

# Wechselwirkung der Integrine mit chemisch modifizierten Peptiden

**Dissertation**

**Sylwia Urman**



# Wechselwirkung der Integrine mit chemisch modifizierten Peptiden

Der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld vorgelegte

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

*(Doctor rerum naturalium)*

**Sylwia Urman**

Bielefeld, Februar 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Sewald
  2. Gutachter: Prof. Dr. G. Fischer von Mollard
- Eingereicht: 20. Februar 2007

Moim Rodzicom

(für meine Eltern)

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald in der Arbeitsgruppe Organische und Bioorganische Chemie an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald danke ich für das interessante Thema und seine fortwährende Unterstützung. Seine Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen ermöglichten die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Frey danke ich für viele wertvolle Ratschläge, die Möglichkeit der Durchführung von FACS-Experimenten mit hADAM8 und die Überlassung des Proteinmaterials und der Zelllinien.

Bei Herrn Dr. Hamed Al-Riyami bedanke ich mich für die Hilfe bei FACS-Experimenten, die Aufreinigung von hADAM8 und freundliche Zusammenarbeit während des Kooperationsprojektes am hADAM8 Protein.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Steffen Backert und Frau Dr. Terry Kwok für die fachlichen Diskussionen und erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen des Forschungsprojektes am bakteriellen CagL Protein sowie für die Überlassung von Proteinmaterial.

Herrn Prof. Dr. Oliver Reiser und Frau Dr. Silvia De Pol möchte ich für die wissenschaftliche Zusammenarbeit an dem Forschungsprojekt mit RGD-Peptiden und die Synthese des  $\beta$ Acc-Dipeptides danken.

Frau Dr. Katherina Sewald danke ich für die ständige Bereitschaft zur Diskussion im Verlauf dieser Arbeit, die vielen wertvollen Anregungen sowie für die Korrektur von Teilen dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Martina Brecht für die Hilfe bei der Durchführung von Klonierungsexperimenten sowie für ihre Freundschaft, ihr Verständnis und ihre stetige Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Herren Dr. Miroslav Malešević, Dr. Ulf Strijowski, Yi Yang und Marco Wißbrock für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide bedanken.

Für die Konformationsanalyse der untersuchten Peptide danke ich Frau Katharina Gaus und Herrn Dr. Eckhart W. Guthöhrlein.

Für das mühsame und sorgfältige Korrigieren dieser Arbeit, konstruktive Kommentare und Anregungen sowie für beständige Hilfsbereitschaft möchte ich sehr herzlich Frau Katrin Wollschläger und Frau Katharina Gaus danken.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe OC III danke ich für das freundliche Arbeitsklima, ihre Kollegialität und zahlreiche fachliche Diskussionen. Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau Eva Ennemann und Herrn Silvio Weber für ihre Beiträge zu dieser Arbeit, die sie im Rahmen ihrer Blockpraktika geleistet haben.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Freunden aus Hamburg, Hannelore Pries und Günter Warnke, die mir die ersten Schritte im Ausland erleichtert haben und mir seit Jahren ihre Freundschaft und Hilfe in allen Lebensphasen entgegenbringen.

Meinen besonderen Dank möchte ich Thomas Huber aussprechen. Ich danke ihm für seine liebevolle Unterstützung und ermutigenden Worte, die er mir in allen schwierigen Situationen entgegengebracht hat. Ich danke ihm ebenfalls für die Hilfe bei allen technischen Problemen und für zahlreiche L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X-spezifische Hinweise, die zur Herstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben. Serdeczne podziękowania składam moim rodzicom, którzy umożliwili mi podjęcie studiów. Mojej Mamie dziękuję za nieustanne podnoszenie mnie na duchu w trakcie całej tej pracy oraz za przekazanie taneczno-chemicznych zainteresowań. Mojemu Tacie dziękuję za dobry pomysł i za przekazanie innych pozytywnych genów. Obydwojgu Wam dziękuję.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>3</b>
2.1	Integrine . . . . .	3
2.1.1	Struktur der Integrine . . . . .	3
2.1.2	Integrinaktivität . . . . .	7
2.1.3	Integrine und Signaltransduktion . . . . .	9
2.1.4	Biologische Funktion der Integrine . . . . .	11
2.2	Liganden der Integrine . . . . .	14
2.2.1	Integrin $\alpha_4\beta_1$ und VCAM1 . . . . .	14
2.2.2	Integrin $\alpha_v\beta_3$ und Vitronectin . . . . .	16
2.2.3	ADAM Proteine . . . . .	18
2.2.4	Bakterielle und virale Liganden . . . . .	22
2.3	Peptide . . . . .	26
2.3.1	Peptide als Wirkstoffe . . . . .	26
2.3.2	RGD-Peptide als Integrinliganden . . . . .	27
2.3.3	Peptide mit anderen Erkennungssequenzen . . . . .	32
2.4	Oberflächenplasmonresonanz . . . . .	33
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>Materialien</b>	<b>41</b>
4.1	Chemikalien . . . . .	41
4.2	Peptide . . . . .	42
4.3	Materialien für die Zell- und Bakterienkultur . . . . .	44
4.3.1	Zelllinien . . . . .	44
4.3.2	Bakterienstämme . . . . .	45
4.3.3	Medien und Medienzusätze . . . . .	45
4.4	Proteine, Kits und Standards . . . . .	46
4.4.1	Proteine . . . . .	46

