolle, (D) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit dem Antikörper 3S3, (E) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit dem Peptid **P4** (150 μ M) und dem Antikörper 3S3, (F) Fluoreszenz-Histogramm einer Probe mit dem Peptid **P1** (150 μ M) und dem Antikörper 3S3.

Nach Auswertung der Messergebnisse zeigte sich, dass keines der verwendeten Peptide (**P1**, **P4**, **P9**, **P10**, **P14**) die Integrin-Antikörper-Wechselwirkung signifikant beeinflussen konnte.

In Abbildung 20 sind verschiedenen Fluoreszenz-Histogramme dargestellt. Dabei zeigen die Histogramme (B) (Probe ohne Antikörper), (C) (Probe mit Isotypkontrolle) und (D) (Probe mit Antikörper) deutlich die Expression des Integrins $\alpha_5\beta_1$. Im Falle eines inhibitorischen Effektes der Peptide müsste die Fluoreszenz der Probe abnehmen, da weniger Antikörper an das Integrin bindet. Folglich würde der prozentuale Anteil der Zellen in der Marker-Region sinken. Die Fluoreszenz-Histogramme für die mit den Peptiden **P1** (F) und **P4** (E) versetzten Proben zeigen keine signifikante Abnahme der Fluoreszenz. Analoge Ergebnisse wurden für die Peptide **P9**, **P10** und **P14** in verschiedenen Konzentrationen erzielt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Resultate der durchgeführten Konkurrenzexperimente deuten darauf hin, dass der verwendete Antikörper 3S3 nicht zur Untersuchung des inhibitorischen Potenzials cyclischer RGD-Peptide geeignet ist. Vermutlich ist das Bindungsepitop dieses Antikörpers nicht mit dem der RGD-Peptide und damit nicht mit dem des natürlichen Liganden Fibronectin identisch. Eine Inaktivität aller Peptide kann als Ursache für die Testergebnisse ausgeschlossen werden, da das literaturbekannte Referenzpeptid **P1** (Pfaff *et al.*, 1994) ebenfalls keine inhibitorischen Eigenschaften in diesem Test aufwies. Pfaff *et al.* hatten für dieses Peptid in einem mikrotiterplatten-basierten $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Bindungstest einen IC_{50} -Wert von 6 μ M bestimmt und damit gezeigt, dass es sich bei **P1** um einen effektiven $\alpha_5\beta_1$ -Antagonisten handelt (Pfaff *et al.*, 1994).

Als Konsequenz dieserer Resultate sollte auf andere, Antikörper-unabhängige Testsysteme zurückgegriffen werden, um die inhibitorischen Eigenschaften cyclischer RGD-Peptide zu evaluieren.

6.2 Zelladhäsionstest

Der erste Zelladhäsionstest wurde 1985 von Koda *et al.* beschrieben (Koda *et al.*, 1985). Bei diesem Testsystem werden die Zellen in eine mit Protein beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und inkubiert. Anschließend werden die nichtadhärenten Zellen durch Waschen entfernt. Die adhären Zellen werden fixiert, gefärbt und quantifiziert.

Dieses Testsystem wird häufig zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt, wobei die Verwendung von vitalen Zellen und nativen Proteinen experimentelle Bedingungen schafft, die denen in *in vivo* Systemen ähneln.

6.2.1 Vorexperimente

In den Vorexperimenten wurden sowohl die verwendeten Materialien überprüft als auch die einzelnen Testschritte optimiert.

In ersten Studien sollten Mikrotiterplatten gefunden werden, die eine gleichmäßige und nachhaltige Beschichtung mit Fibronectin erlaubten. Dabei wurden sowohl unmodifizierte Polystyrol-Mikrotiterplatten (MicroWell™, Nunc), als auch modifizierte Platten mit Affinität zu Substanzen mit polaren/unpolaren Bereichen (Maxisorp™, Nunc) und mit Affinität zu unpolaren Substanzen (Polysorp™, Nunc) getestet. Parallel dazu sollten die optimalen Beschichtungsbedingungen (Konzentration, Zeit, Temperatur, Luftfeuchtigkeit) für Fibronectin ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Maxisorp™-Platten am gleichmäßigsten und intensivsten mit Fibronectin beschichten ließen, während bei den unmodifizierten Polystyrolplatten keine Beschichtung möglich war. Dabei erwies sich eine Fibronectin-Konzentration von 20 µgml⁻¹ und eine Beschichtung über Nacht bei 37 °C und erhöhter Luftfeuchtigkeit als günstig.

Des Weiteren wurden verschiedene Chargen an humanem Plasmafibronectin hinsichtlich ihrer Eignung für den Test untersucht.

Tab. 10: Untersuchte Chargen an humanem Plasmafibronectin

Name	Substanz-Nr.	Firma
Human Plasma Fibronectin	33016-015	Gibco
Fibronectin (Human)	51750	Biomol
Fibronectin from human Plasma	F 2006	Sigma
Fibronectin, Human Plasma	151126	ICN

Dabei stellte sich heraus, dass Fibronectin-Chargen von Gibco und Biomol gut für diesen Test geeignet sind. Sie zeichnen sich durch eine schnelle und vollständige Rekonstitution mit Was-

ser aus und ermöglichen eine homogene Beschichtung der Platten. Eine vollständige Rekonstitution des Fibronectins der anderen Chargen war schwierig, sodass sich Substanzverluste nicht ausschließen lassen. Darüber hinaus wies das Fibronectin von ICN im Test eine geringere Aktivität auf.

In weiteren vorbereitenden Studien wurde die Blockierung der unbesetzten Stellen auf der Mikrotiterplatte, sowie die Fixier- und Färbelösungen optimiert. Die Blockierung mit 1 %iger (w/v) Rinderserumalbuminlösung in Wasser für mindestens zwei Stunden bei 37 °C erwies sich als gut geeignet. Bei kürzeren Zeiten trat eine erhöhte unspezifische Bindung der Zellen an die Plattenoberfläche auf.

Zur Fixierung der Zellen wurden eine 1 %ige Paraformaldehydlösung in PBS, eine 5 %ige (v/v) Glutaraldehydlösung in *Aqua dest.* und eine Lösung bestehend aus 2 % (w/v) Saccharose und 3 % (v/v) Formaldehyd in *Aqua dest.* verwendet. Im Test zeigten alle Lösungen eine gute Fixierung der Zellen, sodass für weitere Tests die 5 %ige Glutaraldehydlösung verwendet wurde. Diese Lösung hat einen geringen Präparationsaufwand und ist weniger gesundheitsschädlich als Paraformaldehyd und Formaldehyd.

Für die Färbung von Zellen stehen zahlreiche Farbstoffe zur Verfügung. In diesem Fall wurden eine 0.5 %ige (w/v) Bromphenolblaulösung in *Aqua dest.*, eine 0.1 %ige (w/v) Kristallviolettlösung in MES (200 mM, pH 6.0) und eine Lösung bestehend aus 0.2 % (w/v) Kristallviolett und 10 % (v/v) Formaldehyd in *Aqua dest.* ausgewählt und hinsichtlich ihrer Effizienz getestet. Dabei zeigte die 0.1 %ige (w/v) Kristallviolettlösung in MES das beste Färbeverhalten.

6.2.2 Aktivitätsstudien zum Integrin $\alpha_5\beta_1$

Integrine werden von Zellen in unterschiedlichen Aktivitätszuständen präsentiert. Das von der Zelllinie K 562 exprimierte Integrin $\alpha_5\beta_1$ befindet sich normalerweise in einem Zustand geringer Aktivität (Barry *et al.*, 2000). Demzufolge ist es vor der Durchführung von Bindungsstudien notwendig, das Integrin in einen aktiveren Zustand zu überführen.

Dafür stehen verschiedene Reagenzien wie z. B. Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA) zur Verfügung, deren Effektivität in einem Zelladhäsionstest (5.3) überprüft wurde. Magnesium- und Manganionen wurden nach der Aufarbeitung jeder Zellprobe (30 min auf Eis) zugesetzt, da sowohl aus vorausgegangenen Experimenten, als auch aus der Literatur bekannt war, dass

diese Ionen die Aktivität des $\alpha_5\beta_1$ Integrins steigern (Mould et al., 1995a).

Zur Durchführung des Tests wurden die, mit den unterschiedlichen Reagenzien behandelten Zellen, auf eine mit Fibronectin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden die adhärenen Zellen 20 min mit 5 %iger Glutaraldehydlösung fixiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit *Aqua dest.* gewaschen und 1 h mit einer 0.1 %igen Kristallviolettlösung gefärbt. Im Anschluss wurde die überschüssige Färbelösung entfernt und die Färbung mit einer ethanolschen Zitronensäurelösung aus den Zellen herausgelöst. Die Absorption der Lösung wurde mit einem Spektrometer bei 560 nm gemessen.

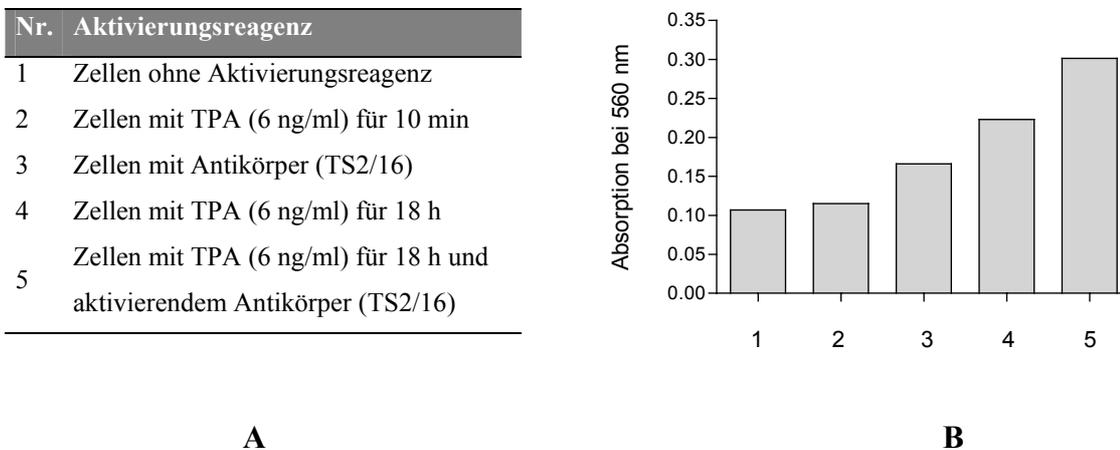


Abb. 21: Ergebnis der Aktivitätsstudien. (A) Tabelle mit den eingesetzten Aktivierungsreagenzien, (B) Säulendiagramm, das die Absorption der gefärbten Zellen nach Einwirkung der einzelnen Aktivierungsreagenzien wiedergibt. Je höher die Absorption ist, um so höher ist die Anzahl der adhärenen Zellen.

Die Ergebnisse des Zelladhäsionstests zeigen, dass das Integrin $\alpha_5\beta_1$ durch eine 18-stündige Behandlung mit TPA, gefolgt von einer 10-minütigen Behandlung mit dem β_1 -aktivierenden Antikörper TS2/16 am stärksten aktiviert wurde. Beide Reagenzien scheinen sich optimal zu ergänzen. Wenig effektiv scheint hingegen die 10-minütige Inkubation mit TPA allein. Eine mögliche Erklärung für diese Resultate scheinen die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der Reagenzien zu sein. Der Antikörper TS2/16 senkt die Notwendigkeit der normalerweise für die Bindung essenziellen *Synergy site* des Fibronectins. Damit wird die Wechselwirkung zwischen dem Integrin und dem Fibronectin ohne den Ablauf von indirekten, intrazellulären Prozessen begünstigt (Danen et al., 1995). Im Fall der Phorbolester wird davon ausgegangen, dass sie die integrinvermittelte Zelladhäsion über zwei Wege verstärken. Einerseits verbessern sie durch Konformationsänderungen in den extrazellulären Bereichen

der Integrine deren Ligandenaffinität und andererseits steigern sie die Avidität der Integrine durch Induzierung des Integrin-Clusterings (Gimond & Sonnenberg, 1997). Da beide Wege über eine *Inside-out* Signalübertragung ablaufen, sind intrazelluläre Prozesse notwendig, für die vermutlich eine Zeitspanne von 10 min nicht ausreicht.

6.2.3 Zelladhäsionstest zur Untersuchung der inhibierenden Eigenschaften von Peptiden

Unter Berücksichtigung der in den Kapiteln 6.2.1 und 6.2.2 erzielten Ergebnisse wurde der Einfluss cyclischer RGD-Peptide auf die Wechselwirkung zwischen dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ und Fibronectin untersucht. Dafür wurde das Fibronectin, ein natürlicher Ligand des $\alpha_5\beta_1$ Integrins, auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Das Integrin $\alpha_5\beta_1$ wurde von Wildtyp K562 Zellen exprimiert.

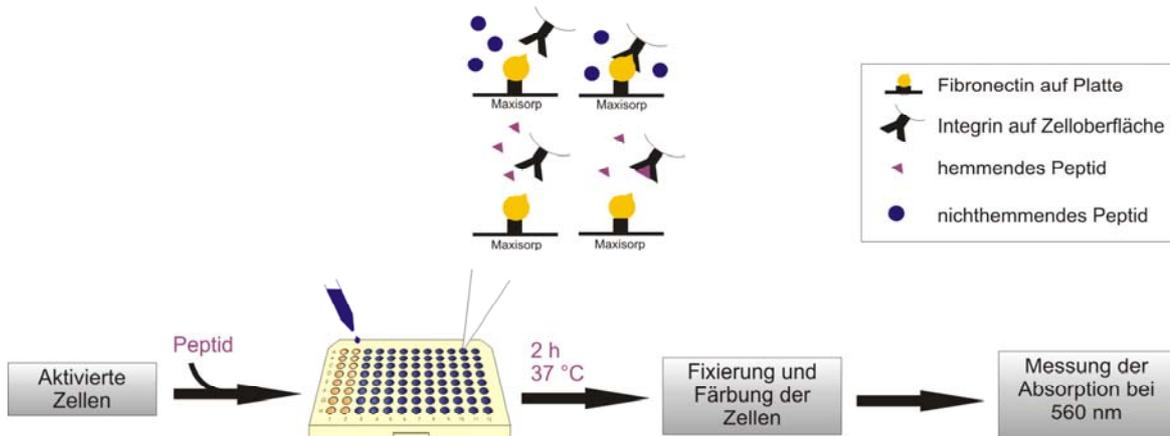


Abb. 22: Schematischer Aufbau des Zelladhäsionstests. Eine Mikrotiterplatte wird mit humanem Plasmafibronektin beschichtet. Die K562 Zellen werden mit den Peptiden inkubiert und anschließend in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h werden die adhären Zellen fixiert, gefärbt und vermessen.

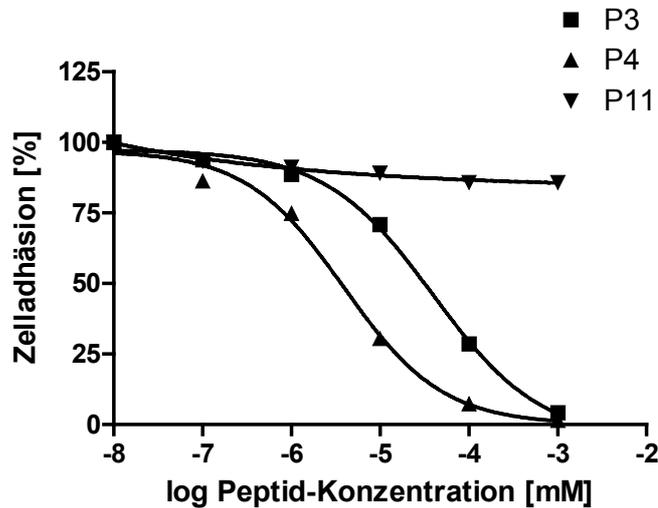
Alle bei diesem Test verwendeten Peptide wurden vor dem Assay durch MALDI-ToF MS und HPLC analysiert, um eventuelle Qualitätsverluste während der Lagerung auszuschließen.

Zur Evaluierung der inhibitorischen Eigenschaften der cyclischen RGD-Peptide wurden Peptidkonzentrationen von 0.7 ngml^{-1} – $70 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ eingesetzt. Die entsprechenden Peptidlösungen wurden durch eine Reihenverdünnung der Stammlösungen hergestellt. Die einzelnen Peptidlösungen wurden zu den aktivierten Zellproben gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben auf die mit Fibronectin beschichtete Platte pipettiert und für 2 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die adhärenen Zellen wurden analog zu 6.2.2 mit einer Glutaraldehydlösung fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und vermessen.

Um die Reproduzierbarkeit des Tests zu gewährleisten, bestand jeder Test aus einer Dreifachbestimmung und wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die berechneten Standardabweichungen liegen in dem für Zelladhäsionstests zu erwartenden Bereich von 1 % bis 16 %.

Peptid	IC ₅₀ [μM]
P1	279
P3	3
P4	2
P5	1
P6	> 10 ³
P9	> 10 ³
P10	> 10 ³
P11	> 10 ³
P14	> 10 ³
M154	> 10 ³
M215	1

B



A

Abb. 23: Ergebnisse der Zelladhäsionstests mit K562 Zellen.

(A) IC₅₀-Werte verschiedener $\alpha_5\beta_1$ -Antagonisten im Zelladhäsionstest. Diese Werte sind ein Maß für die inhibitorischen Eigenschaften der untersuchten Peptide. (B) Dosis-Antwortkurven für die Peptide **P3**, **P4**, und **P11**. Die Zelladhäsion wurde gegen den Logarithmus der Peptidkonzentrationen aufgetragen. An die so erhaltenen Kurven konnten mithilfe einer nichtlinearen Regression theoretische Kurven angepasst und aus den berechneten Gleichungen die IC₅₀-Werte bestimmt werden.

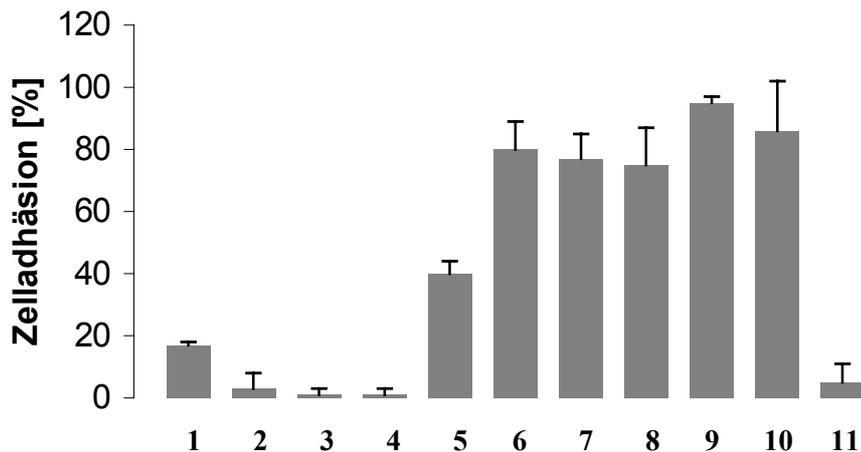


Abb. 24: Adhäsion der K562 Zellen bei einer Peptidkonzentration von $70 \mu\text{gml}^{-1}$. Das Säulendiagramm spiegelt die Adhäsion der K562 Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Peptiden auf einer mit Fibronectin beschichteten Mikrotiterplatte wieder. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (1) **P1**, (2) **P3**, (3) **P4**, (4) **P5**, (5) **P6**, (6) **P9**, (7) **P10**, (8) **P11**, (9) **P14**, (10) **M154**, (11) **M215**.