4.4.2	Kits . . . . .	47
4.4.3	Standards . . . . .	47
4.5	Puffer und Lösungen . . . . .	47
4.5.1	Allgemeine Puffer . . . . .	47
4.5.2	Puffer und Lösungen für die Zellkultur . . . . .	50
4.5.3	Puffer für FACS Analyse . . . . .	51
4.5.4	Puffer für SPR Experimente . . . . .	51
4.5.5	Sonstige Puffer . . . . .	51
4.6	Antikörper . . . . .	53
4.6.1	Antikörper für Western Blotting . . . . .	53
4.6.2	Antikörper für Zelladhäsionstest und FACS Analyse . . . . .	54
4.7	Materialien für die Molekularbiologie . . . . .	56
4.7.1	Plasmide . . . . .	56
4.7.2	Primer . . . . .	57
4.7.3	Enzyme und Reagenzien . . . . .	58
4.8	Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .	59
4.8.1	Geräte . . . . .	59
4.8.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	60
4.9	Software . . . . .	61
<b>5</b>	<b>Methoden</b>	<b>63</b>
5.1	Humane Zellkultur . . . . .	63
5.1.1	Kultivierung von Suspensionskulturen . . . . .	63
5.1.2	Kultivierung von Monolayerkulturen . . . . .	64
5.1.3	Zellzahlbestimmung . . . . .	65
5.1.4	Kryokonservierung der Zellen . . . . .	65
5.1.5	Auftauen der Zellen . . . . .	66
5.1.6	Vitalitätstest von Zellen . . . . .	66
5.2	Bakterienkultur . . . . .	67
5.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> . . . . .	67
5.2.2	Herstellung kompetenter Zellen . . . . .	67
5.2.3	Lagerung der Bakterienkultur . . . . .	67
5.3	Zelladhäsionstest . . . . .	67
5.4	Biochemische Methoden . . . . .	69
5.4.1	SDS-PAGE . . . . .	69
5.4.2	Native Elektrophorese . . . . .	71

5.4.3	Silberfärbung . . . . .	71
5.4.4	<i>Coomassie</i> Färbung . . . . .	72
5.4.5	<i>Coomassie</i> kolloidale Färbung . . . . .	72
5.4.6	Immunochemische Proteindetektion – Western Blotting . . . . .	73
5.4.7	Elektrophorese von Nukleinsäuren . . . . .	75
5.4.8	Ethidiumbromidfärbung von Nukleinsäuren . . . . .	76
5.4.9	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	76
5.4.10	Fällung der Proteine mit organischen Lösungsmitteln . . . . .	77
5.4.11	Extraktion der Integrine aus der Zellmembran . . . . .	77
5.4.12	Bestimmung der Integrinkonzentration im Membranextrakt . . . . .	79
5.4.13	Proteinexpression in <i>E. coli</i> . . . . .	79
5.4.14	Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i> . . . . .	79
5.5	Molekularbiologische Methoden . . . . .	81
5.5.1	Isolierung von Ribonukleinsäure aus humanen Zellen . . . . .	81
5.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	81
5.5.3	RT-PCR . . . . .	82
5.5.4	Klonierung des ADAM8 Proteins . . . . .	83
5.5.5	Amplifizierung der cDNA für die Klonierung . . . . .	84
5.5.6	Restriktionsverdau . . . . .	85
5.5.7	Ligationsreaktion . . . . .	86
5.5.8	Transformation . . . . .	86
5.5.9	Aufreinigung der Plasmide . . . . .	87
5.5.10	Identifizierung der Plasmide . . . . .	87
5.5.11	DNA Konzentrationsbestimmung . . . . .	87
5.5.12	DNA Sequenzierung . . . . .	87
5.6	Durchflusszytometrie . . . . .	87
5.6.1	Nachweis einer stabilen Integrinexpression in CHO Zellen . . . . .	89
5.6.2	Bindung des humanen ADAM8 Proteins an Integrine . . . . .	90
5.6.3	Inhibitionsexperimente mit zyklischen Peptiden . . . . .	91
5.6.4	Durchführung der FACS Analyse und Auswertung der Ergebnisse . . . . .	91
5.7	SPR . . . . .	92
5.7.1	Experimente mit Membranextrakt aus WM115 Zellen . . . . .	92
5.7.2	Experimente mit vitalen WM115 Zellen . . . . .	93
5.7.3	Interaktion des bakteriellen CagL Proteins mit humanem Fibronectin . . . . .	93
5.7.4	Interaktion des bakteriellen CagL Proteins mit immobilisiertem Integrin $\alpha_5\beta_1$ . . . . .	94