Das cyclische Hexapeptid **P4**, sowie die cyclischen Pentapeptide **P3** und **P5** zeigten die höchste biologische Aktivität in diesem Test. Sie inhibierten bei einer Peptidkonzentration von $70 \mu\text{gml}^{-1}$ nahezu vollständig die Adhäsion der K562 Zellen auf einer mit Fibronectin beschichteten Mikrotiterplatte. Die IC_{50} -Werte dieser Peptide sind vergleichbar mit dem des Referenzpeptids **M215**. Dieses Peptid basiert auf der Sequenz [-c-(Cys^[S-S]-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys^[S-S])-], welche das Kernstück $\alpha_5\beta_1$ selektiver Antagonisten darstellt. Diese Peptide enthalten keine RGD-Sequenz und wurden 1994 von Koivunen *et al.* mithilfe einer CX₇C Phagen-Bibliothek identifiziert (Koivunen *et al.*, 1994).

Die inhibitorische Aktivität des Peptids **P1**, bekannt als effektiver $\alpha_v\beta_3$ Antagonist, war um den Faktor 100 kleiner (Haubner *et al.*, 1994; Pfaff *et al.*, 1994). Beim Vergleich der beiden Pentapeptide **P1** und **P5** wird deutlich, dass durch den Ersatz von D-Phenylalanin durch D- β -Phenylalanin eine um den Faktor 100 erhöhte Aktivität erzielt werden kann. Ähnliche Effekte wurden in früheren Studien für das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ beobachtet (Müller, 1999; Schumann *et al.*, 2000). Arbeiten von Schumann *et al.* haben gezeigt, dass β -Aminosäuren den Einfluss der D-Aminosäuren auf die Sekundärstruktur vermindern und zur Ausbildung einer neuen Turnstruktur führen (Schumann, 1999; Schumann *et al.*, 2000). Dabei nehmen β -Aminosäuren bevorzugt die $i+1$ -Position in pseudo- γ -Turnanordnungen ein (Schumann, 1999). Die daraus resultierende Konformationsänderung ist eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu **P1** höhere Aktivität von **P5**.

Im Fall der Peptide **P6** und **P9** scheint der Einbau der β -Aminosäure D- β -Phenylalanin einen geringeren Einfluss auf die Aktivität haben. Zwar inhibiert das β -Aminosäure enthaltende Peptid **P6** bei einer Konzentration von $70 \mu\text{gml}^{-1}$ die Zelladhäsion zu 60 %, während das Peptid **P9** keine Inhibition zeigt. Dennoch spiegelt sich dieser geringe Unterschied nicht in den IC_{50} -Werten der beiden Peptide wider.

Keine biologische Aktivität zeigen die Peptide **P9**, **P10**, **P11**, **P14** und **M154**; wahrscheinlich wird die RGD-Sequenz in diesen Fällen nicht in der für die Bindung an das $\alpha_5\beta_1$ Integrin günstigen Konformation präsentiert.

Beim Vergleich der literaturbekannten Peptide **P1** ($\alpha_v\beta_3$ -selektiv) und **P9** ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -selektiv) wird der konformelle Unterschied zwischen Cyclopentapeptiden und Cyclohexapeptiden deutlich (Aumailley *et al.*, 1991; Gurrath *et al.*, 1992; Pfaff *et al.*, 1994; Haubner *et al.*, 1997).

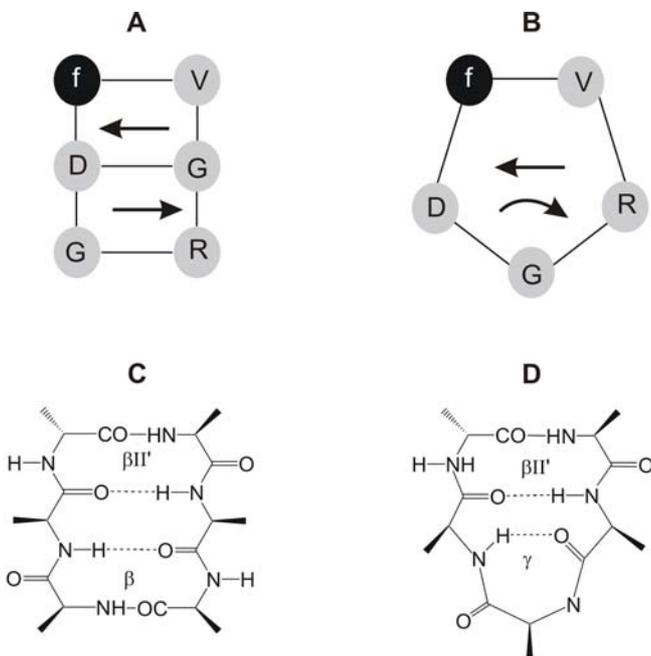


Abb. 26: Schematische Darstellung cyclischer Hexa- und Pentapeptide.

(A) und (C) zeigen P9 in schematischer Darstellung mit Turnstruktur.

(B) und (D) zeigen P1 in schematischer Darstellung mit Turnstruktur.

(Alle Abbildungen nach Gurrath *et al.* 1992)

Während Cyclohexapeptide als Strukturmerkmale zwei β -Turns aufweisen, enthalten Cyclopentapeptide einen β -Turn und einen γ -Turn. Im **P9** besetzt die RGD-Sequenz die Positionen $i+1$ bis $i+3$ eines β -Turns. Im Peptid **P1** ist die RGD-Sequenz um einen γ -Turn in den Positionen $i+1$ bis $i+3$ arrangiert. Die unterschiedliche Repräsentation der RGD-Sequenz in den beiden Peptiden ist der Grund für die in dieser Arbeit und für die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ beobachteten Aktivitäts- und Selektivitätsunterschiede. Ähnliches lässt sich für die Peptide **P3** und **P10** beobachten.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, einen Zelladhäsionstest zu etablieren, der das schnelle *Screening* von Peptidbibliotheken ermöglicht. Die Grundlage dieses Tests bilden gängige Protokolle wie das von Mould *et al.* (1995a), welche aber an das vorliegende System angepasst und entsprechend optimiert werden mussten. Der auf diese Weise entstandene Test bietet die Möglichkeit, Peptide schnell und zuverlässig hinsichtlich ihres Einflusses auf die Integrin-Fibronectin-Wechselwirkung zu untersuchen. Er hat den Vorteil, dass er als *in vivo* Test mit lebenden Zellen durchgeführt wird und somit die aufwendige Aufreinigung des Integrins vermieden wird. Andererseits birgt die Verwendung von lebenden Zellen eine gewisse Ungenauigkeit, da die Proteinexpression der Zellen nicht immer konstant ist. Das führt dazu, dass mit diesem Test lediglich halb quantitative Aussagen getroffen werden können, die durch genauere Tests ergänzt werden müssen. Dennoch ist der Zelladhäsionstest als schneller Vor-test auf dem Gebiet der Integrin-Protein-Interaktionen unter Berücksichtigung seiner Effizienz unersetzlich.

6.3 Die Anreicherung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, detailliertere Informationen über das System Integrin $\alpha_5\beta_1$ -Fibronectin zu erhalten. Dafür ist es notwendig, das Integrin anzureichern. Verschiedene Methoden zur Primäraufarbeitung der K562 Zellen wurden durchgeführt und verglichen.

6.3.1 Verfahren zur Herstellung integrinhaltiger Membranextrakte

Für die Aufreinigung von Proteinen stehen zahlreiche Protokolle zur Verfügung, die sich nicht nur in den verwendeten Puffern, sondern auch in einzelnen Durchführungsschritten unterscheiden.

Als Erstes wurde ein Standardverfahren (Bollag *et al.*, 1996) zur Aufreinigung von Proteinen verwendet. Die mit TPA behandelten Zellen (18 h) wurden geerntet, gewaschen und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde mehreren differen-

ziellen Zentrifugationsschritten unterzogen. Das zum Abschluss erhaltene Pellet wurde zur Gewinnung der Membranfraktion mit einem Extraktionspuffer bestehend aus HBS-Puffer und 0.5 % Triton X-100 versetzt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Der erhaltene Membranextrakt wurde durch Zentrifugation geklärt und anschließend in SDS-PAGE, Western-Blotting-Analysen und in SPR-Experimenten eingesetzt.

Die durchgeführten Analysen zeigten, dass die Integrinanreicherung nur gering war. Darüber hinaus war das gewonnene Integrin nicht nativ, da in entsprechenden SPR-Experimenten am immobilisierten Fibronectin keine Interaktion detektiert werden konnte. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass das beschriebene Verfahren zu Anreicherung vom $\alpha_5\beta_1$ Integrin ungeeignet ist.

Als weitere Verfahren wurden die von Pytela *et al.* (1987) und Belkin *et al.* (1990) untersucht, bei denen es sich explizit um Protokolle zur Integrinaufreinigung handelt. Beide Verfahren beinhalten einen milden Zellaufschluss mittels Detergenzien, der besonders für die Anreicherung empfindlicher Membranproteine von Vorteil ist. In einigen Schritten war eine Modifizierung der Originalprotokolle notwendig, um sie an die gegebenen Umstände anzupassen.

Tab. 11: Unterschiede zwischen den Protokollen von Pytela und Belkin

	<i>Pytela et al.</i>	<i>Belkin et al.</i>
Detergens	Octyl- β -D-glucopyranosid	Triton X-100 oder Octyl- β -D-glucopyranosid
Puffer	PBS, CaCl ₂ , MgCl ₂ , PMSF, pH 7.4	Tris-HCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ , PMSF, pH 7.4

Nach der Ernte wurden die Zellen gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit einem Detergenzhaltigen Puffer extrahiert. Im Protokoll nach Belkin *et al.* befand sich zwischen Waschen und Extraktion ein Zusatzschritt, bei dem das Pellet in EGTA-haltigem Puffer geringer Ionenstärke resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Dieser Schritt diente der Abtrennung peripherer Membranproteine und der Desaktivierung von Matrixmetalloproteinasen (Feramisco & Burridge, 1979; Koteliansky *et al.*, 1985; Kelly *et al.*, 1987). Nach der Extraktion wurden die zentrifugierten Membranextrakte für SDS-PAGE, Western-Blotting-Analysen und SPR-Experimente verwendet.

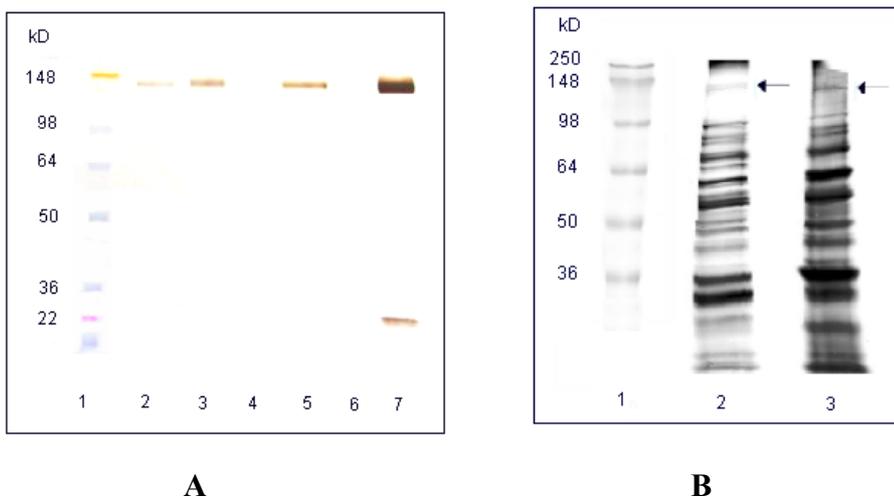


Abb. 26: Dokumentation der Primäraufreinigung.

(A) Ergebnis einer Western-Blotting-Analyse (reduzierende Bedingungen) verschiedener Membranextrakte gegen die Integrin-Untereinheit α_5 . Die Banden wurden mit DAB visualisiert. (1) Marker SeeBlue® Plus2 (2) ME K562 nach Pytela, (3) ME K562 nach Belkin Triton X-100, (4) ME MOLT-4 nach Belkin Triton X-100, (5) ME K562 nach Belkin β -OG, (6) ME Ramos nach Belkin Triton X-100, (7) isoliertes $\alpha_5\beta_1$ Integrin (Chemicon).

(B) zeigt den Ausschnitt einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen, die mittels Silberfärbung visualisiert wurde. (1) Marker SeeBlue® Plus2 (2) ME K562 nach Belkin Triton X-100, (3) ME K562 nach Pytela.

Das Ergebnis der Western-Blotting-Analyse zeigt, dass beide Protokolle gut zur Anreicherung des Integrins geeignet sind. In allen Membranextrakten aus K562 Zellen ist eine deutliche Bande bei 135 kD erkennen. Sie ist unter reduzierenden Gelelektrophorese-Bedingungen der α_5 -Kette des Integrins zu zuordnen, weil unter diesen Bedingungen die durch zwei Disulfidbrücken verbundenen Fragmente (135 kD und 25 kD) der Kette getrennt werden (Pigott & Power, 1994). Beim isolierten Integrin ist zusätzlich die 25 kD-Bande zu erkennen.

Unterschiede zwischen den Membranextrakten sind lediglich bei der Bandenintensität zu erkennen. Diese Abweichung ist allerdings unter halb quantitativen Bedingungen nicht zwangsläufig auf eine geringere Ausbeute bei der Präparation nach Pytela (2) zurückzuführen ist. Beim Vergleich der Detergenzien Triton X-100 (3) und Octyl- β -D-glucopyranosid (5) konnte kein Unterschied beobachtet werden.

SPR-Experimente (Kapitel 6.4) am immobilisierten Fibronectin zeigten, dass der mit Triton X-100 präparierte Membranextrakt nach Belkin *et al.* natives Integrin enthielt und gut für diese Art von Experimenten geeignet ist. Bei den mit Octyl- β -D-glucopyranosid hergestellten

Membranextrakten konnte mit Fibronectin keine Wechselwirkung detektiert werden. Allerdings ließ bei dieser Messung der Verlauf der Basislinie vermuten, dass das Detergens dem immobilisierten Fibronectin jegliche Fähigkeit zur Interaktion nahm. Aus den durchgeführten SDS-PAGE lässt sich schließen, dass der von Belkin *et al.* durchgeführte Zwischenschritt zur Abtrennung der peripheren Membranproteine von Vorteil ist. Diese Extrakte zeichneten sich durch eine stärkere Aufreinigung und eine längere Lagerfähigkeit bei -80 °C aus.

Bei den Ergebnissen der SDS-PAGE wurde darüber hinaus deutlich, dass die nach Belkin *et al.* hergestellten Membranextrakte eine geringere Integrinkonzentration aufwiesen, was sich auf das größere Volumen an Extraktionspuffer zurückführen ließ. Ein konzentrierterer Membranextrakt konnte ohne Verlust an Qualität durch die Reduzierung des Extraktionsvolumens um den Faktor zwei erhalten werden.

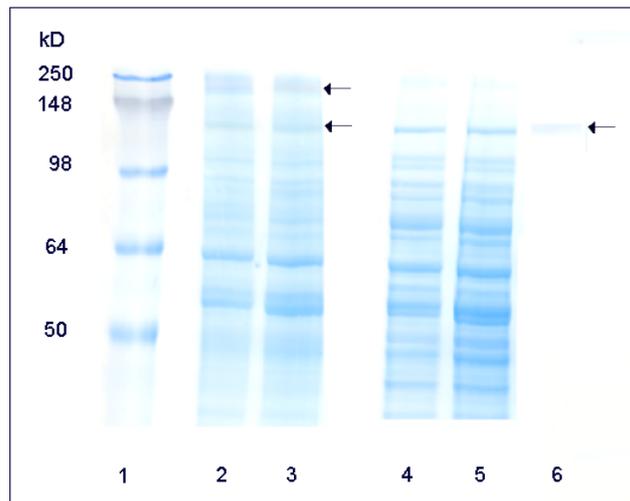


Abb. 27: SDS-PAGE von Membranextrakten. Membranextrakte wurden nach der modifizierten Belkin-Methode hergestellt und 10 %igen SDS-Polyacrylamidelektrophoresen unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen unterzogen. Die Proteinbanden wurden mittels einer kolloidalen Coomassielösung visualisiert. (1) Marker SeeBlue® Plus2; (2) ME K562 ohne TPA, nicht reduzierende Bedingungen; (3) ME K562 mit TPA, nicht reduzierende Bedingungen; (4) ME K562 ohne TPA, reduzierende Bedingungen; (5) ME K562 mit TPA, reduzierende Bedingungen, (6) isoliertes $\alpha_5\beta_1$ Integrin (Chemicon), reduzierende Bedingungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Primäraufreinigung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins wurden nach dem Zellaufschluss Membranextrakte präpariert. Alle Extrakte zeichneten sich durch eine entscheidende Volumen- und Massenreduktion aus und enthielten das gewünschte Integrin in angereicherter Form.

Die Resultate der durchgeführten Analysen lassen allerdings vermuten, dass das durch die Standardmethode aufgereinigte Protein nicht nativ war. Eine mögliche Ursache dafür könnte der Zellaufschluss per Ultraschall sein, bei dem grundsätzlich die Gefahr der Proteindenaturierung durch Überhitzung besteht.

Die Methoden von Pytela *et al.* und Belkin *et al.* lieferten beide das Integrin in nativer Form. Die Analyseergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die Abtrennung der peripheren Membranproteine bei Belkin *et al.* zu einer höheren Qualität und Lagerfähigkeit des Membranextraktes führt.

6.3.2 Quantifizierung des angereicherten Integrins

Membranextrakte enthalten zahllose Proteine, sodass die Konzentrationsbestimmung eines bestimmten, darin enthaltenen Proteins schwierig ist. Die von Bhowen & Bennett beschriebene Methode stellt eine gute Lösung für dieses Problem dar (Bhowen & Bennett, 1983). Der Membranextrakt wird zunächst einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Die visualisierten Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine eluiert. Die Konzentration der erhaltenen Proteinlösungen kann durch Proteinbestimmungstests ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit hergestellten Membranextrakte aus K562 Zellen wurden einer seminativen Gelelektrophorese unterzogen. Diese Form der Gelelektrophorese hat den Vorteil, dass die späteren Proteinlösungen weder β -Mercaptoethanol noch SDS enthalten. Beide Reagenzien wirken beim BCA-Test nach Smith *et al.* störend (Smith *et al.*, 1985). Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinbanden mit einer Coomassielösung angefärbt, aus dem Gel ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Die Elution der Proteine erfolgte 20 h bei Raumtemperatur. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der erhaltenen Proben diente ein BCA-Test. Um ein Maß für die Vollständigkeit der Elution zu haben, wurden bei Versuchen neben den Membranextrakten die isolierten Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ eingesetzt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente geben an, dass die Integrinmenge in den Membranextrakten 10 % der Gesamtproteinmenge entspricht. Aufgrund der Referenzproteine konnte die Effizienz der Elution überprüft werden. Hierbei zeigte sich, dass 90 % der eingesetzten Proteinmenge aus dem Gel eluiert wurden und die vorgestellte Methode eine gute Reproduzierbarkeit aufweist.

Ergänzend zu der von Bhowan & Bennett beschriebenen Methode wurde die Proteinmenge über die Bandendicke in gefärbten SDS-PAGE abgeschätzt. Dazu wurden neben den Membranextrakten Rinderserumalbuminlösungen in verschiedenen Konzentrationen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele einer kolloidalen Coomassiefärbung oder einer Silberfärbung unterzogen und die Bandendicke optisch ermittelt.

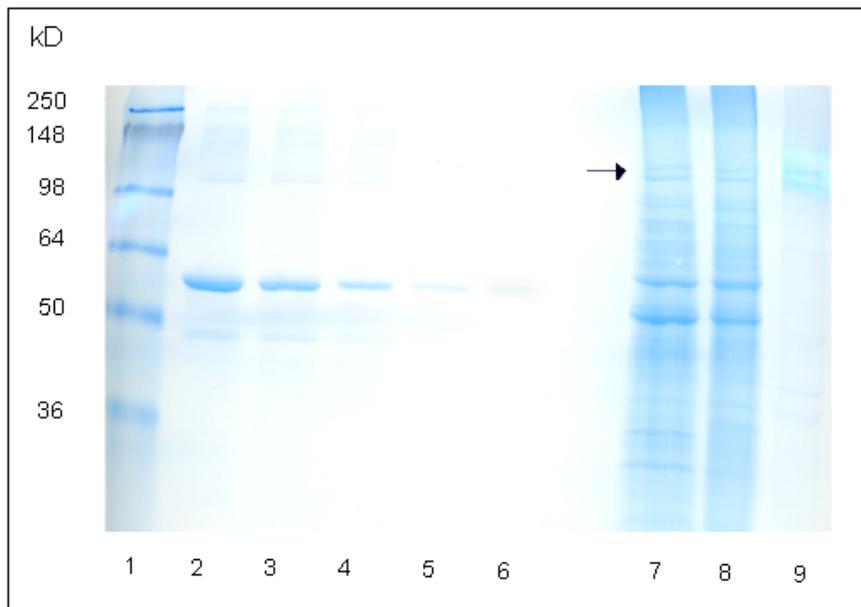


Abb. 28: SDS-PAGE zur Abschätzung der Integrinkonzentration. In einem 10 %igen Polyacrylamidgel wurden Rinderserumalbuminlösungen und Membranextrakte unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer kolloidalen Coomassielösung gefärbt. Die Integrin-Doppelbande (Pfeil) ist deutlich zu erkennen. (1) Marker SeeBlue® Plus2; (2) BSA (1 µg), (3) BSA (0.4 µg), (4) BSA (0.15 µg), (5) BSA (0.05 µg), (6) BSA (0.025 µg), (7) ME K562 nach Belkin Triton X-100, (8) ME K562 nach Belkin Triton X-100, (9) isoliertes $\alpha_5\beta_1$ Integrin (Chemicon) (0.4 µg).

Die Resultate dieser Methode stimmten gut mit denen nach Bhowan & Bennett erzielten Ergebnissen überein. Sie zeichnet sich durch einen geringen experimentellen Aufwand aus, kann aber die quantitative Methode von Bhowan & Bennett nicht ersetzen.

6.4 Oberflächenplasmonresonanz

Oberflächenplasmonresonanz-Messungen stellen eine geeignete Methode dar, um Integrin-Fibronectin-Wechselwirkungen in einem dynamischen System zu untersuchen. Darüber hinaus ermöglicht diese Methode die Analyse von Zellextrakten, wodurch eine detailliertere Betrachtung der Interaktion möglich wird, ohne zuvor das Integrin vollständig aufzureinigen.

6.4.1 Immobilisierung von Fibronectin über Aminokupplung

Für die Immobilisierung von Substanzen an die Dextranoberfläche des CM5 Chips gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine davon stellt die Aminokupplung dar. Dabei werden die Liganden über native Aminogruppen kovalent an die Matrix immobilisiert.

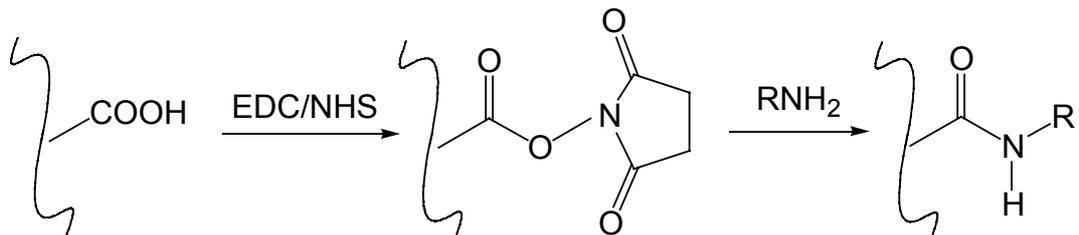


Abb. 29: Aminokupplung. 40 % der Carboxyl-Funktionen der Dextranmoleküle an der Chipoberfläche werden durch die Reagenzien EDC und NHS zu einem N-Hydroxysuccinimid-Ester umgewandelt (Stenberg *et al.*, 1991). Dieser Ester reagiert mit primären und sekundären Aminen unter Bildung von kovalenten Amid-Bindungen.

Der N-Hydroxysuccinimid-Ester ist bei Raumtemperatur nur für etwa 1 h stabil, sodass die Immobilisierung innerhalb dieses Zeitrahmens abgeschlossen werden sollte. Im Anschluss wird der nicht umgesetzte Ester durch ein primäres Amin inaktiviert. Dieses Amin sollte so ausgewählt werden, dass das entstehende Amid keinen Einfluss auf die späteren Experimente hat.

Bei der Immobilisierung via Aminokupplung spielt der pH-Wert der verwendeten Lösungen eine entscheidende Rolle. Er muss einerseits in dem Bereich liegen, in dem die NHS-Ester

Reaktion (normalerweise pH 7.0 bis 9.0) ablaufen kann und andererseits die positive Ladung des zu immobilisierenden Proteins gewährleisten (pH-Wert unterhalb des pI-Wertes des Proteins). Die positive Ladung des Proteins ist eine Grundvoraussetzung für die Immobilisierung, weil nur so das Eindringen in die negativ geladene Dextranmatrix möglich wird. Bei hohen pH-Werten kann die Dextranmatrix eine Abstoßung des Proteins verursachen.

Ist der pI-Wert des zu immobilisierenden Proteins nicht bekannt, so muss der für die Immobilisierung ideale pH-Wert durch ein pH-Scouting herausgefunden werden. Dafür wird das zu immobilisierende Protein in verschiedene Puffer mit variierenden pH-Werten gegeben und über die Sensorchipoberfläche geleitet. Zeigt das Sensorgramm einen Signalanstieg, so kann das Protein bei den jeweiligen Bedingungen in die Dextranmatrix eindringen und entsprechend immobilisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte humanes Plasmafibronectin über Aminokupplung auf die Dextranoberfläche eines CM5 Chip immobilisiert werden. Der pI-Wert des Fibronectins ließ sich auch mithilfe gängiger Proteindatenbanken (z. B. SWISS-PROT) nicht ermitteln, da lediglich die Aminosäuresequenzen von Fibronectinfragmenten zur Verfügung standen. Folglich musste ein pH-Scouting durchgeführt werden. Parallel dazu wurde die optimale Fibronectinkonzentration für die Immobilisierung bestimmt.

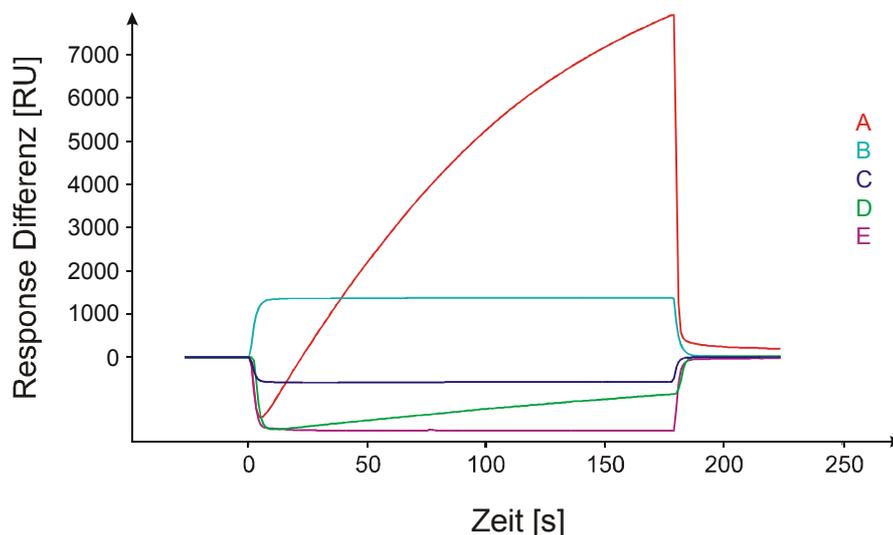


Abb. 30: pH-Scouting. Zur Bestimmung der für die Immobilisierung des Fibronectins idealen Bedingungen wurden in einem Vorexperiment verschiedene Puffer getestet. (A) Maleatpuffer (5 mM; pH 6.0), (B) Citratpuffer (5 mM; pH 6.0), (C) HEPES-Puffer (10 mM; pH 6.6), (D) Acetatpuffer (10 mM; pH 6.5), (E) Maleatpuffer (5 mM; pH 7.0).

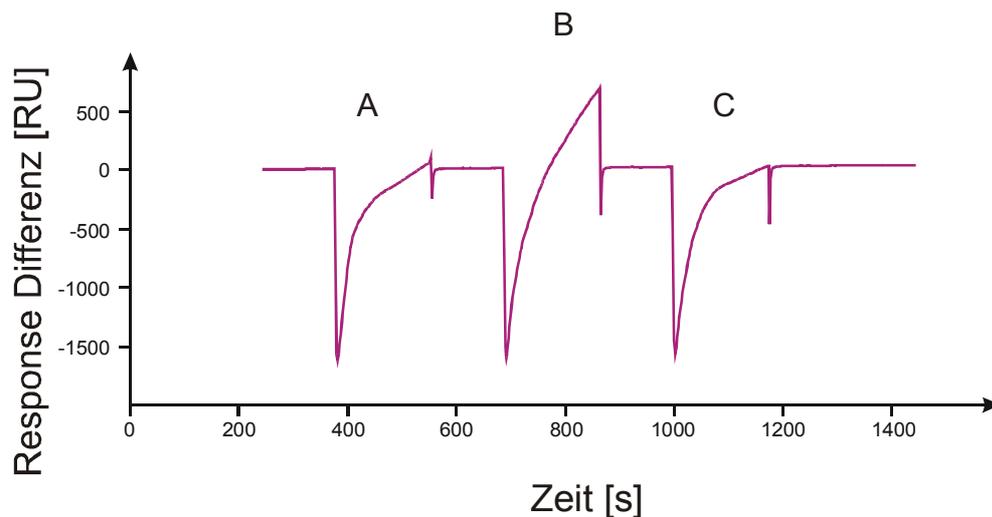


Abb. 31: pH-Scouting Maleatpuffer. Vorausgegangene Experimente hatten gezeigt, dass ein 5 mM Maleatpuffer gut für die Immobilisierung des Fibronectins geeignet ist. In einem Folgeexperiment wurde der optimale pH-Wert bestimmt. (A) Maleatpuffer (5 mM; pH 4.5), (B) Maleatpuffer (5 mM; pH 5.0), (C) Maleatpuffer (5 mM; pH 5.5).

Die Resultate der Vorexperimente zeigen, dass für die Immobilisierung des verwendeten Fibronectins ein 5 mM Maleatpuffer mit dem pH-Wert 5.0 am besten geeignet ist. pH-Werte oberhalb von 6.0 sind für die Immobilisierung nicht geeignet, weil unter diesen Bedingungen keine Wechselwirkung mit der Matrix beobachtet werden konnte. Als optimale Fibronectinkonzentration stellte sich $20 \mu\text{gml}^{-1}$ heraus.

Im ersten Schritt der Fibronectinimmobilisierung wurden Mess- und Referenzzelle durch die Injektion einer Mischung aus EDC (400 mM) und NHS (100 mM) aktiviert. Im Anschluss wurde die mit Maleatpuffer verdünnte Fibronectinlösung über die Oberfläche der Messzelle geleitet, wobei die kovalente Bindung des Fibronectins an die Matrix stattfand. Abschließend wurden die verbliebenen N-Hydroxysuccinimidester beider Flusszellen durch die Injektion einer Lösung bestehend aus 1 M Glycin und 1 M NaCl (pH 4.8), gefolgt von einer Lösung aus 1 M Ethanolamin, 1 M NaCl (pH 8.5) deaktiviert. Bei der alleinigen Deaktivierung mit Ethanolamin wurde bei späteren Bindungsexperimenten eine hohe unspezifische Bindung beobachtet, die auch durch die Zugabe von 0.01 % (w/v) CM5-Dextran nicht reduziert werden konnte.

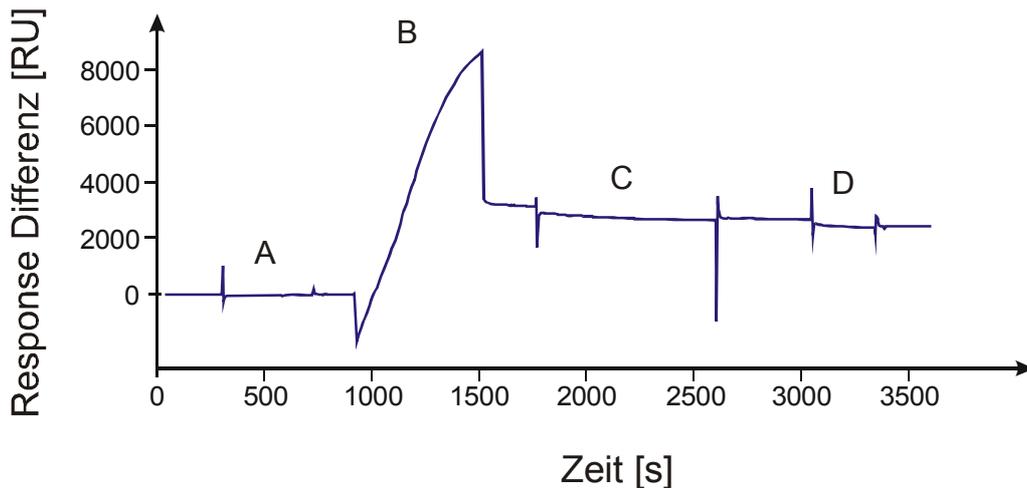


Abb. 32: Immobilisierung von Fibronectin. Die Abbildung zeigt den Signalverlauf während der einzelnen Immobilisierungsschritte.

- (A) Injektion von EDC/NHS, (B) Injektion der Fibronectinlösung (20 µg/ml)
- (C) Injektion der Desaktivierungslösung (1 M Glycin, 1 M NaCl (pH 4.8)),
- (D) Injektion der Desaktivierungslösung (1 M Ethanolamin, 1 M NaCl (pH 8.5))

Mit der beschriebenen Methode konnte ein Immobilisierungsniveau von 7000 – 8000 RU erreicht werden.

Die Lagerung des Fibronectin-beladenen CM5 Chips erwies sich als schwierig. Es wurden verschiedene Lagerungsbedingungen evaluiert. Die beste Stabilität des Fibronectins konnte durch die Lagerung in HBS-N-Puffer bei 4 °C erreicht werden. Allerdings blieb das Fibronectin auch in diesem Fall nur vier Tage lang nativ.

6.4.2 Bindungsexperimente mit intakten K562 Zellen

Nach der Immobilisierung des humanen Plasmafibronectins wurde zunächst untersucht, ob sich die Interaktion zwischen intakten K562 Zellen und Fibronectin mittels Oberflächenplasmonresonanz detektieren lässt. Die Experimente wurden dabei durch die Größe des Messbereichs im BIACORE-Gerät limitiert. Der Messbereich besteht aus einem 0.3 µm dicken Film über der Chipoberfläche. Je weiter die Moleküle von der Chipoberfläche entfernt sind, desto geringer ist ihr Einfluss auf das Messsignal; jenseits dieses Bereichs hat die Anlagerung von Molekülen keinen Einfluss mehr auf das Messsignal (Rehm, 2000).

Daraus resultiert, dass sich Lysosomen mit einem Durchmesser von $0.2 - 2 \mu\text{m}$ gut erfassen lassen, während von eukaryotischen Zellen mit einem Durchmesser von $10 - 100 \mu\text{m}$ nur ein Bruchteil der Zelloberfläche in den Messbereich gelangt (Abb. 33).

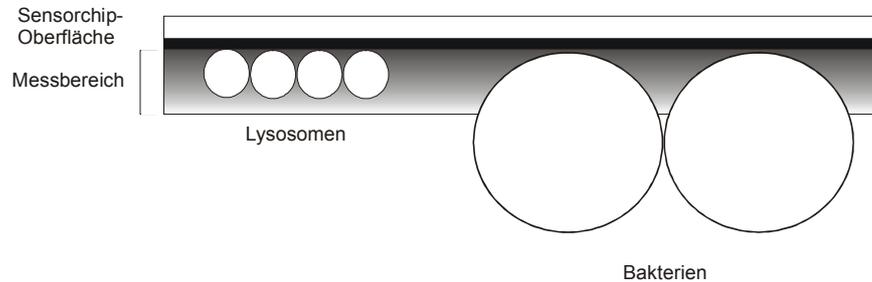


Abb. 33: Messbereich eines Sensorchips (nach Rehm, 2000).

Bisher wurden nur wenige Studien mit ganzen, eukaryotischen Zellen durchgeführt. Im Jahr 2000 gelang es Quinn *et al.* Zell-Ligandinteraktionen mithilfe der Oberflächen-plasmonresonanz zu untersuchen (Quinn *et al.*, 2000). Die von ihnen verwendeten Erythrozyten waren allerdings mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $7 \mu\text{m}$ um den Faktor drei kleiner als die von uns verwendeten K562 Zellen (Koeffler & Golde, 1980).

Für die durchgeführten Bindungsstudien wurden mit TPA behandelte K562 Zellen verwendet. Sie wurden mehrfach mit Bindungspuffer gewaschen. Das Integrin $\alpha_5\beta_1$ an der Zelloberfläche wurde durch Manganionen und den Antikörper TS2/16 aktiviert. Während der Injektion der Zellen konnte eine deutliche Zunahme des Resonanzsignals beobachtet werden (Abb. 34). Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war jedoch zu gering, um aussagekräftige Bindungsstudien durchführen zu können.