5.7.5	Interaktion des Integrins $\alpha_v\beta_5$ mit immobilisiertem CagL Protein . .	95
5.7.6	Interaktion des CagL Proteins mit immobilisiertem Integrin $\alpha_v\beta_5$ . .	96
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>97</b>
6.1	Wechselwirkung des Integrins $\alpha_4\beta_1$ mit VCAM-1 . . . . .	100
6.1.1	Analyse der Integrinexpression von Ramos-Zellen . . . . .	101
6.1.2	Einfluss zyklischer Peptide auf die Adhäsion von Ramos-Zellen an VCAM-1 . . . . .	106
6.1.3	Resumé . . . . .	108
6.2	ADAM8 Protein . . . . .	108
6.2.1	Klonierung des ADAM8 Proteins . . . . .	111
6.2.2	Expression des ADAM8 Proteins in <i>E. coli</i> . . . . .	113
6.2.3	Aufreinigung des rekombinanten ADAM8 Proteins . . . . .	117
6.2.4	Untersuchung der homophilen Interaktion von ADAM8 . . . . .	118
6.2.5	Nachweis der Integrinlokalisierung auf Oberfläche der CHO Zellen . .	120
6.2.6	Bindung des humanen ADAM8 Proteins an Integrine . . . . .	123
6.2.7	Kompetitionsexperimente mit zyklischen Peptiden . . . . .	127
6.2.8	Resumé . . . . .	129
6.3	Einfluss von RGD-Peptiden auf die Zell-ECM-Wechselwirkung . . . . .	130
6.3.1	Analyse der Integrinexpression von WM115 Zellen . . . . .	132
6.3.2	Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Adhäsion von WM115 Zellen an Vitronectin . . . . .	134
6.3.3	Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Adhäsion von K562 Zellen an Fibronectin . . . . .	137
6.3.4	SPR-Experimente . . . . .	141
6.3.5	Resumé . . . . .	145
6.4	Das Protein CagL als bakterieller Ligand humaner Integrine . . . . .	146
6.4.1	Adhäsion der WM115 Zellen an CagL Proteine . . . . .	149
6.4.2	Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Adhäsion von WM115 Zellen an CagL Proteine . . . . .	151
6.4.3	Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin und Fibronectin . . . . .	154
6.4.4	SPR Experimente . . . . .	156
6.4.5	Resumé . . . . .	169
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>171</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$\beta$ Acc	$\beta$ -Aminocyclopropan- $\alpha,\gamma$ -dicarboxy- $\gamma$ -monomethylester
Achc	2-Aminocyclohexancarbonsäure
Acpc	2-Aminocyclopentancarbonsäure
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteases</i>
ADAM-TS	ADAM Proteine mit Thrombospondin-ähnlichen Domänen
Ambs	2-Aminomethylbutansäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CMC	<i>critical micelle concentration</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix ( <i>extracellular matrix</i> )
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
EGF	Epidermalwachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraethansäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	Fokal-Adhäsion-Kinase
FCS	Vorwärtsstreulicht ( <i>Forward Scatter</i> )
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FMDV	<i>foot and mouth disease virus</i>
Fr	Fragment
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	HEPES-gepufferte Lösung

HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HEK-EBNA	<i>human embryonic kidney-Epstein-Barr virus-induced nuclear antigen</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
IC <sub>50</sub>	inhibitorische Konzentration von 50%
ICAM	<i>intercellular cell adhesion molecule</i>
IGSF	Immunglobulinsuperfamilie
IL-8	Interleukin-8
MadCAM-1	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
ME	Membranextrakt
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
MIDAS	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	kernmagnetische Resonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NTA	Nitrilotriethansäure
β-OG	Octyl-β-D-glucopyranosid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Proteinkonvertase ( <i>protein convertase</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-phenylazo]-2,7-naphtalindisulfonsäure
PSI	<i>plexins, semaphorins, integrins</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RU	<i>response unit</i>
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPR	Oberflächenplasmonresonanz ( <i>surface plasmon resonance</i> )
Src	<i>sarcom</i>

SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>Side Scatter</i> )
$\beta$ -TD	$\beta$ -tail domain
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin
TFSS	Typ IV Sekretionssystem ( <i>type four secretion system</i> )
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
vWF	von Willebrand Faktor

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
Pyrollysin	Pyl	O
Selenocystein	Sec	U
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Thryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

# 1 Einleitung

Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix spielen eine entscheidende Rolle im Ablauf und bei der Regulierung biologischer Prozesse in lebenden Organismen. Integrine bilden eine wichtige Klasse von Oberflächenrezeptoren, die in der Kontrolle physiologischer Prozesse von grundlegender Bedeutung sind. Durch Wechselwirkungen mit natürlichen Liganden erfüllt jedes Integrin spezialisierte Funktionen im Ablauf physiologischer Phänomene.

Zu den durch Integrine vermittelten biologischen Prozessen gehören unter anderem Embryonalentwicklung, Blutgerinnung, Wundheilung und Angiogenese. Viele Krankheiten sind unmittelbar mit integrinvermittelter Zelladhäsion verbunden. Dazu zählen unter anderem Osteoporose, Tumorentwicklung und Tumormetastasierung sowie zahlreiche Immunkrankheiten, wie z. B. Asthma und rheumatische Arthritis. Aus diesem Grund stellt eine gezielte Hemmung integrinabhängiger Prozesse einen wichtigen Aspekt im Kontext der Kontrolle pathologischer Prozesse dar. Die selektive Inhibierung einzelner Integrine ist eine der aktuellsten Herausforderung der pharmazeutischen Chemie.

Molekulare Erkennung zwischen Integrinen und Liganden erfolgt oft über kurze Aminosäuresequenzen, die auf der Oberfläche der Liganden präsentiert werden. Während der Interaktion mit Integrinen sind diese direkt an der Bildung der Kontaktfläche zwischen beiden Proteinen beteiligt. Mit Entdeckung der Erkennungssequenzen der Integrine wurde ein starkes Interesse am Auffinden von Leitstrukturen geweckt, die die Entwicklung effektiver Therapeutika ermöglichen. Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet führten bislang zur Entdeckung potenter und selektiver Peptid- und Peptidomimetika-Liganden, welche erfolgreich als pharmazeutische Wirkstoffe z. B. in Krebs- oder Immunkrankheiten-Therapie eingesetzt werden. Zu den peptidischen Therapeutika gehören unter anderem Integrilin<sup>®</sup>, das in der Therapie von Koronarthrombose eingesetzt wird, und Cilengitide<sup>®</sup>, das zurzeit in klinischen Tests der Phase II gegen Leukämie, Hirntumore und Kaposi-Sarkom untersucht wird.

Die dreidimensionale Konformation der Erkennungssequenz in einer neuen Verbindung ist für die biologische Aktivität und Selektivität entscheidend. Im Idealfall kann ein neuer Wirkstoff aufgrund von Struktur-Daten eines Rezeptor-Ligand-Komplexes bzw. eines

Liganden konzipiert werden. Sind die genauen konformationellen Daten nicht vorhanden, so können neue biologisch aktive Strukturen mittels *spatial screening* Verfahren entwickelt werden. Dieses Prinzip umfasst die Synthese von Peptid-Bibliotheken, in welchen die aktive Konformation der pharmakophoren Erkennungssequenz durch chemische Modifizierungen in stereoisomeren Peptiden der nativen Struktur natürlicher Liganden angenähert wird.