Die Regenerierung der Chipoberfläche erwies sich als schwierig. Es wurden verschiedene Reagenzien wie z. B. 1 M NaCl-Lösung, 5 mM NaOH-Lösung und 0.5 %ige (w/v) SDS-Lösung hinsichtlich ihrer Effektivität und ihres Einflusses auf das immobilisierte Fibronectin getestet. Während die NaCl-Lösung und die NaOH-Lösung nur eine geringe Wirksamkeit aufwiesen, führte die 0.5 %ige (w/v) SDS-Lösung zu einer Desaktivierung des Fibronectins. Eine zufriedenstellende Regenerierung der Chipoberfläche gelang schließlich durch mehrmaliges Injizieren einer 10 mM Glycin-HCl-Lösung (pH 3.0).

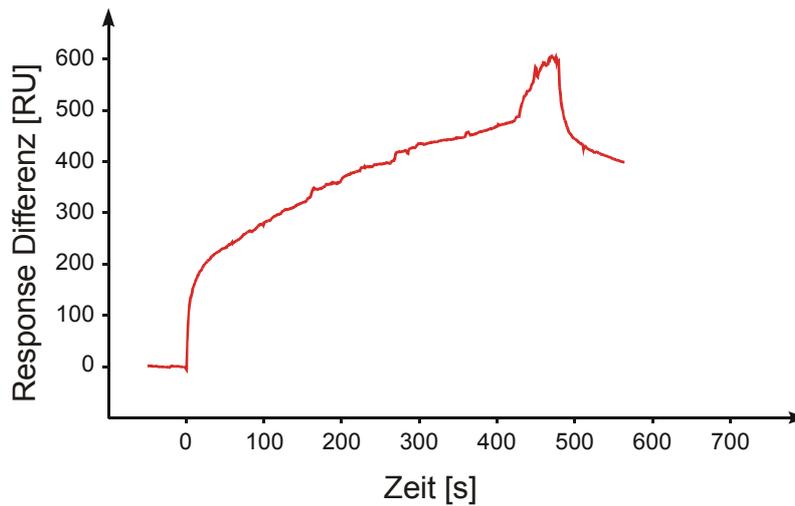


Abb. 34: Die Interaktion zwischen K562 Zellen und Fibronectin. K562 Zellen wurden in einer Konzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter über die Sensorchipoberfläche geleitet (Fluss: $20 \mu\text{min}^{-1}$, Kontaktzeit: 500 s, Temperatur: $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Zur Überprüfung der Spezifität der Zell-Fibronectin-Wechselwirkung standen sowohl das humane Plasmafibronectin selbst, als auch das von Anke Nieß und Miroslav Malesevic synthetisierte Peptid **P4** zur Verfügung. Es wurden Konkurrenzexperimente in der Art durchgeführt, dass **P4** oder alternativ Fibronectin zu den Zellen gegeben und für 30 min inkubiert wurde. So konnten die Komplexe zwischen Integrin und Fibronectin bzw. **P4** vor der Injektion gebildet werden.

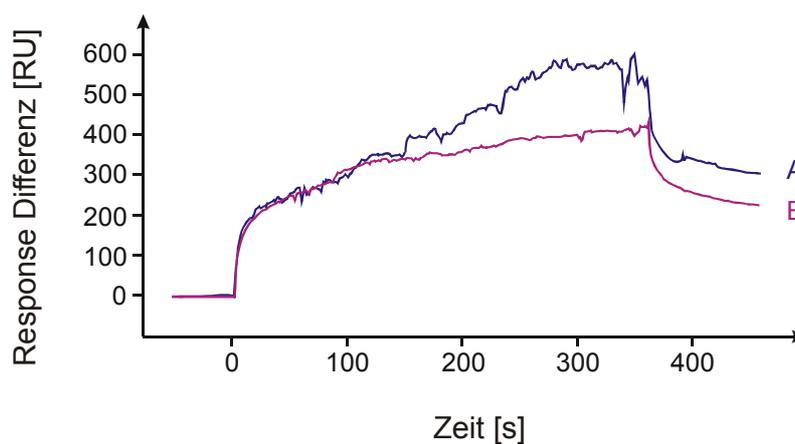


Abb. 35: Konkurrenzexperimente mit dem Peptid P4. K562 Zellen (Konzentration: $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter) wurden für 30 min mit dem Peptid **P4** ($54 \mu\text{M}$) inkubiert und anschließend injiziert. (A) K562 Zellen ohne Inkubation mit **P4**, (B) K562 Zellen nach Inkubation mit **P4**.

Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente zeigen eine deutliche Abnahme der Wechselwirkung bei vorheriger Inkubation mit Fibronectin oder **P4**. Diese Resultate führen zu der Annahme, dass es sich bei der Interaktion zwischen den K562 Zellen und dem immobilisierten Fibronectin um eine spezifische Wechselwirkung handelt.

ZUSAMMENFASSUNG

In den Studien mit intakten K562 Zellen konnte eine spezifische Wechselwirkung zwischen den Zellen und dem immobilisierten Fibronectin detektiert werden. Somit wäre dieses Testsystem prinzipiell für die Untersuchung inhibitorischer Eigenschaften cyclischer Peptide geeignet. Allerdings weist dieses System eine zu geringe Reproduzierbarkeit auf, um quantitative Interaktionsstudien durchführen zu können. Die Ursache dafür ist vermutlich in der Größe der Zellen zu suchen, von denen bei einem Durchmesser von 20 μm nur ein Bruchteil in den Messbereich von 0.3 μm reicht (Abb. 33).

Auch die Verwendung von anderen Sensorchips wie z. B. des Pioneer Chips C1 (flache, carboxymethylierte Oberfläche) oder des Pioneer Chips F1 (verkürzte Dextranmatrix) führte zu keinen zufrieden stellenderen Ergebnissen.

6.4.3 Interaktionsstudien mit Membranextrakten

Nachdem sich herausgestellt hat, dass intakte K562 Zellen für den Aufbau eines auf der Oberflächenplasmonresonanz basierenden Testsystems nicht geeignet sind (Kapitel 6.4.2), sollte ein analoges System mit Membranextrakten aus K562 Zellen etabliert werden. Hierzu wurden nach einigen Vorversuchen nur die Membranextrakte verwendet, die nach der modifizierten Belkin-Methode (Belkin *et al.*, 1990) hergestellt wurden, da diese Extrakte eine ausreichende Konzentration an nativem Integrin aufweisen.

Das in den Membranextrakten enthaltene Integrin wurde durch Manganionen aktiviert und anschließend in unterschiedlichen Konzentrationen über das immobilisierte Fibronectin geleitet. Während der Injektion deutete der Anstieg des Resonanzsignals auf eine Integrin-Fibronectin-Wechselwirkung hin. Nach Beendigung der Injektion erfolgte eine langsame Dissoziation des gebildeten Integrin-Fibronectin-Komplexes.

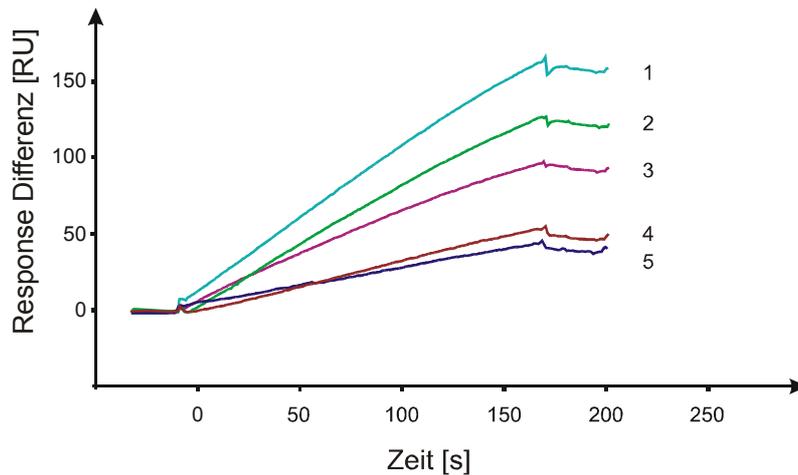


Abb. 36: Die Interaktion zwischen Membranextrakten und Fibronectin. Membranextrakte aus K562 Zellen mit verschiedenen Integrinkonzentrationen: (1) $6.4 \mu\text{gml}^{-1}$, (2) $4.6 \mu\text{gml}^{-1}$, (3) $3.2 \mu\text{gml}^{-1}$, (4) $2.3 \mu\text{gml}^{-1}$, und (5) $1.6 \mu\text{gml}^{-1}$ wurden über den fibronectinderivatisierten Sensorchip geleitet. Die Kontaktzeit betrug bei einem Fluss von $20 \mu\text{lmin}^{-1}$ 180 s. Die Integrinkonzentration in den Membranextrakten wurde nach der Methode von Bhowan & Bennett bestimmt (Kapitel 6.3.2) (Bhowan & Bennett, 1983).

Beim *Overlay* der erhaltenen Sensorgramme wird die Konzentrationsabhängigkeit der untersuchten Wechselwirkung deutlich.

Als Maß für die Affinität des $\alpha_5\beta_1$ Integrins zu seinem natürlichen Liganden Fibronectin wurden aus den erhaltenen Sensorgrammen Assoziations- und Dissoziationskonstanten bestimmt.

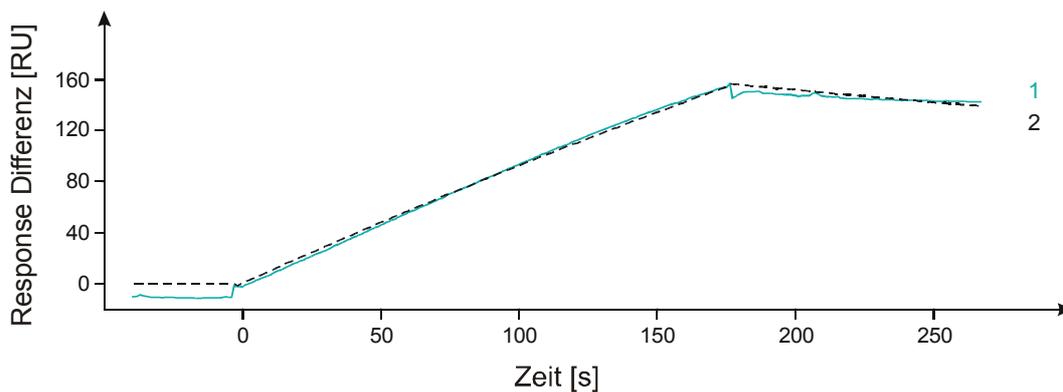


Abb. 37: Fit zur Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten.

Membranextrakt mit einer Integrinkonzentration von 0.02 nM wurde über eine mit Fibronectin beschichtete Sensorchipoberfläche geleitet. Die erhaltene Kurve wurde unter Annahme eines 1:1 Bindungsmodells (Langmuir) ohne Massentransfer gefittet.

Fitresultate und Fitparameter: $R_{\text{max}} = 155 \text{ RU}$ [$\text{SE}(R_{\text{max}}) = 1.53 \text{ RU}$], $K_A = 6.7 \cdot 10^7 \text{ M}$, $K_D = 1.5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ [$k_a = 8.8 \cdot 10^4$ ($\text{SE}(k_a) = 2.9 \cdot 10^{-3}$), $k_d = 1.4 \cdot 10^{-3}$ ($\text{SE}(k_d) = 1.6 \cdot 10^{-12}$), $\chi^2 = 4$].

Die bestimmten Dissoziationskonstanten liegen im Bereich der für Integrine bekannten Dissoziationskonstanten von 10^{-6} bis 10^{-8} M (Lodish *et al.*, 2001).

Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die hier ermittelten Konstanten nur als Richtwert dienen können, weil es sich bei dem Analyten nicht um ein aufgereinigtes Integrin, sondern lediglich um einen Membranextrakt handelte. Die Größenordnung der Konstanten deutet darauf hin, dass Integrine eine vergleichsweise niedrige Ligandenaffinität aufweisen, was mit ihrer Funktion in biologischen Prozessen in Einklang steht.

Für die SPR-Experimente erwies sich die Verwendung von Membranextrakten als günstig, die mit dem Detergens Triton X-100 präpariert wurden. Bei den mit Octyl- β -D-glucopyranosid hergestellten Extrakten konnte keine Interaktion detektiert; die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die β -OG-Unverträglichkeit des Fibronectins, weil bereits beim Fluss von β -OG-haltigem Puffer über die Messzelle eine drastische Veränderung der Basislinie beobachtet werden konnte. Eine Unverträglichkeit des β -OG vonseiten des $\alpha_5\beta_1$ Integrins kann ausgeschlossen werden, da es sich bei diesem Detergens um das Meistverwendete bei der Integrinisolierung handelt (Pytela *et al.*, 1987, Eble & Berditchevski, 2002).

6.4.4 Konkurrenzexperimente mit cyclischen Peptiden

Auf Grund der Ergebnisse in den Bindungsexperimenten (Kapitel 6.4.3) scheinen mit Triton X-100 präparierte Membranextrakte für die Untersuchung des inhibitorischen Potenzials cyclischer RGD-Peptide mittels SPR geeignet zu sein.

In ersten Studien sollten die aus dem Zelladhäsionstest als effektive Inhibitoren hervorgegangenen Peptide **P4** und **P5**, sowie als Referenz das Peptid **P9** untersucht werden. Hierzu wurden vorbereitete Membranextrakte (Integrinkonzentration: $6.4 \mu\text{gml}^{-1}$) mit verschiedenen Konzentrationen an **P4**, **P5** und **P9** (Konzentrationsbereich: $350 \mu\text{M}$ – $950 \mu\text{M}$) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ersten Ergebnisse der Studie zeigten keine Inhibition der Integrin-Fibronectin-Wechselwirkung durch die Peptide. Allerdings deuteten die erhaltenen Sensorgramme auf eine Wechselwirkung zwischen dem Triton X-100 und den Peptiden hin. Deshalb wurden die Membranextrakte in folgenden Experimenten so verdünnt, dass die Triton X-100-Konzentration bei 0.125 % lag. Die Erhaltung der nativen Form des Integrins war bei dieser Konzentration weiterhin gewährleistet, da sie oberhalb der kritischen

Mizellbildungskonzentration (CMC) von Triton X-100 lag. Die Extrakte wurden ebenfalls mit den Peptiden **P4**, **P5** und **P9** vorinkubiert und anschließend injiziert.

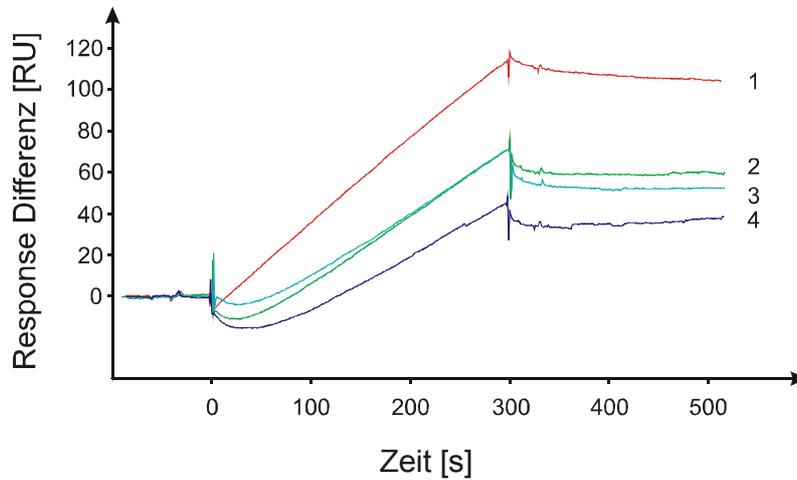


Abb. 38: Konkurrenzexperimente in Lösung mit Membranextrakt und P4. Membranextrakt aus K562 Zellen mit einer Integrinkonzentration von $6.4 \mu\text{gml}^{-1}$ wurde mit dem Peptid **P4** (im Überschuss) vorinkubiert und anschließend injiziert; (1) ohne P4, (2) $c(\text{P4}) = 350 \mu\text{M}$, (3) $c(\text{P4}) = 470 \mu\text{M}$, (4) $c(\text{P4}) = 930 \mu\text{M}$.

Im Fall des Peptids **P4** zeigt die erhaltene Sensorgrammschar (Abb. 38) mit zunehmender Konzentration an **P4** eine Abnahme des Resonanzsignals. Daraus lässt sich schließen, dass **P4** die Integrin-Fibronectin-Interaktion effektiv inhibiert, was mit den Ergebnissen der Zelladhäsionstests (Kapitel 6.2.3) übereinstimmt. Für die Peptide **P5** und **P9** konnten bei diesem Experiment keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Die zugehörigen Sensorgramme deuteten weiterhin auf eine starke Wechselwirkung zwischen den Peptiden und dem Detergens hin.

Generell erlauben es die auf diese Weise erhaltenen Sensorgramme, IC_{50} -Werte zu bestimmen. Dafür werden die R_{max} -Werte gegen die entsprechenden Peptidkonzentrationen aufgetragen und die erhaltenen Kurven einer nichtlinearen Regression unterzogen. Für das Peptid **P4** ließ sich auf diese Weise ein IC_{50} -Wert von $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ bestimmen. Allerdings ist dieser Wert alleine nicht aussagekräftig, weil die in dieser Form erhaltenen Ergebnisse stark vom Testsystem abhängen und somit nur in Relation zu den Werten anderer Peptide beurteilt werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Konkurrenzexperimente in Lösung für das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte System nur eingeschränkt realisierbar sind. Eine mögliche Ursache dafür stellt die Wechselwirkung zwischen den Peptiden und dem Triton X-100 dar.

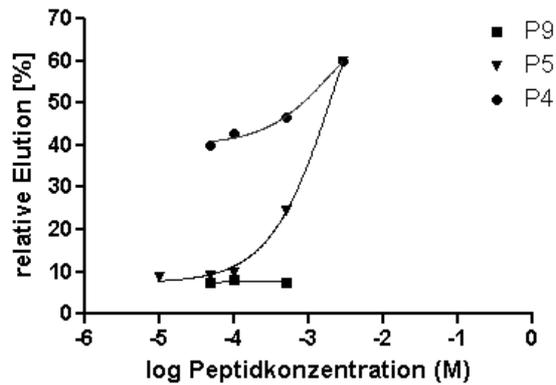
Die Verwendung von β -OG als Detergens könnte dieses Problem lösen. Allerdings könnte dann nicht Fibronectin selbst als Interaktionspartner eingesetzt werden; sondern müsste durch ein geeignetes RGD-Peptid ersetzt werden. Einen weiteren Lösungsansatz stellt die Verwendung von rekombinantem $\alpha_5\beta_1$ Integrin dar. Diese ohne Detergens löslichen Integrinfragmente werden unter Anwendung von Fc-Fragment-Dimerisierung und Säugerzell-Expression (Stephens *et al.*, 2000) produziert und zeigen die gleichen Charakteristika wie das aus Plazenta isolierte Integrin (Coe *et al.*, 2001).

6.4.5 Elutionsexperimente mit cyclischen Peptiden

Kompetitive Elutionsexperimente stellen eine wichtige Ergänzung zu Konkurrenzexperimenten in Lösung dar. Sie sind dazu geeignet, relative Affinitäten von Substanzen bezüglich ihrer Interaktionspartner zu untersuchen (Markgren *et al.*, 2000).