Gezielte Veränderungen, die zu einer biologisch potenteren und selektiveren Struktur führen sollen, können in neuen Molekülen auf verschiedene Art und Weise erzeugt werden. Dazu gehören die Einführung nicht-natürlicher Aminosäuren in das Peptidrückgrat, die diskrete Sekundärstrukturelemente induzieren oder die Zyklisierung linearer Peptide, deren Konformationsraum eingeschränkt ist. Des Weiteren können sowohl die Aminosäureseitenketten als auch die Peptidbindungen modifiziert werden oder sogar nicht-peptidische Bausteine in das Peptid eingeführt werden.

## 2 Theorie

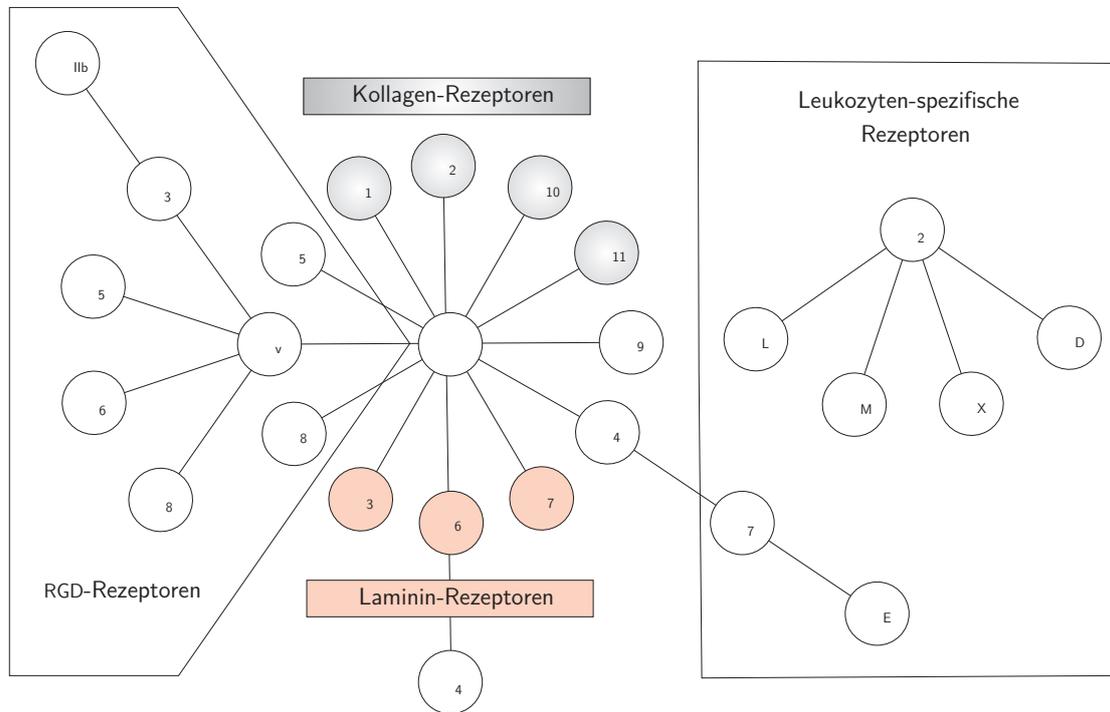
### 2.1 Integrine

Organisation und korrekter Ablauf physiologischer Prozesse in multizellulären Organismen erfordern sowohl Zell-Zell Kommunikation innerhalb der Gewebe, als auch Kommunikation zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix. Beide Prozesse verlaufen unter Beteiligung von Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules* – CAMs). Neben Cadherinen, Selektinen und CAMs der Immunoglobulin-Superfamilie bilden Integrine eine umfangreiche und vielfältige Familie der Zelladhäsionsmoleküle. Der Name “Integrine” wurde ursprünglich durch Tamkun *et al.* als eine Bezeichnung für einen integralen Membranproteinkomplex eingeführt, der für die Verbindung der extrazellulären Matrix mit dem Cytoskelett verantwortlich ist.<sup>[1]</sup> Neben der Verankerung einer Zelle im Gewebe spielen Integrine als Rezeptoren diverser extrazellulärer Proteine eine substantielle Rolle bei der Signal-Transduktion aus der Umgebung einer Zelle in ihr Inneres und umgekehrt.<sup>[2]</sup> Integrinvermittelte Zelladhäsion und Signal-Transduktion reguliert eine Vielfalt biologischer Prozesse und Zellfunktionen, die für lebende Organismen von fundamentaler Bedeutung sind.