In diesem Fall wurde untersucht, inwieweit die Peptide **P4**, **P5** und **P9** in der Lage sind, die Interaktion zwischen Fibronectin und $\alpha_5\beta_1$ enthaltenden Membranextrakt zu beeinflussen. Dazu wurde zunächst Membranextrakt aus K562 Zellen über einen mit Fibronectin derivatisierten CM5 Chip geleitet. Nachdem die Bindung detektiert werden konnte, wurden die Peptidlösungen in verschiedenen Konzentrationen (500 nM – 10 μ M) injiziert. Die relative Elution wurde über Differenzbildung zwischen dem Bindungssignal vor der Peptidinjektion und nach der Peptidinjektion bestimmt. Durch Auftragung der relativen Elutionen gegen die zugehörigen Peptidkonzentrationen und anschließender nichtlinearer Regression konnten B_{50} -Werte bestimmt werden, die der Menge an Peptid entsprechen, welche zu einer 50 %igen Elution des Membranextraktes führt.

Peptid	B ₅₀ [M]
P4	3·10 ⁻³
P5	3·10 ⁻³
P9	> 1



A

B

Abb. 39: Ergebnisse der kompetitiven Elutionsanalyse. (A) Tabelle mit den bestimmten B₅₀-Werten. (B) Die relative Elution wurde gegen den Logarithmus der Peptidkonzentrationen aufgetragen. An die resultierenden Kurven konnte mithilfe einer nichtlinearen Regression eine theoretische Kurve angepasst werden.

Die Resultate der kompetitiven Elutionsanalyse zeigen die gleiche Tendenz wie die des Zelladhäsionstests. Die Peptide **P4** und **P5** weisen eine hohe Affinität zum Membranextrakt auf, während das Peptid **P9** nahezu keine Affinität zeigt.

Ein direkter Vergleich zwischen den ermittelten B₅₀-Werten und den IC₅₀-Werten aus dem Zelladhäsionstest ist nicht zulässig, da sich beide Testsysteme sowohl in der Form des eingesetzten Integrins, als auch in den experimentellen (kinetischen) Bedingungen erheblich unterscheiden.

6.4.6 Immobilisierung von M220 via Aminokupplung

In Anlehnung an Experimente zur Aufreinigung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins mittels Affinitätschromatografie an immobilisierten Peptiden sollte das mit einem Linker versehene Peptid **M220** (hergestellt von Miroslav Malesevic) an einem CM5 Chip immobilisiert werden.¹ Die Kernsequenz dieses Peptids [-c-(Cys^[S-S]-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys^[S-S])-] entspricht der von literaturbekannten, spezifischen $\alpha_5\beta_1$ Antagonisten, die 1994 von Koivunen *et al.* mithilfe einer CX₇C Phagen-Bibliothek identifiziert wurden (Koivunen *et al.*, 1994). Durch

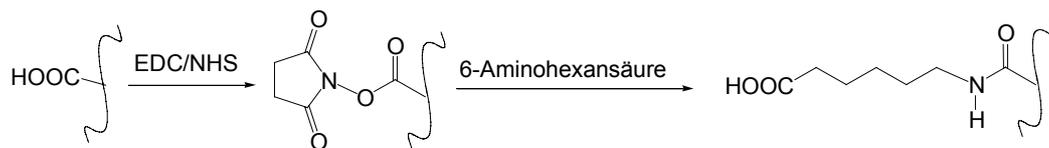
¹ Im Rahmen dieser Arbeit betreute Diplomarbeit von L. Wobbe.

die Acetylierung am N-Terminus dieses Peptids wird gewährleistet, dass bei einer Aminokupplung die Immobilisierung über die Aminofunktion des Linkers erfolgt.

In ersten Studien wurde das Peptid direkt über den Linker an die Sensorchipoberfläche immobilisiert. Anschließende Bindungsexperimente zeigten keine Interaktion zwischen dem Peptid **M220** und dem Membranextrakt. Als mögliche Ursache dafür kam unter anderem die Länge des Linkers in Frage. Im Fall der Affinitätsäule enthielt das Säulenmaterial einen *Spacer* bestehend aus 6-Aminohexansäure, während sich auf der Sensorchipoberfläche lediglich Dextranmoleküle befanden. Die Größe der Dextranmoleküle reicht scheinbar nicht aus, um den Abstand zwischen Sensorchipoberfläche und Peptid zur Verfügung zu stellen, der für die Einnahme der bioaktiven Konformation des Peptids notwendig ist.

Zur Lösung dieses Problems bot sich eine zweistufige Immobilisierung an. In der ersten Stufe wird 6-Aminohexansäure als *Spacer* an den Chip immobilisiert und in der zweiten Stufe wird das Peptid an den *Spacer* gebunden (Abb. 40).

1. Stufe der Immobilisierung



2. Stufe der Immobilisierung

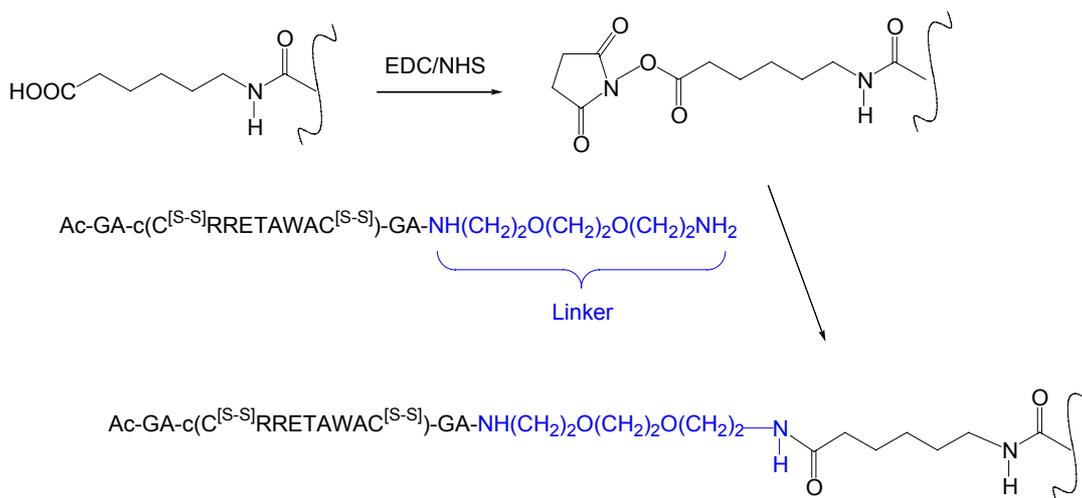


Abb. 40: Schema zur Immobilisierung des Peptids M220. In der ersten Stufe der Immobilisierung wird die 6-Aminohexansäure kovalent an die Matrix gebunden. Die zweite Stufe beinhaltet die Immobilisierung des Peptids an den in der ersten Stufe erzeugten *Spacer*.

Der *Spacer* ist mit dem des bei der Affinitätschromatografie verwendeten Säulenmaterials identisch, sodass die analoge Präsentation des Peptids möglich sein sollte.

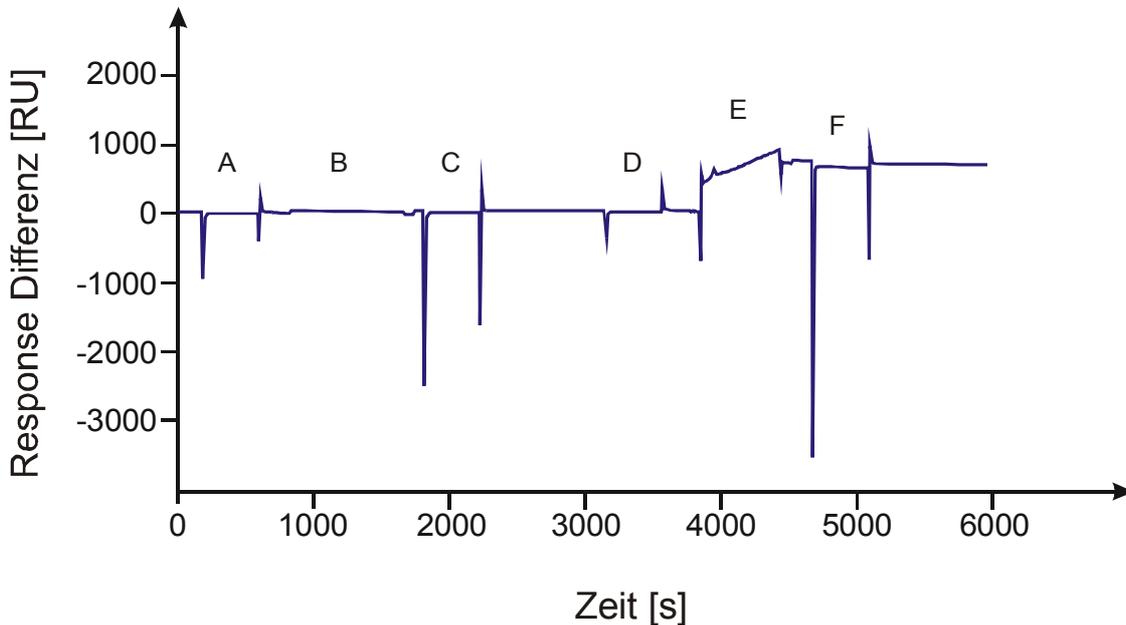


Abb. 41: Immobilisierung des Peptids M220 einschließlich Verlängerung des Linkers.

Über Aminokupplung wurde zunächst 6-Aminohexansäure und im Anschluss das am N-Terminus acetylierte und mit einem Linker modifizierte Peptid **M220** immobilisiert. (A) Injektion von EDC/NHS, (B) Injektion der 6-Aminohexansäure-Lösung (7 μM) (C) Inaktivierung mit 1 M Ethanolamin und 1 M NaCl (pH 8.5), (D) Injektion von EDC/NHS, (E) Injektion von M220 (0.7 μM), (F) Inaktivierung mit 1 M Ethanolamin und 1 M NaCl (pH 8.5).

Mit dieser Methode konnten 700 RU **M220** (einschließlich 6-Aminohexansäure als *Spacer*) auf der Chipoberfläche immobilisiert werden. Bei einer Lagerung in HBS-N-Puffer bei 4 °C blieb das Peptid für mehrere Wochen stabil.

6.4.7 Interaktionsstudien am M220-Chip

Für die Bindungsexperimente wurden analog zu den Bindungsexperimenten am immobilisierten Fibronectin Membranextrakte aus K562 Zellen verwendet. Sie wurden mit Manganionen versetzt (effektive Konzentration: 2 mM) und nach 30 minütiger Inkubation auf Eis in unterschiedlichen Konzentrationen vermessen. Die mithilfe der Referenzzelle detektierte unspezifische Bindung ließ sich durch die Zugaben von 0.01 % CM5-Dextran auf ein

Minimum reduzieren. Die Sensorchipoberfläche konnte durch zwei kurze Injektionspulse mit 25 mM NaOH regeneriert werden. Eine Beeinträchtigung der Interaktionsfähigkeit des immobilisierten Peptids konnte nicht beobachtet werden.

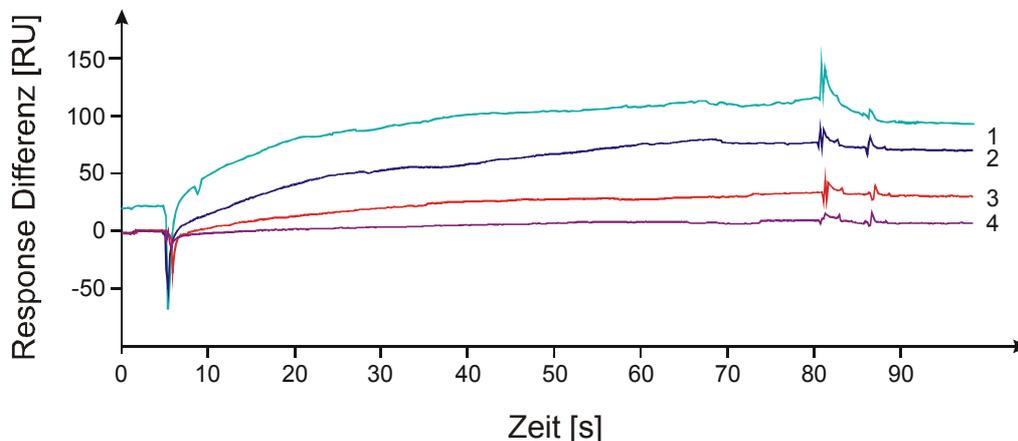


Abb. 42: Interaktionsstudien. K562 Membranextrakte mit verschiedenen Integrinkonzentrationen (1) 11 µgml⁻¹, (2) 6 µgml⁻¹, (3) 3 µgml⁻¹, (4) 1 µgml⁻¹ wurden injiziert. Der Anstieg des Resonanzsignals zeigt eine Interaktion zwischen dem immobilisierten Peptid und den im Membranextrakt enthaltenen Proteinen an.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien am immobilisierten Peptid **M220** zeigen eine konzentrationsabhängige Wechselwirkung zwischen dem Membranextrakt und dem Peptid. Da dieses Peptid ausschließlich an das Integrin $\alpha_5\beta_1$ bindet, kann von einer spezifischen Interaktion zwischen den beiden Bindungspartnern ausgegangen werden.

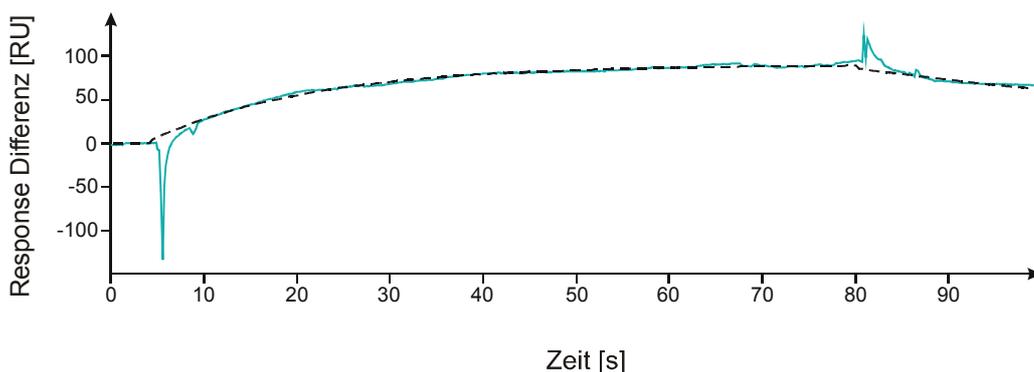


Abb. 43: Fit zur Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten.

Membranextrakt mit einer Integrinkonzentration von 0.03 nM wurde über eine mit **M220** beschichtete Sensorchipoberfläche geleitet. Die erhaltene Kurve wurde unter Annahme eines 1:1 Bindungsmodells (Langmuir) ohne Massentransfer gefittet.

Fitresultate und Parameter: $R_{\max} = 122 \text{ RU}$ [SE(R_{\max}) = 1.87 RU], $K_A = 7.1 \cdot 10^{10} \text{ M}$, $K_D = 1.4 \cdot 10^{-11} \text{ M}$
 $[k_a = 1.2 \cdot 10^9 \text{ (SE}(k_a) = 2.9 \cdot 10^{-7}), k_d = 1.7 \cdot 10^{-2} \text{ (SE}(k_d) = 1.6 \cdot 10^{-4}), \chi^2 = 3.$

Die ermittelte Dissoziationskonstante ist um den Faktor 10^3 kleiner als die, die mit dem System Integrin-Fibronectin bestimmt worden ist. Eine Deutung dieses Ergebnisses ist schwierig, da ein Fibronectinmolekül deutlich größer als ein Peptidmolekül ist und folglich mehr Platz auf dem Chip beansprucht. Dadurch stehen dem Integrin auf dem mit dem Peptid beschichteten Chip mehr potenzielle Interaktionspartner zur Verfügung. Wie in Kapitel 6.4.3 handelt es sich bei den ermittelten Konstanten lediglich um Richtwerte, weil für die Bestimmung kein gereinigtes Integrin verwendet wurde. Die Ergebnisse sind aber aufgrund der Spezifität des Peptids qualitativ höher zu bewerten. Entsprechende Vergleichswerte für die Konstanten aus der Literatur stehen nicht zur Verfügung.

6.4.8 Konkurrenzexperimente in Lösung

Ergänzend zu den Interaktionsstudien wurden an der mit dem Peptid **M220** derivatisierten Sensorchipoberfläche Konkurrenzexperimente in Lösung durchgeführt. K562 Membranextrakt mit einer Integrinkonzentration von $8 \mu\text{gml}^{-1}$ wurde mit verschiedenen Konzentrationen des Peptids **P4** versetzt und zwecks Komplexbildung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen injiziert und die erhaltenen Resonanzsignale aufgezeichnet.

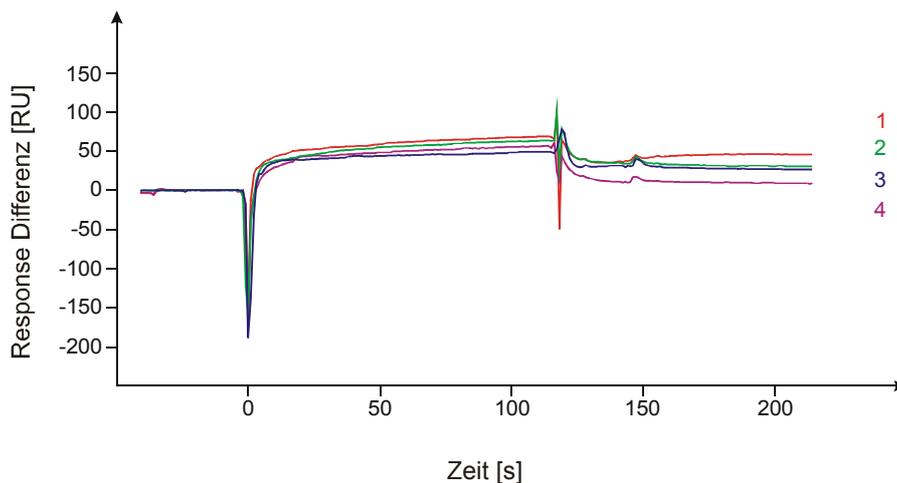


Abb. 44: Konkurrenzexperimente mit dem Peptid P4. Membranextrakt wird mit P4 vorinkubiert und anschließend über die Sensorchipoberfläche geleitet. Die Abbildung zeigt die erhaltenen Sensorgramme für P4-Konzentrationen von (1) $0 \mu\text{M}$, (2) $500 \mu\text{M}$, (3) $750 \mu\text{M}$ und 1 mM.

Die Wechselwirkung zwischen dem Peptid **M220** und dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ ließ sich nur geringfügig durch das Peptid **P4** inhibieren. Selbst bei einer **P4**-Konzentration von 1 mM konnte das Resonanzsignal lediglich um 70 % reduziert werden. Dieses Resultat lässt sich vermutlich dadurch begründen, dass die Integrin-Bindungsepitope für das Peptid **M220** und für die RGD-Sequenz des Fibronectins im zehnten Typ III Motiv nicht identisch sind. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Mould *et al.* überein, die 1998 mithilfe monoklonaler Antikörper zeigten, dass beide Bindungsepitope zwar überlappen, aber nicht identisch sind. Somit kann das verwendete Peptid **M220** das Fibronectin in Bindungsstudien nicht ersetzen. Dennoch stellen die erzielten Ergebnisse wegen der hohen Spezifität des Peptids für das $\alpha_5\beta_1$ Integrin eine wichtige Ergänzung zu den Experimenten mit dem immobilisierten Fibronectin dar.

6.5 Analyse der Integrinexpression durch Reverse-Transkriptase-PCR

Wildtyp K562 Zellen können spontan in Vorläufer der Erythrozyten-, Granulozyten- und Monozyten-Serie differenzieren (Lozzio *et al.*, 1981). Darüber hinaus kann die Differenzierung in bestimmte Serien durch Reagenzien wie Butyrate und TPA begünstigt und induziert werden. (Andersson *et al.*, 1979; Tatteroo *et al.*, 1984). Da im Rahmen dieser Arbeit vorzugsweise mit TPA behandelte Zellen verwendet wurden, sollte überprüft werden, welchen Einfluss dieses Reagenz auf die Integrinexpression dieser Zellen hat. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Integrinexpression in Abhängigkeit von der Subkultivierungszahl der Zellen variiert.

Als Untersuchungsmethode wurde die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) verwendet, die eine Spezialform der 1987 von Mullis (Saiki *et al.*, 1988) entwickelten PCR darstellt und eine Amplifikation von spezifischen RNA-Sequenzen ermöglicht. Auf diese Weise kann eine mögliche Proteinexpression bereits auf dem mRNA-Niveau nachgewiesen werden. Die für die RT-PCR benötigte RNA wurde als Gesamt-RNA aus den K562 Zellen isoliert. Dazu wurde das Kit *NucleoSpin RNA II* verwendet, welches auf der Zelllysis durch chaotrope Salze und der RNA-Aufreinigung durch Bindung an eine Silikatmembran basiert.

Tab. 12: Ausbeuten der RNA-Isolierung.

Zelltyp	Ausbeute [μg]
10 X subkultiviert, ohne TPA	130
10 X subkultiviert, mit TPA	85
20 X subkultiviert, ohne TPA	60
20 X subkultiviert, mit TPA	141

2 μg der isolierten RNA wurden zur RT-PCR eingesetzt. Hierbei erfolgte zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese mit der RNA als Matrize. Als Primer für die Polymerasereaktion wurde ein Oligo(dT)-Primer verwendet, der im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisiert. Auf diese Weise wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Das Produkt wurde zur PCR eingesetzt.

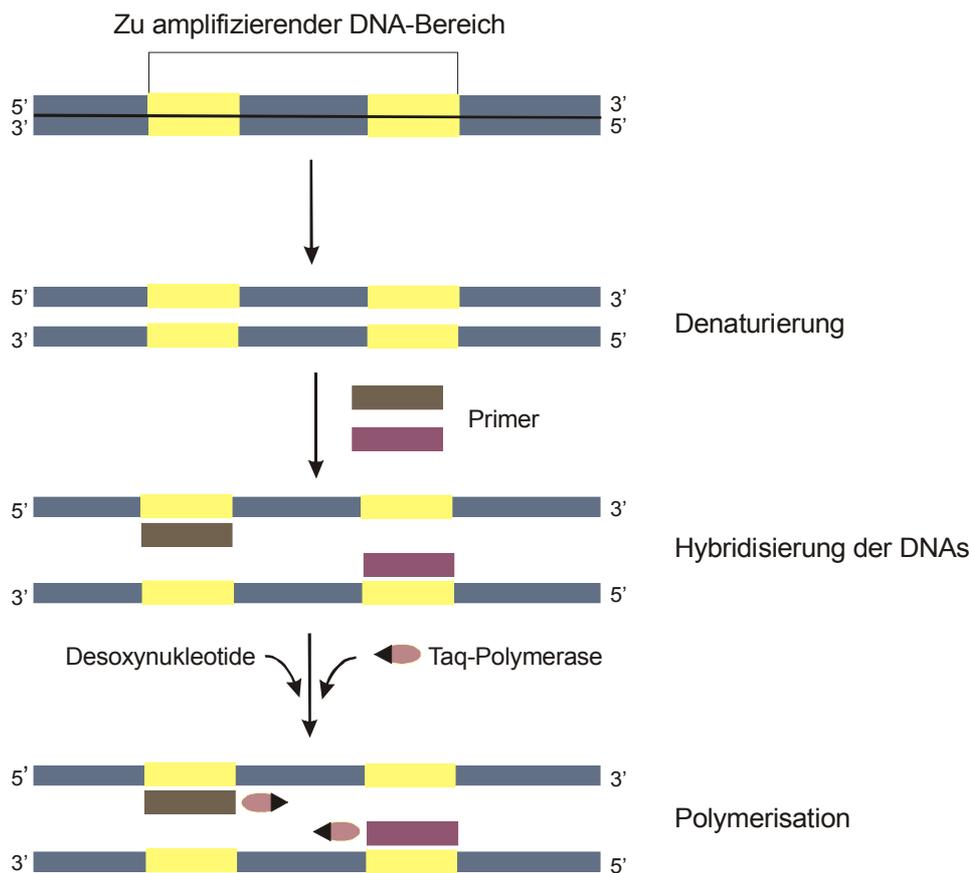


Abb. 45: Schematischer Verlauf der PCR.

Die Primer wurden unter Verwendung des Programms *Primer3* aus den DNA-Sequenzen der Integrin-Untereinheiten abgeleitet, wobei alle Fibronectin bindenden Integrine berücksichtigt wurden (Eble, 1997).

Für die PCR wurde eine Annealing-Temperatur von 5 °C unter der berechneten Schmelztemperatur gewählt, da bei dieser Temperatur Primer nur an ihre vollständig komplementäre Sequenz binden und Fehlpaarungen ausbleiben. Zur Kontrolle der PCR wurde ein Primerpaar verwendet, das an die DNA des humanen, ribosomalen Proteins L7 bindet. Um eine Verunreinigung der isolierten RNA mit DNA ausschließen zu können, wurde neben der cDNA auch isolierte RNA in der PCR eingesetzt.

Tab. 13: Größe der amplifizierten cDNA-Stücke.

Integrin-Untereinheit	Anzahl der Basenpaare (bp)
α_3	192
α_4	244
α_5	236
α_8	218
α_{IIb}	219
α_v	163
β_1	209
β_6	217

Nach der PCR wurden die Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mithilfe einer Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

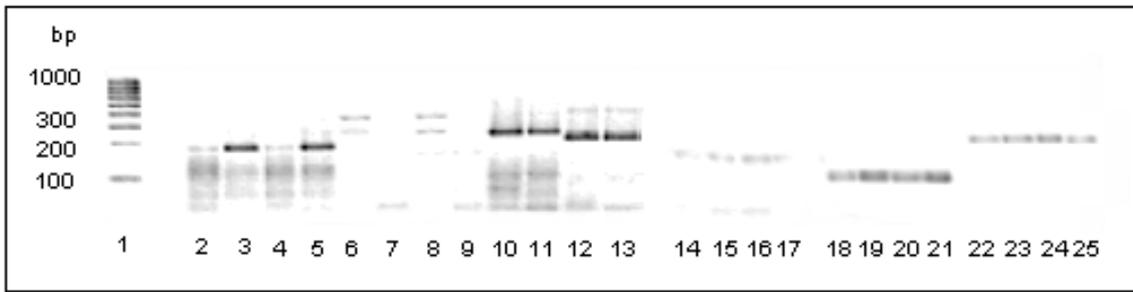


Abb. 46: Ergebnis der RT-PCR-Analyse. Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus den erhaltenen Agarosegelen nach der Färbung mit Ethidiumbromid. Zwecks besserer Visualisierung werden die Aufnahmen als Negative gezeigt. (1) Marker Hyper Ladder (IV), (2) α_3 K562 10 X ohne TPA, (3) α_3 K562 10 X mit TPA, (4) α_3 K562 20 X ohne TPA, (5) α_3 K562 20 X mit TPA, (6) α_4 K562 10 X ohne TPA, (7) α_4 K562 10 X mit TPA, (8) α_4 K562 20 X ohne TPA, (9) α_4 K562 20 X mit TPA, (10) α_5 K562 20 X ohne TPA, (11) α_5 K562 20 X mit TPA, (12) β_1 K562 20 X ohne TPA, (13) β_1 K562 20 X mit TPA, (14) α_{IIb} K562 10 X ohne TPA, (15) α_{IIb} K562 10 X mit TPA, (16) α_{IIb} K562 20 X ohne TPA, (17) α_{IIb} K562 20 X mit TPA, (18) α_v K562 10 X ohne TPA, (19) α_v K562 10 X mit TPA, (20) α_v K562 20 X ohne TPA, (21) α_v K562 20 X mit TPA, (22) L7 K562 10 X ohne TPA, (23) L7 K562 10 X mit TPA, (24) L7 K562 20 X ohne TPA, (25) L7 K562 20 X mit TPA.

Mittels der RT-PCR konnte die mRNA verschiedener Integrin-Untereinheiten nachgewiesen werden. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Analyse zusammengefasst. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich um eine semiquantitative Analyse handelte, sodass konkrete Aussagen über das Maß der Expression nicht möglich sind. Die in der Tabelle angegebenen Werte spiegeln lediglich Tendenzen wider.

Tab. 14: Auswertung der RT-PCR-Analyse. Die Ausprägung der Banden im Gel wird von stark (+++) bis nicht vorhanden (-) angegeben.

Integrin-Untereinheit	10 X ohne TPA	10 X mit TPA	20 X ohne TPA	20 X mit TPA
α_3	++	+++	++	+++
α_4	+	-	++	-
α_5	+++	+++	+++	+++
α_8	-	-	-	-
α_{IIb}	++	++	++	+
α_v	+++	+++	+++	+++
β_1	+++	+++	+++	+++
β_6	-	-	-	-

Die mRNAs der Untereinheiten α_5 , α_v und β_1 konnten bei allen Zelltypen in der gleichen Ausprägung detektiert werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Subkultivierungsstadien konnten nicht nachgewiesen werden. Der Phorbol ester TPA scheint lediglich auf die Expression der α_4 - und der α_3 -Untereinheit einen Einfluss zu haben, wobei die Expression der α_3 -Einheit verstärkt und die Expression der α_4 -Einheit vermindert wird. Im Fall der Untereinheiten α_8 und β_6 konnte keine mRNA nachgewiesen werden, was den Resultaten von Schnapp *et al.* (1995) und Breuss *et al.* (1993) entspricht.

Die vorgestellten Resultate führen zu der Vermutung, dass, die Wildtyp K562 Zellen neben dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin weitere Integrine exprimieren, die an Fibronectin binden.

6.6 Immunchemische Analyse der Integrinexpression

Da bereits auf der Ebene der Transkription die ersten Mechanismen zur Regulation der Genaktivität einsetzen, spiegelt das RNA-Niveau einer Zelle die Proteinexpression nicht 1:1 wider (Schrattenholz 2001).

Zur Absicherung der Ergebnisse der mRNA-Analyse wurde eine Western Blotting Analyse durchgeführt, welche direkt die Untersuchung der exprimierten Proteine ermöglicht. Für die Immundetektion der verschiedenen Integrin-Untereinheiten wurden entsprechende polyklonale Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden so ausgewählt, dass die an Fibronectin bindenden Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ detektiert werden konnten (Eble, 1997). Die ebenfalls an Fibronectin bindenden Integrine $\alpha_8\beta_3$ und $\alpha_v\beta_6$ wurden von der Analyse ausgenommen, da die zugehörige mRNA bei der RT-PCR nicht gefunden wurde und somit eine Expression auf Proteinebene ausgeschlossen ist.

Für die Analyse wurden Membranextrakte verwendet, die nach der modifizierten Belkin-Methode (Belkin *et al.*, 1990) präpariert wurden. Als Referenzen dienten die isolierten Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$, sowie Plazentaextrakt.



Abb. 47: Immunchemische Analyse der Integrinexpression. Die Abbildung zeigt einen Zusammenschnitt aus verschiedenen Western-Blots. Sie sind das Ergebnis der Western-Blotting-Analyse der K562 Membranextrakte gegen verschiedene Integrin-Untereinheiten. Die Rahmen umschließen die relevante Bande. (1) Marker SeeBlue® Plus2, (2) β_1 -Untereinheit, (3) β_3 -Untereinheit, (4) α_v -Untereinheit, (5) α_5 -Untereinheit, (6) α_{11b} -Untereinheit.

Auf den Western-Blots gegen die α_v -, die α_{11b} -, die α_5 -, die β_1 - und die β_3 -Untereinheit konnten die entsprechenden Banden eindeutig detektiert werden. Die Auswertung der Blots wurde durch die verwendeten Referenzproteine (die isolierten Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$) erleichtert, da die zugehörigen Banden eindeutig identifiziert werden konnten. Im Fall der α_3 -Untereinheit war die Zuordnung schwierig. Der Antikörper war sehr unspezifisch und detektierte neben der α_5 - und α_v -Untereinheit noch Fülle anderer Proteine. Die α_4 -Untereinheit konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Resultate dieser Analyse sprechen dafür, dass neben dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin noch weitere Integrine exprimiert werden. Durch die Kombination der detektierten Untereinheiten kommen hierfür die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$, und $\alpha_v\beta_3$ in Frage.

Um eventuelle Änderungen der Integrinexpression mit fortschreitender Subkultivierungszahl erfassen zu können, wurden zusätzlich Membranextrakte aus K562 Zellen in unterschiedlichen Subkultivierungsstadien analysiert. Die dabei erhaltenen Western Blots zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen sechsmal, zehnmal, neunzehnmal und zwanzigmal subkultivierten K562 Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass in diesem Subkultivierungsbereich die Integrinexpression der Zellen konstant ist. Für höhere Subkultivierungszahlen kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Integrinexpression durch Differenzierung der

Zellen ändert. Eine Ausdehnung der Analyse auf höher subkultivierte Zellen war nicht notwendig, weil in allen Experimenten nur Zellen mit einer Subkultivierungszahl von vier bis zwanzig eingesetzt wurden. In früheren Studien konnten bei der Kultivierung höher subkultivierter Zellen erhebliche Veränderungen im Wachstumsverhalten und der Zellmorphologie beobachtet werden, sodass sich die Einschränkung des Subkultivierungsbereichs als notwendig erwiesen hatte.

Der Einfluss des Phorbolesters TPA auf die Integrinexpression der K562 Zellen wurde durch eine Western Blotting Analyse mit Membranextrakten aus mit TPA behandelten und nicht behandelten K562 evaluiert.

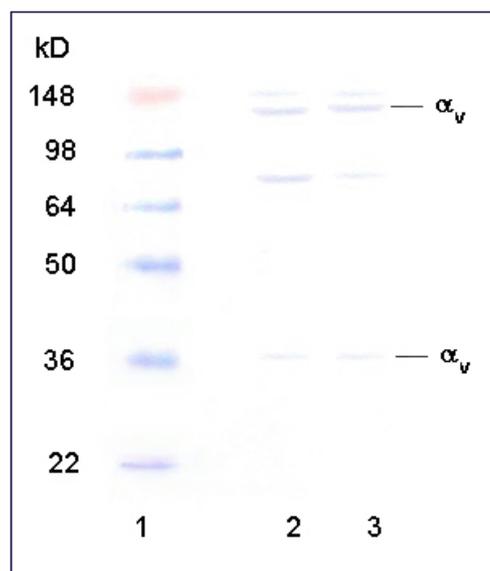


Abb. 48: Western-Blot verschiedener K562-Membranextrakte gegen α_v . (1) Marker See-Blue[®] Plus2, (2) ME K562 mit TPA, (3) ME K562 ohne TPA.

Die resultierenden Western-Blots deuten darauf hin, dass der Phorbol ester TPA keinen Einfluss auf die Integrinexpression der K562 Zellen hat.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse der Western-Blotting-Analyse zeigen, dass die K562 Zellen nicht nur das Integrin $\alpha_5\beta_1$ exprimieren. Damit konnten die Ergebnisse von Danen *et al.* (1995) nicht bestätigt werden, die 1995 mittels Durchflusszytometrie gezeigt hatten, dass die von ihnen verwendeten Wildtyp K562 ausschließlich das $\alpha_5\beta_1$ Integrin exprimieren.

Zur weiteren Fundierung der hier erzielten Ergebnisse könnte eine FACS-Analyse dienen, die zusätzlich eine Quantifizierung der exprimierten Integrine ermöglichen würde. Sollten sich die hier vorgestellten Ergebnisse durch eine weitergehende Analyse bestätigen, könnte die Zelllinie K562 nicht länger als Modellzelllinie zur Untersuchung der Interaktionen zwischen dem $\alpha_5\beta_1$ Integrin und Fibronectin dienen, da weitere Integrine exprimiert werden, die RGD abhängig an Fibronectin binden.

6.7 Mikrotiterplatten-basierter Integrin-Bindungstest

Mikrotiterplatten-basierte Integrin-Bindungstests sind für die Untersuchung von Integrin-Ligand-Interaktionen weitverbreitet (Smith, 2002). Ursprünglich wurde diese Testform von Nachmann und Leung für die Analyse des gereinigten $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrins entwickelt (Nachmann & Leung, 1982). Heute dienen diese Tests, ausgedehnt auf verschiedene Integrine und Liganden, unter anderem der Evaluierung von Bindungsparameter (Smith *et al.*, 1990; Scarborough *et al.*, 1991) und individuellen Integrin Domänen (Dickeson *et al.*, 1999).

6.7.1 Mikrotiterplatten-basierter $\alpha_5\beta_1$ Integrin-Bindungstest zur Evaluierung des inhibitorischen Potenzials cyclischer RGD-Peptide ²

Der durchgeführte Test basiert auf zwei Protokollen, die uns von Dr. Ulf Brüggemeier (Bayer AG) und Dr. Michael D. Pierschbacher (Integra LifeSciences Corp.) zur Verfügung gestellt worden sind. Beide Protokolle waren ursprünglich für das $\alpha_v\beta_3$ Integrin entwickelt worden und mussten hinsichtlich der Eigenschaften des $\alpha_5\beta_1$ Integrins modifiziert werden.

² Die Ergebnisse dieser Analyse wurden z. T. in der Diplomarbeit von L. Wobbe erzielt.

Bei den Modifikationen standen die verwendeten Puffer im Vordergrund, weil das Integrin $\alpha_5\beta_1$ unterschiedliche Bindungsstellen für Mangan-, Magnesium- und Calciumionen aufweist und demzufolge besondere Anforderungen an die Kombination und Konzentration dieser einzelnen Ionen stellt (Davis & Camarillo, 1993; Mould *et al.*, 1995a). So haben z. B. Studien von Mould *et al.* (Mould *et al.*, 1995a) gezeigt, dass Manganionen die Ligandenaffinität des Integrins stark erhöhen, während Magnesium- und Calciumionen nur zu einer geringen Erhöhung der Affinität führen (Mould *et al.*, 1995a). Ergänzend dazu wurde deutlich, dass eine hohe Calciumionen-Konzentration zu einer Inhibition der Integrin $\alpha_5\beta_1$ -Fibronectin-Interaktion führt (Mould *et al.*, 1995a).