#### 2.1.1 Struktur der Integrine

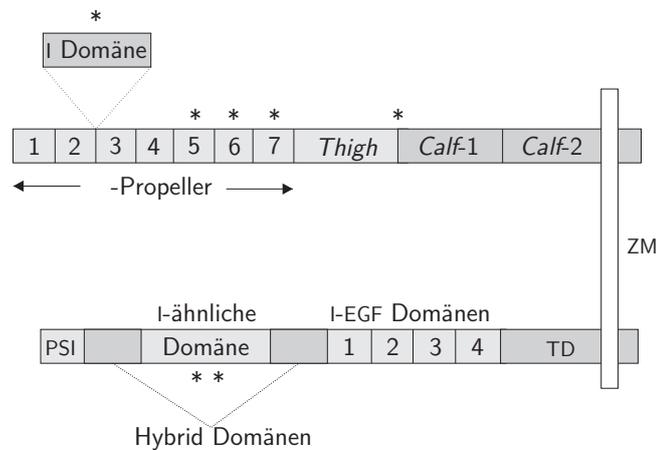
Integrine sind heterodimere Transmembranglycoproteine, die aus je einer nicht-kovalent verknüpften  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Bislang sind acht  $\beta$ - und 18  $\alpha$ -Untereinheiten bekannt, die in 24 verschiedenen Kombinationen in höheren Tieren vorkommen können (Abb. 2.1). Im Genom niederer Tiere sind weniger Integrine kodiert. In *Drosophila* werden z. B. 5 Integrinuntereinheiten kodiert.<sup>[3-6]</sup>

Die  $\alpha$ -Untereinheit ist zwischen 950 und 1 150 Aminosäuren lang während die  $\beta$ -Untereinheit 730 bis 800 Aminosäuren enthält. Jede der beiden Integrinuntereinheiten durchdringt die Zellmembran einmal. Der größere Teil jeder Polypeptidkette befindet sich im Extrazellulärraum (mehr als 1 600 Aminosäuren insgesamt) während der cytoplasmatische Teil mit 20-50 Aminosäuren sehr kurz ist.<sup>[7]</sup> Einzige Ausnahme stellt die  $\beta_4$ -Integrinuntereinheit mit einem außergewöhnlich großen cytoplasmatischen Teil von 1 750 Aminosäuren dar, der auf die Verknüpfung mit dem Keratin-Cytoskelett spezialisiert ist.<sup>[8]</sup>



**Abbildung 2.1:** Die Integrin-Familie. [3]

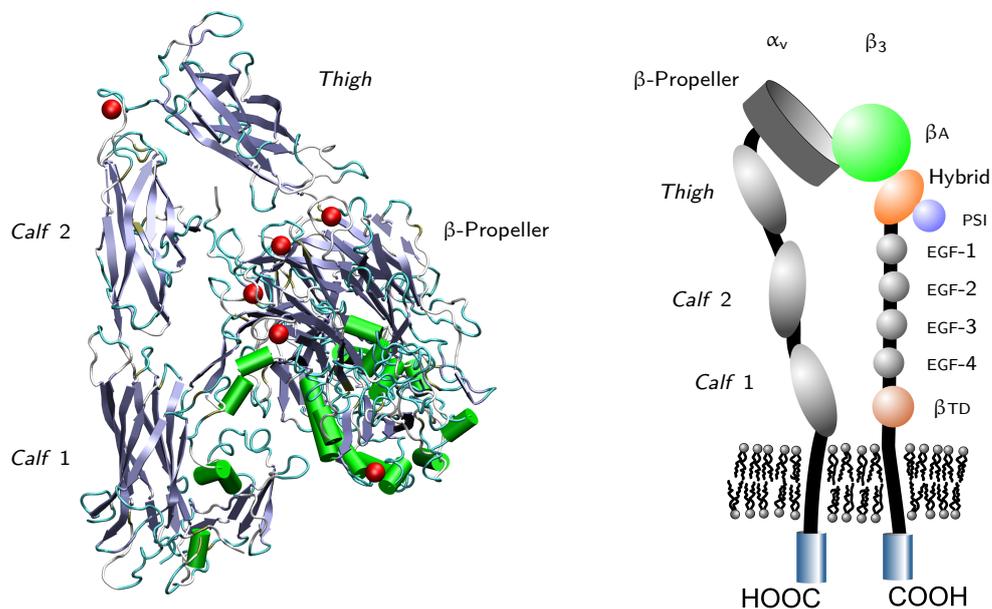
Der Aufbau der beiden Integrinuntereinheiten ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Am N-Terminus der  $\alpha$ -Integrinuntereinheit befinden sich sieben wiederholende Segmente, die jeweils ca. 60 Aminosäuren enthalten und eine sieben-blättrige  $\beta$ -Propeller Domäne bilden. [9] Die wiederholenden Segmente zeichnen sich durch eine bestimmte Sequenzhomologie untereinander aus. Je nach Integrin enthalten die letzten drei bzw. vier wiederholenden Domänen eine Kationenbindestelle in Form eines EF-Hand Motivs. Jede dieser Domänen wird durch unterschiedliche Exons kodiert. [10] Als EF-Hand Motiv bezeichnet man eine hochaffine Bindungsstelle für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen, die durch das Helix-turn-Helix-Strukturmotiv gebildet wird und eine oktaedrische Koordinationssphäre für ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kation bildet. Die dabei beteiligten Helices werden Helix E und F genannt. Die Koordination des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kations erfolgt durch Sauerstoffatome des Rückgrats und der Seitenketten der Schleife (*turn*) und ein proteinassoziiertes Wassermolekül. [11,12] Etwa die Hälfte der Integrine enthält eine zusätzliche 200 Aminosäuren lange Domäne, die zwischen dem zweiten und dritten Segment der  $\alpha$ -Integrinuntereinheit inseriert ist und als Insert-, I-Domäne, bzw. (vWF) A-Domäne bezeichnet wird. [9] I-Domänen kommen ebenfalls in anderen Proteinen, wie z. B. dem von Willebrand Factor (vWF), Kollagen VI und dem Knorpelmatrixprotein (*cartilage matrix protein*, CMP) vor und sind in die Protein-