In Abbildung 49 ist der schematische Ablauf des Tests dargestellt.

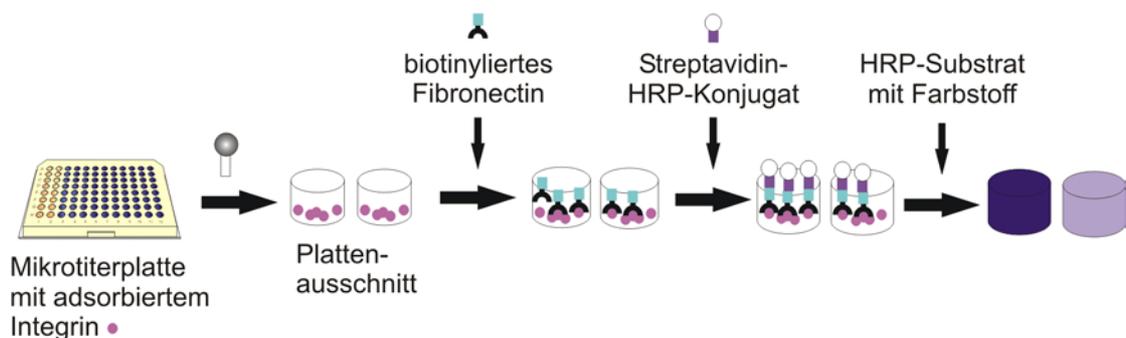
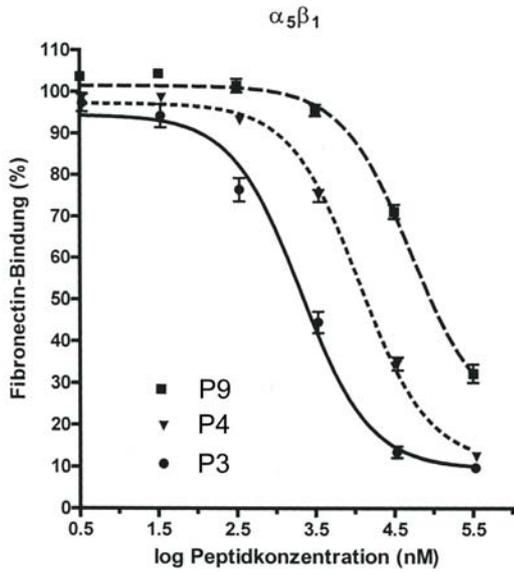


Abb. 49: Schematischer Ablauf des mikrotiterplatten-basierten Integrin-Bindungstests.

Eine Mikrotiterplatte wird mit dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ beschichtet. Anschließend werden das biotinylierte Fibronectin und die Peptidlösungen hinzugefügt. Das gebundene Fibronectin wird mit einem System bestehend aus einem Streptavidin-HRP-Konjugat und einem mit Farbstoff versehenen HRP-Substrat detektiert und visualisiert.

Eine Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit aufgereinigtem $\alpha_5\beta_1$ Integrin ($0.5 \mu\text{gml}^{-1}$) beschichtet. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Platte mit Rinderserumalbumin blockiert und die unterschiedlichen Peptidlösungen (Konzentrationsbereich: $0.002 \mu\text{gml}^{-1}$ bis $200 \mu\text{gml}^{-1}$) hinzugefügt. Nach Zugabe des biotinylierten Fibronectins ($5 \mu\text{gml}^{-1}$) wurde die Platte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde das gebundene Fibronectin mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat versetzt und durch die Zugabe des mit einem Farbstoff kombinierten HRP-Substrates visualisiert. Die Absorption der Proben bei 450 nm wird mithilfe eines Spektrometers bestimmt.



Peptid	IC ₅₀ -Wert [μM]
P1	11.0
P3	2.0
P4	0.6
P9	51.0
P11	130.0
M215	0.1

A

B

Abb. 50: Ergebnisse des mikrotiterplatten-basierten Tests für das Integrin α₅β₁. In (A) und (B) sind die Ergebnisse des Integrin-Bindungstests zusammengefasst. In den durchgeführten Tests wurden die Einflüsse verschiedener Peptide auf die Integrin-Fibronectin-Wechselwirkung untersucht. Jeder Test bestand aus einer Dreifachbestimmung und wurde dreimal durchgeführt. (A) Dosis-Antwort-Kurven für die Peptide P3, P4 und P9. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für alle neun Messwerte. (B) Ergebnistabelle mit IC₅₀-Werten. Die IC₅₀-Werte der Peptide wurden durch einen nichtlinearen (sigmoidalen) Fit der Messergebnisse bestimmt.

Die Tendenz der in diesem Test ermittelten IC₅₀-Werte stimmt mit der des Zelladhäsionstests überein. Allerdings sind im Durchschnitt kleiner als die mithilfe des Zelladhäsionstests ermittelten. Das lässt sich dadurch begründen, dass die mit Ganzzellsystemen bestimmte IC₅₀-Werte standardmäßig größer sind, was vermutlich mit der Anordnung und Konzentration der Rezeptoren auf der Zelloberfläche in Zusammenhang steht.

Die Peptide P3 und P4 gingen als aktivste Peptide aus diesem Test hervor. Ihre IC₅₀-Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie der des Referenzpeptids M215. Der Vergleich des IC₅₀-Wertes von P4 (c(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-β-Ala-)) mit dem von Pfaff *et al.* für das Peptid c(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Ala-) ermittelten Wert von 47 μM zeigt, dass der Ersatz von Alanin durch β-Alanin zu einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 80 führt. Eine Erklärung dafür ist, wie unter Kapitel 6.2.3 beschrieben, der Einfluss der β-Aminosäuren auf die Konformation des Peptids und damit auf die Repräsentation der RGD-Sequenz (Pfaff *et al.*, 1994).

Die Wirksamkeit des Peptids **P1** war um den Faktor 50 geringer als die der aktivsten Peptide. Der in diesem Test ermittelte IC_{50} -Wert von 11 μ M stimmt nicht genau mit dem von Pfaff *et al.* erzielten Wert von 6 μ M überein, liegt aber in der gleichen Größenordnung (Pfaff *et al.*, 1994). Die geringfügigen Abweichungen lassen sich auf Unterschiede in den Testsystemen zurückführen. Pfaff *et al.* hatten einerseits eine abweichende Fibronectinkonzentration verwendet und andererseits ein auf Antikörper basierendes Detektionssystem verwendet (Pfaff *et al.*, 1994).

Die Peptide **P9** und **P11** wiesen wie im Zelladhäsionstest nur geringe inhibitorische Eigenschaften auf. Vermutlich wird die RGD-Sequenz in beiden Fällen nicht in der für das Integrin $\alpha_5\beta_1$ bioaktiven Konformation präsentiert.

Die unterschiedlichen Aktivitäten der Peptide **P1** und **P9** sind, wie in Kapitel 6.2.3, beschrieben, auf die unterschiedlichen Strukturmerkmale von Cyclohexa- und Cyclopentapeptiden zurückzuführen, die zu einer abweichenden Präsentation der RGD-Sequenz führen.

7 Zusammenfassung

Integrine sind Zelloberflächenproteine, die in viele biologische Prozesse involviert sind. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sie sowohl an apathogenen, als auch an pathogenen Prozessen beteiligt sind. Bei der Interaktion zwischen den Integrinen und ihren Liganden spielt in vielen Fällen die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) eine entscheidende Rolle. Bei vielen Integrinliganden wie z. B. Fibronectin und Kollagen handelt es sich um Proteine der extrazellulären Matrix, die als zentrale Integrinerkennungssequenz die RGD-Sequenz tragen. Infolgedessen können Peptide, welche die RGD-Sequenz in der Form präsentieren, dass ihre Konformation der im natürlichen Liganden entspricht, als Integrin-Antagonisten fungieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Testsysteme etabliert, um den Einfluss cyclischer RGD-Peptide auf die Integrin-Ligand-Wechselwirkungen zu evaluieren. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Interaktion zwischen dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ und Fibronectin. Für die Untersuchung dieser speziellen Interaktion wurde die Zelllinie K562 ausgewählt. Diese Zellen exprimieren überwiegend das Integrin $\alpha_5\beta_1$ (Berry *et al.*, 2000) und gelten somit als Modellzelllinie für die Untersuchung dieser Interaktion.

In ersten Studien wurde die Durchflusszytometrie als Untersuchungsmethode eingesetzt. Da sich die von Suspensionszellen exprimierte Integrine häufig in einem schwach aktiven Zustand befinden, wurde in ersten Experimenten der Aktivitätsstatus des von den K562 Zellen exprimierte Integrins $\alpha_5\beta_1$ untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es in einem schwach aktiven Zustand exprimiert wird. Durch eine 18 stündige Inkubation der Zellen mit dem Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation mit Manganionen gelang die Aktivierung des Integrins. Dennoch konnte mithilfe der Durchflusszytometrie kein Testsystem etabliert werden, das es ermöglichte, das inhibitorische Potenzial der vorliegenden cyclischen RGD-Peptide zu untersuchen. Eine mögliche Ursache dafür schienen die unterschiedlichen Bindungs epitope für den Antikörper 3S3 und die RGD-Sequenz zu sein.

Als zweite Testmethode wurde ein Zelladhäsionstest gewählt. Diese Testart wird seit 1985 eingesetzt um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen (Koda *et al.*, 1985). Erste Studien zur Aktivierung des Integrins $\alpha_5\beta_1$ zeigten, dass bei diesem Test ebenfalls mehrere Schritte notwendig sind, um das Integrin in einen für die Ligandenbindung optimalen Aktivierungszu-

stand zu bringen. Die Aktivierungsreagenzien Phorbol-12-myristat-13-acetat und Manganionen erwiesen sich für dieses System ebenfalls als geeignet, wurden aber um den aktivierenden Antikörper TS2/16 erweitert. Diese drei Reagenzien scheinen sich optimal zu ergänzen, was auf ihre unterschiedlichen Wirkungsmechanismen zurückzuführen ist.

Auf dem aktivierten Integrin basierend, gelang es, einen Zelladhäsionstest zu etablieren, mit dem das effektive *Screening* von cyclischen RGD-Peptiden bezüglich ihres Einflusses auf die Interaktion zwischen dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ und Fibronectin möglich ist. Aus diesem Test gingen die Peptide c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- β -Leu-), c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- β -Ala-) und c-(-Arg-Gly-Asp-D- β -Phe-Val-) als effektive Antagonisten hervor. Ihre IC_{50} -Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die literaturbekannter Peptide mit der Kernsequenz [-c-(Cys^[S-S]-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys^[S-S]-)]. Diese Peptide wurden von Koivunen et al. mithilfe einer CX₇C Phagenbibliothek identifiziert (Koivunen et al., 1994) und gelten als RGD-unabhängige, selektive $\alpha_5\beta_1$ Antagonisten.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen stellt die Oberflächenplasmonresonanz dar. Sie lässt die Analyse der Wechselwirkung in einem dynamischen System zu und ermöglicht so detailliertere Einblicke in das Bindungssystem. Auf Grundlage dieser Methode sollten weitere Testsysteme zur Untersuchung der cyclischen RGD-Peptide etabliert werden. In ersten Studien wurden intakte K562 Zellen über einen mit Fibronectin derivatisierten Sensorchip geleitet. Dabei konnte zwar eine spezifische Interaktion nachgewiesen werden, aber die Reproduzierbarkeit der Messungen war zu gering, um ein Testsystem zu entwickeln, das aussagekräftige Ergebnisse liefert. Die Hauptursache für dieses Resultat ist in der Größe der Zellen zu sehen. Bei einem Durchmesser von 20 μm reicht nur ein Bruchteil ihrer Oberfläche in den 0.3 μm großen Messbereich des BIACORE-Gerätes. Auch Sensorchips mit gekürzter oder fehlender Dextranmatrix konnten keine zufrieden stellenden Ergebnisse liefern.

Um tiefere Einblicke in die Integrin-Fibronectin-Wechselwirkung zu erhalten, wurde das Integrin in Membranextrakten aus K562 Zellen angereichert. Dabei kamen verschiedene Protokolle zum Einsatz und wurden bezüglich ihrer Effektivität verglichen. Es stellte sich heraus, dass natives Integrin nur dann erhalten werden kann, wenn der Zellaufschluss mithilfe von Detergenzien erfolgt. Der Zellaufschluss mittels Ultraschall erwies sich als ungeeignet. Darüber hinaus wirkt sich die Abtrennung peripherer Membranproteine positiv auf die Lagerfähigkeit und Gesamtqualität der Extrakte aus.

Grundsätzlich ist die Bestimmung von Einzelproteinkonzentrationen in Proteingemischen schwierig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Verfahren zur Quantifizierung des $\alpha_5\beta_1$ Integrins in Membranextrakten herangezogen. Gemäß der Methode nach Bhowan und Bennett wurde der Membranextrakt einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen, die Integrinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine eluiert (Bhowan & Bennett, 1983). Mittels eines BCA-Tests wurde die Proteinkonzentration in den Eluatn bestimmt. Als Ergänzung zu dieser Methode wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der neben den Membranextrakten unterschiedlich konzentrierte Rinderserumalbuminlösungen aufgetragen wurden. Nach der Visualisierung der Proteinbanden ließ sich die entsprechende Konzentration halb quantitativ über die Bandenintensität bestimmen. Beide Methoden ergaben, dass der Integrinanteil in den Membranextrakten 10 % der Gesamtproteinmenge entspricht. Aufgrund dieses Ergebnisses bestand in den folgenden Experimenten die Möglichkeit, die in den Extrakten enthaltene Integrinmenge aus der Gesamtproteinmenge zu bestimmen, ohne aufwendige Experimente durchzuführen.

Die Membranextrakte wurden bei Oberflächenplasmonresonanz-Messungen eingesetzt. Die Resultate der Bindungsstudien ergaben, dass die aus den K562 Zellen gewonnenen Membranextrakte spezifisch und konzentrationsabhängig an das Fibronectin binden.

Zur Untersuchung des inhibitorischen Potenzials der RGD-Peptide wurden Kompetitionsexperimente in Lösung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich die im Allgemeinen für die Herstellung von Membranextrakten verwendete Triton X-100-Konzentration von 0.5 % störend auf die Messung auswirkt. Die resultierenden Sensorgramme deuteten auf eine Interaktion zwischen den Peptiden und dem Detergens hin. Bei einer Reduzierung der Triton X-100-Konzentration um den Faktor 4 gelang die Inhibition von $\alpha_5\beta_1$ durch das aus dem Zelladhäsionstest als effektiver Antagonist hervorgegangene Peptid c(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- β -Ala-) (**P4**). Für die Peptide c(-Arg-Gly-Asp-D- β -Phe-Val-) (**P5**) und c(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Gly-) (**P9**) konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.

Das Detergens Octyl- β -D-glucopyranosid wird wie Triton X-100 häufig zur Präparation von Membranextrakten und zur Integrinisolierung angewendet. Unter Verwendung dieses Detergens wurden Membranextrakte aus K562 Zellen hergestellt und für Bindungsstudien an immobilisiertem Fibronectin eingesetzt. Dabei deuteten die resultierenden Sensorgramme darauf hin, dass Octyl- β -D-glucopyranosid einen negativen Einfluss auf das immobilisierte Fibronectin ausübt und ihm in den verwendeten Konzentrationen jegliche Interaktionsfähigkeit nimmt.

Eine mögliche Lösung für dieses Problem stellt die Verwendung von rekombinantem, löslichem $\alpha_5\beta_1$ Integrin dar (Stephens *et al.*, 2000). Diese Form des Integrins benötigt für den Erhalt seines nativen Zustandes kein Detergens und weist die gleichen Bindungseigenschaften wie der natürliche Rezeptor auf (Coe *et al.*, 2001).

Alternativ zu den Konkurrenzexperimenten in Lösung wurden kompetitive Elutionsexperimente durchgeführt. Dabei wurde an immobilisiertem Fibronectin gebundener Membranextrakt durch verschiedene Peptidlösungen eluiert. Die Elutionsfähigkeit der Peptide erlaubt ebenfalls einen Rückschluss auf die Affinität der Peptide zum Integrin (Markgren *et al.*, 2000). Mittels dieser Experimente konnten die Ergebnisse des Zelladhäsionstests bestätigt werden. Somit stellen kompetitive Elutionsexperimente eine sinnvolle Ergänzung zum Zelladhäsionstest dar, weil die betreffende Interaktion im Fall der Oberflächenplasmonresonanz in einem dynamischen System untersucht wird. Darüber hinaus haben die auf der Oberflächenplasmonresonanz basierenden Experimente den Vorteil, dass sie einen detaillierteren Einblick in die Integrin-Fibronectin-Interaktion ermöglichen, ohne dass der Rezeptor vollständig aufgereinigt werden muss.

In weiteren SPR-Studien wurde das Peptid Ac-Gly-Ala-c-(Cys^[S-S]-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys^[S-S])-Gly-Ala-O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂-NH₂ auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Dieses Peptid wurde zuvor bereits verwendet, um das Integrin $\alpha_5\beta_1$ mittels Affinitätschromatografie aufzureinigen.³ Um zur Säulenmatrix analoge Interaktionsbedingungen zu schaffen, wurde am CM5 Chip eine zweiphasige Immobilisierung durchgeführt. In der ersten Phase wurde 6-Aminohexansäure als *Spacer* an den Chip immobilisiert und in der zweiten Phase wurde das Peptid an den *Spacer* gebunden. Bei der so derivatisierten Sensorchipoberfläche konnte eine konzentrationsabhängige Interaktion zwischen dem immobilisierten Peptid und dem Membranextrakt detektiert werden.

Durch Konkurrenzexperimente in Lösung mit dem Peptid c(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- β -Ala-) konnten die Ergebnisse von Mould *et al.* (1998) bestätigt werden, die mithilfe monoklonaler Antikörper gezeigt hatten, dass die Bindungs epitope für die Sequenz [-c-(Cys^[S-S]-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys^[S-S])-] und die RGD-Sequenz zwar überlappen aber nicht identisch sind. Folglich stellt das Peptid Ac-Gly-Ala-c-(Cys^[S-S]-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys^[S-S])-Gly-Ala-O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂-NH₂ in Interaktionsstudien keine Alternative zum labilen Fibronectin dar. Dennoch kann es aufgrund seiner hohen Spezifität bei Experimenten mit Membranextrakten eine wichtige Ergänzung darstellen.

³ Im Rahmen dieser Arbeit betreute Diplomarbeit von L. Wobbe.

Als weiteres Testsystem wurde ein mikrotiterplatten-basierter Integrin-Bindungstest verwendet. Die Grundlage dieses Tests bildeten Protokolle, die von Dr. Ulf Brüggemeier (Bayer AG) und Dr. Michael D. Pierschbacher (Integra LifeSciences Corp.) zur Verfügung gestellt worden sind. Beide Protokolle waren ursprünglich für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ entwickelt worden und wurden für das Integrin $\alpha_5\beta_1$ modifiziert. Die Tatsache, dass für diesen Test der isolierte Rezeptor benötigt wird, stellte anfänglich ein großes Hindernis dar. Das kommerziell erworbene $\alpha_5\beta_1$ Integrin war von wechselnder Qualität und wurde mehrfach in nicht nativer Form geliefert, sodass erst die eigenständige Isolierung des Rezeptors aus Plazenta Abhilfe schuf.⁴ Letztendlich konnte ein mikrotiterplatten-basierter Integrin-Bindungstest etabliert werden, der reproduzierbare Ergebnisse liefert. Darüber hinaus zeigt der für das Peptid c(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) ermittelte IC_{50} -Wert eine gute Übereinstimmung mit entsprechenden Literaturwerten, was für die Zuverlässigkeit des Testes spricht. In Hinblick auf das inhibitorische Potenzial der cyclischen RGD-Peptide bestätigten die Resultate des Testes die Ergebnisse des Zelladhäsionstests.