**Abbildung 2.2:** Schematischer Aufbau der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrinuntereinheiten. Bindestellen zweiwertiger Kationen sind mit Sternchen markiert. Die beiden Integrinuntereinheiten durchdringen Zellmembran (ZM) mit transmembränen Domänen, die sich in der Nähe des C-Terminus jeder Integrinuntereinheit befindet.

Ligand Wechselwirkung involviert.<sup>[13-16]</sup> Die Kristallstrukturen der I-Domäne von  $\alpha_M$ - und anderen  $\alpha$ -Integrinuntereinheiten zeigen, dass sie eine Rossmann-Faltung annimmt. Rossmann-Faltung, die ebenfalls nukleotidbindende Faltung genannt wird, bezeichnet eine Proteindomäne, in welcher sich im Kern befindende  $\beta$ -Faltblätter von  $\alpha$ -Helices umgeben werden. Die I-Domäne enthält auf ihrer Oberfläche eine Bindestelle für  $Mg^{2+}$ - bzw.  $Mn^{2+}$ -Kationen. Für die Bindung der Integrinliganden sind zweiwertige Kationen wie  $Mn^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  essentiell.

Der erste Hinweis auf eine Kationenbindestelle in Integrinen wurde in Mutagenesestudien der I-Domäne der  $\alpha_M$ -Integrinuntereinheit gewonnen.<sup>[15]</sup> Viele der Proteine mit Rossmann Faltung sind Enzyme mit  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle und einem aktiven Zentrum auf der Proteinoberfläche. Das  $Mg^{2+}$ -Kation koordiniert sehr oft die Phosphatgruppe von NAD, ATP oder GTP, die Substrate bzw. Kofaktoren dieser Enzyme darstellen. Die kleinen G-Proteine zeigen die höchste Verwandtschaft mit der I-Domäne der Integrine. Die Koordinationsstelle für ein zweiwertiges Kation wird als MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) Motiv bezeichnet und befindet sich an der Oberfläche der I-Domäne. In die Koordination eines zweiwertigen Kations sind insgesamt sechs Aminosäuren involviert. Fünf separierte Aminosäurereste kommen in der I-Domäne vor. Die ersten drei Aminosäurereste sind nah nebeneinander innerhalb des DXSXS Aminosäurenmotivs positioniert. Die vierte Aminosäure ist Threonin und ist ca. 70 Aminosäuren von dem DXSXS Motiv entfernt, während die fünfte Aminosäure, Aspartat, ungefähr 100 Positionen in der Peptidkette hinter dem DXSXS Motiv liegt. Interessant war die Entdeckung, dass sich die letzte, sechste Aminosäu-



**Abbildung 2.3:** Röntgenstruktur des extrazellulären Fragments des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  mit einer Auflösung von  $0.33 \text{ nm}$ <sup>[22]</sup> (links) und schematische Darstellung des Integrins (rechts).  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter sind in der Kristallstruktur grau bzw. grün markiert; zweiwertige Kationen sind rot markiert.