Eine Charakterisierung der K562 Zellen bezüglich der Integrinexpression sollte die Arbeit abrunden und die erzielten Ergebnisse absichern. Dabei stand zunächst die Untersuchung der Integrinexpression auf mRNA-Niveau im Vordergrund. Bei der Analyse wurden überwiegend die Integrine berücksichtigt, die Fibronectin als Liganden besitzen. Ausgehend von den entsprechenden DNA-Sequenzen wurden Primer ausgewählt und in einer Reversen-Transkriptase-PCR eingesetzt. Das Ergebnis der PCR zeigte, dass die von uns verwendeten K562 Zellen nicht nur die mRNAs der α_5 - und der β_1 -Untereinheit, sondern zusätzlich die der α_4 -, der α_3 -, der α_{11b} -, und der α_v -Untereinheit aufweisen. In Folgeexperimenten wurden zudem die mRNA-Pools von Zellen unterschiedlicher Subkultivierungsstadien und die mRNA-Pools von mit Phorbol-12-myristat-13-acetat behandelten und nicht behandelten K562 Zellen miteinander verglichen. Dabei konnte zwischen zehn- und zwanzigmal subkultivierten Zellen kein Unterschied bezüglich der Integrinexpression beobachtet werden. Der Einfluss des Phorbolesters auf die Integrinexpression scheint ebenfalls gering zu sein. Lediglich die Expression der α_4 - und der α_3 -Untereinheit zeigten eine Abweichung, wobei die Expression der α_3 -Einheit verstärkt und die Expression der α_4 -Einheit vermindert wurde. Bei diesen Ergebnissen ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich bei der durchgeführten PCR lediglich um eine halb quantitative PCR handelte, deren Ergebnisse lediglich Tendenzen

⁴ Der Rezeptor wurde von Lutz Wobbe während seiner Diplomarbeit isoliert.

widerspiegeln. Zu Absicherung der Resultate sollte eine quantitative PCR durchgeführt werden.

Ergänzend zu der molekularbiologischen Untersuchung der Integrinexpression wurde eine immunchemische Analyse auf Proteinniveau durchgeführt. Bei der Western-Blotting-Analyse wurden Antikörper eingesetzt, die gegen verschiedene Integrin-Untereinheiten gerichtet sind. Dabei stellte sich heraus, dass die von uns verwendeten K562 Zellen neben dem Integrin $\alpha_5\beta_1$ Integrin noch weitere Fibronectin-Rezeptoren exprimieren. Zur Quantifizierung der exprimierten Integrin könnte eine ergänzende FACS-Analyse durchgeführt werden.

Weitere Western-Blotting-Analysen bezüglich des Einflusses von Phorbol-12-myristat-13-acetat und der Subkultivierungszahl der K562 Zellen bestätigten die Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse. Es konnte weder im Fall der evaluierten Konzentrationen, noch der untersuchten Subkultivierungsstadien ein Unterschied in der Integrinexpression beobachtet werden.

8 Literaturverzeichnis

- S. K. Akiyama, S. S. Yamada, W. T. Chen et al., *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 863-875.
- D. C. Altieri, *J. Immunol.* **1991**, *147*, 1891-1898.
- H. Altroff, C. F. van Der Walle, J. Asselin, R. Fairless, I. D. Campbell, H. J. Mardon, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38885-38892.
- H. Altroff, L. Choulier, H. J. Mardon, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 491-497.
- L. C. Andersson, M. Jokinen, C. G. Gahmberg, *Nature* **1979**, *278*, 364-365.
- S-I. Aota, M. Nomizu, K. M. Yamada, *J. Cell Biol.* **1994**, *269*, 24756-24761.
- W. S. Argraves et al., *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12922-12924.
- M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50-54.
- M. Bader in *Handbuch der molekularen Medizin*, 1. Auflage (Hrsg. D. Ganten und K. Ruckpaul), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **1997**, S. 3-50.
- C. L. Baird, D. G. Myska, *J. Mol. Recogn.* **2001**, *14*, 261-268.
- S. T. Barry, S. B. Ludbrock, E. Murrison, C. M. T. Horgan, *Biochemical and Biophysical Research Communication* **2000**, *267*, 764-769.
- J. S. Bauer, C. L. Schreiner, F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, R. L. Juliano, *J. Cell Biol.* **1992**, *116*, 477-487.
- W. Belkin, A. Belkin, E. Koteliansky, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 2159-2170.
- A. S. Bhowan, J. C. Bennett, , *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 450-455.
- D.M. Bollag, M. D. Rozycki, S. J. Edelstein, *Protein Methods*, 2. Auflage, A. John Wiley & Sons, New York – Chichester – Brisbane – Toronto - Singapore, **1996**.
- P. Böck (Hrsg.), *Romeis Mikroskopische Technik*, Urban & Schwarzenberger, München – Wien - Baltimore, **1989**.
- P. Bork, T. Doerks, T. A. Springer, B. Snel, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 261-263.
- J. A. Brand, V. C. W. Tsang, W. Zhou, S. B. Shukla, *BioTechniques* **1990**, *8*, 58-60.
- J. M. Breuss, N. Gillet, L. Lu et al., *J. Histochem. Cytochem.* **1993**, *41*, 1521-1527.

- A. Burke-Gaffney, K. Blease, A. Hartnell, P. G. Hellewell, *J. Immunol.* **2002**, *168*, 1380-1388.
- P. M. Cardarelli, T. J. Lobl in *Leukocyte Recruitment in Inflammatory Disease*, 1. Auflage (Hrsg. G. Peltz), Springer-Verlag, Heidelberg, **1996**, S. 275-294 .
- A. Carrel, *J. Exp. Med.* **1912**, *15*, 516-528.
- R. C. Casey, K. M. Burlison, K. M. Skubitz, S. E. Pambuccian, T. R. Oegema, L. E. Ruff, A. P. N. Skubitz, *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 2071-2080.
- A. P. F. Coe, J. A. Askari, A. D. Kline, M. K. Robinson, H. Kirby, P. E. Stephens, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35854-35866.
- V. Copie, Y. Tomita, S. K. Akiyama, S. Aota, K. M. Yamada, R. M. Venable, R. W. Pastor, S. Krueger, D. A. Torchia, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 663-682.
- W. S. Craig, S. Cheng, D. G. Mullen, J. Blevitt, M. D. Pierschbacher, *Biopolymers* **1995**, *37*, 157-175.
- G. P. Curley, H. Blum, M. J. Humphries, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 427-441.
- E. H. Danen, S. Aota, A. A. van Kraats, K. M. Kenneth, M. Yamada, D. J. Ruiter, G. N. P. van Muijen, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21612-21618.
- G. E. Davis, C. W. Camarillo, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 7138-7150.
- A. De Arcangelis, E. Georges-Labouesse, *Trends Genet.* **2000**, *16*, 389-395.
- J. M. de Pereda, G. Wiche, R. C. Liddington, *EMBO J.* **1999**, *18*, 4087-4095.
- M. S. Diamond, J. Gracia-Aguilar, J. K. Bickford, A. L. Corbi, T. A. Springer, *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 1031-1043.
- S. K. Dickeson, N. L. Mathis, M. Rahman, J. M. Bergelson, S. A. Santoro, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32182-32191.
- C. D. Dickinson, B. Veerapandain, X-P. Da et al., *J. Mol. Biol.* **1994**, 1079-1092.
- I. Dransfield, C. Cabanas, A. Craig et al., *J. Cell Biol.* **1992**, *147*, 219-226.
- J. A. Eble in *Integrins - A Versatile and OLD Family of Cell Adhesion Molecules in Integrin-Ligand Interaktion* (Hrsg. J. A. Eble und K. Kühn), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, S. 1-39.
- J. A. Eble, F. Berditchevski, *Methods Cell Biol.* **2002**, *69*, 223-246.
- D. Egger, K. Bienz, *Mol. Biotechnol.* **1994**, *1*, 289-305.
- C. S. Elangbam, C. W. Qualls JR., R. R. Dahlgren, *Vet. Pathol.* **1997**, *34*, 61-73.

- J. R. Feramisco, K. Burridge, *J. Biol. Chem.* **1979**, *255*, 1194-1199.
- C. Fernandez, K. Clark, L. Burrows, N. R. Schofield, M. J. Humphries, *Frontiers in Bioscience* **1998**, *3*, 684-700.
- R. I. Freshney (Hrsg.), *Animal cell culture, a practical approach. The practical approach series*, 2. Auflage, IRL Press, Oxford, **1992**.
- R. Garcia-Vicuna, A. Humbria, A. A. Postigo, C. Lopez-Elzaurdia, M. O. deLandazuri, F. Sanchez-Madrid, A. Laffon, *Clin. exp. Immunol.* **1992**, *88*, 435-441.
- E. L. George, E. N. Georges-Labouess, R. S. Patel-King, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Development* **1993**, *119*, 1079-1091.
- F. G. Giancotti, E. Rouslahti, *Science* **1999**, *285*, 1028-1032.
- C. Gimond, A. Sonnenberg in *Activation States of Integrins in Integrin-Ligand Interaction* (Hrsg. J. A. Eble und K. Kühn), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, S. 219-239.
- M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-921.
- E. Harlowe, D. Lane (Hrsg.), *Antibodies, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, **1988**, S. 471-510.
- R. Haubner, M. Gurrath, G. Müller, M. Aumailley, H. Kessler in *Prospects in Diagnosis and Treatment of Breast Cancer*, Excerpta Medica International Congress Series (Hrsg. M. Schmitt, H. Greaff, G. Kindermann) Elsevier, Amsterdam, **1994**, S. 133-144.
- R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440-1456.
- A. Hautanen, J. Gailit, D. M. Mann, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1437-1442.
- L. Hayflick, P. S. Moorhead, *Exp. Cell Res.* **1961**, *25*, 585-621.
- J. Homola, *Ana. Bioana. Chem.* **2003**, *3*, 528-539.
- A. Horwitz, K. Duggan, R. Greggs et al., *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 2134-2144.
- A. Huber, S. Demartis, D. Neri, : *Mol. Recogn.* **1999**, *12*, 198-216.
- P. E. Hughes, M. Pfaff, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 359-364.
- M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Tans.* **2000**, *28*, 311-339.
- R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673-687.
- R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- M. Jondal, H. Pross, *Int. J. Cancer* **1975**, *15*, 596-605.

- U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfås, B. Persson, H. Roos, I. Ronnberg, *Biotechniques* **1991**, *11*, 61-70.
- T. Kelly, L. Molony, K. Burrige, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17189-17198.
- J. E. Koda, A. Rapraeger, M. Bernfield, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 8157-8162.
- H. P. Koeffler, D. W. Golde, *Blood* **1980**, *56*, 344-350.
- E. Koivunen, B. Wang, E. Rouslahti, *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 373-380.
- V. E. Koteliansky, G. N. Gneushev, A. M. Belkin, *FEBS Lett.* **1985**, *182*, 67-72.
- G. Krauss, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- A. L. Lasky, *Science* **1992**, *258*, 964-969.
- J.-O. Lee, P. Rieu, M. A. Anaout, R. Liddington, *Cell* **1995**, *80*, 631-638.
- T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin-Heidelberg, **2000**.
- H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Masudiana, D. Baltimore, J. E. Darnell, *Molekulare Zellbiologie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, **2001**.
- C. B. Lozzio, B. B. Lozzio, *Blood* **1975**, *45*, 321.
- B. B. Lozzio, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1981**, *166*, 546-550.
- C. Lu, C. Oxivg, T. A. Springer, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15138-15147.
- A. L. Main, T. S. Harvey, M. Baron et al., *Cell* **1992**, *71*, 671-678.
- M. Malmqvist, *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, *27*, 335-340.
- P.-O. Markgren, M. Hämäläinen, U. H. Danielson, *Anal. Biochem.* **2000**, *279*, 71-78.
- C. R. Merrill, D. Goldman, S. A. Sedman, J. H. Ebert, *Science* **1981**, *211*, 1437-1438.
- M. Michishita, V. Videm, M. A. Arnaout, *Cell* **1993**, *72*, 857-867.
- F. Mitjans, D. Sander, J. Adán, A. Sutter, J. M. Matinez, C.-S. Jäggle, J. M. Moyano, H.-G. Kreyisch, J. Piulats, S. L. Goodman, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 2825.
- M. F. Molloy, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 701-704.
- A. P. Mould, S. K. Akiyama, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1995a**, *270*, 26270-26277.

- A. P. Mould, A. N. Garratt, J. A. Askari et al., *FEBS Lett.* **1995b**, 363, 118-122.
- A. P. Mould, L. Burrows, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 25664-25672.
- A. Müller, F. Schumann, M. Kokschi, N. Sewald, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, 4, 275-281.
- A. Müller, Dissertation Universität Leipzig, **1999**.
- K. Müller, D. Obrecht, A. Knierzinger, Ch. Stankovic, C. Spiegler, W. Bannwarth et al., *Approaches in Lead Finding and Lead Optimization*, Hoffmann-La Roche, Basel, **1992**, S. 513-531.
- R. L. Nachmann, L. L. Leung, *J. Clin. Invest.* **1982**, 69, 263-269.
- D. Nath, M. Siocombe, P. E. Stephens, S. Warn, G. R. Hutchinson, K. M. Yamada, A. J. P. Docherty, G. Murphy, *J. Cell Biol.* **1999**, 112, 579-587.
- Y. Nishizuka, *Nature* **1984**, 308, 693-698.
- Y. Nishizuka, *Nature* **1988**, 334, 661-665.
- M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20233-20238.
- M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, 309, 30-33.
- R. Pigott, C. Power, *The Adhesion Molecules FactsBook*, Academic Press, London - New York - Tokyo, **1994**.
- E. F. Plow, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. A. Marguerie, M. H. Ginsberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 8057-8061.
- C. P. Ponting, J. Schultz, R. R. Copley, M. A. Andrade, P. Bork, *Adv. Protein Chem.* **2000**, 54, 185-244.
- R. Pytela, M. D. Pierschbacher, W. S. Argraves, S. Suzuki, E. Ruoslahti, *Methods Enzymol.* **1987**, 144, 475-489.
- J. G. Quinn, S. O'Neill, A. Doyle, C. McAtamney, D. Diamond, B. D. MacCraith, R. O'Kennedy, *Anal. Biochem.* **2000**, 281, 135-143.
- H. Rehm, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin, **2000**.
- R. L. Rich, D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 54-61.
- E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, 238, 491-497.
- E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1996**, 12, 697-715.

- R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, 239, 487-491.
- O. Salinovich, R. C. Montelaro, *Anal. Biochem.* **1986**, 156, 341-347.
- R.M. Scarborough, J. W. Rose, M. A. Hsu, D. R. Phillips, V. A. Fried, A. M. Campbell, L. Nannizzi, i. F. Charo, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 9359-9362.
- P. Schaffner, M. M. Dard, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, 60, 119-132.
- L. Schnapp, J. Breuss, D. Ramos et al., *J. Cell Sci.* **1995**, 108, 537-544.
- A. Schrattenholz (Hrsg.), *Molekulare Analyse der Proteinexpression*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin - Heidelberg, **2001**.
- F. Schumann, Dissertation Universität Leipzig, **1999**.
- F. Schumann, A. Müller, M. Koks, G. Müller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12009-12010.
- M. A. Schwartz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7849-7853.
- M. A. Schwartz, M. H. Ginsberg, *Nat. Cell Biol.* **2002**, 4, E65-E68.
- N. Sewald, D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- N. Sewald, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **2002**, 50, 449-453.
- D. Sheppard, *Matrix Biol.* **2000**, 19, 203-209.
- Y. Shimizu, G. A. Van Seventer, K. J. Horgan, S. Shaw, *Nature* **1990**, 345, 250-253
- S. Sjölander, C. Urbaniczky, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2338-2345.
- J. W. Smith, D. A. Cheres, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 2168-2172.
- J. W. Smith, *Methods Cell Biol.* **2002**, 69, 247-259.
- P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, 150, 76-85.
- R. C. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 17703.
- E. Squillante, *Drug Devl. Ind. Pharma.* **1998**, 24, 1163-1175.
- E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. J. Urbaniczky, *Colloid and Interface Science* **1991**, 143, 513-526.

- P. E. Stephens, S. Ortlepp, V. C. Perkins, M. K. Robinson, H. Kirby, *Cell. Adhes. Commun.* **2000**, *7*, 377-390.
- J. Takagi, N. Beglova, P. Yalamanchili, S. C. Blacklow, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11175-11180.
- J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, T. A. Springer, *Cell* **2002**, *110*, 599-611.
- J. Takagi, T. A. Springer, *Immunological Reviews* **2002**, *186*, 141-163.
- J. Takagi, K. Strokovich, T. A. Springer, T. Walz, *EMBO J.* **2003**, *22*, 4607-4615.
- M. Takeichi, *Science* **1991**, *251*, 1451-1455.
- J. W. Tamkun, D. W. DeSimone, D. Fonda et al., *Cell* **1986**, *46*, 271-282.
- N. Tani, S. Higashiyama, N. Kawaguchi, J. Madarame, I. Ota, Y. Ito, Y. Ohoka, S. Shiosaka, Y. Takada, N. Matsuura, *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 327-333.
- P. A. Tatteroo, F. Massaro, A. Mulder, R. Schreuder-van Gelder, A. A. Von dem Borne, *Leuk. Res.* **1984**, *8*, 197-206.
- H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1989**, *27*, 495-501.
- L. Turner, S. G. Ward, J. Westwick, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 2437-2444.
- C. Vargas, A. G. McEwan, J. A. Downie, *J. Clin. Microbiol.* **1993**, *209*, 323-326.
- T. Weimar, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1271-1274.
- W. H. West et al., *J. Immunol.* **1977**, *118*, 355-361.
- A. F. Williams, *Immunol. Today* **1987**, *8*, 298-303.
- S. Winkle, *Mikrobiologische und serologische Diagnostik: mit Berücksichtigung der Pathogenese und Epidemiologie*, Urban & Fischer, München, **1979**.
- A. Wobus in *Handbuch der molekularen Medizin*, 1. Auflage (Hrsg. D. Ganten und K. Ruckpaul), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **1997**, S. 305-337.
- J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, *Science* **2001**, *294*, 339-345.
- K. M. Yamada, D. W. Kennedy, *J. Cell Physiol.* **1987**, *130*, 21-28.
- J. T. Yang, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Development* **1993**, *119*, 1093-1105.
- Z. Zhang, A. O. Morla, K. Vuori, J. S. Bauer, R. L. Juliano, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1993**, *122*, 235-242.