re, die in die Bildung der koordinativen Sphäre involviert wird, in einem nebenanliegenden Molekül befindet, was auf die Involvierung von Aminosäureseitenketten anderer Ligande während der Protein-Protein Wechselwirkung hindeutet.<sup>[6,17-19]</sup> In Integrinen, die keine  $\alpha$ -Domäne enthalten, nimmt die  $\beta$ -Propeller Domäne der  $\alpha$ -Integrinuntereinheit direkt an der Ligandenbindung teil. Die Region hinter dem C-Terminus der sich wiederholenden Domänen bildet eine Stütze zwischen dem globulären Kopf der  $\alpha$ -Integrinuntereinheit und dem transmembranem Teil.<sup>[3,20,21]</sup> Die durch Xiong *et al.* aufgeklärte Kristallstruktur des extrazellulären Fragments des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  zeigt die Anwesenheit von drei Domänen *Thigh*, *Calf 1* und *Calf 2* mit  $\beta$ -sandwich Topologie und einer Gelenkregion zwischen der *Thigh* und *Calf 2* Domäne (Abb. 2.3).<sup>[22]</sup>

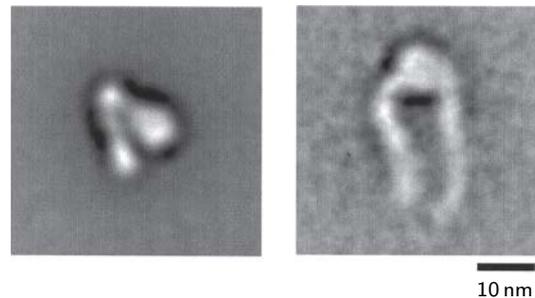
$\beta$ -Integrinuntereinheiten sind mit  $\alpha$ -Integrinuntereinheiten genetisch nicht verwandt. Die N-terminale Aminosäuresequenz wird als PSI-Region (von *plexins*, *semaphorins*, *integrins*) bezeichnet und zeigt eine hohe Homologie mit Membranproteinen wie Plexinen und Semaphorinen. Die PSI-Region enthält 7 Cysteinreste, die erste davon bildet eine Disulfidbrücke mit einer cysteinreichen Region am C-Terminus.<sup>[23]</sup> Die  $\beta$ -Integrinuntereinheiten enthalten eine Region, die eine schwache Homologie zur  $\alpha$ -Domäne der  $\alpha$ -Integrinunterein-

heiten aufweist. Sie wird als I-ähnliche Domäne bezeichnet. In dieser Domäne ist ebenfalls eine Kationenbindestelle mit DXSXS Motiv zu finden, die dem Kationenbindemotiv im MIDAS Motiv der I-Domäne ähnelt. Die I-ähnliche Domäne ist in die Bindung von Liganden an Integrine, in welchen die I-Domäne in der  $\alpha$ -Integrinuntereinheit fehlt, involviert. Alternativ kann sie die Ligandenbindung an I-Domäne enthaltende Integrine regulieren. In der Struktur der  $\beta$ -Integrinuntereinheit kommen außerdem vier hochkonservierte cysteinreiche Domänen von je ca. 40 Aminosäuren nahe der transmembranen Region vor, die aufgrund der Homologie zu dem Epidermalwachstumsfaktor (*epidermal growth factor*) als Integrin EGF-Domäne (I-EGF) bezeichnet werden.<sup>[24,25]</sup> Viele der aktivierenden Antikörper oder der Antikörper, die lediglich an Integrine in aktiver Form binden, binden innerhalb der EGF-Region.<sup>[6]</sup> Am C-Terminus des extrazellulären Teils der  $\beta$ -Integrinuntereinheiten befindet sich eine cysteinreiche  $\beta$ -tail domain ( $\beta$ TD). Die auf die  $\beta$ TD folgende Region ist die kurze transmembrane Domäne, die lediglich 20 Aminosäuren enthält und mit Hilfe derer die  $\beta$ -Integrinuntereinheit eine Zellmembran durchdringt.

### 2.1.2 Integrinaktivität

Integrine sind sowohl in aktiver als auch in nicht aktiver Form auf der Zelloberfläche lokalisiert. Die Aktivität wird durch Ein- und Ausschalten reguliert, die Anzahl aktiver Moleküle ist von der biologischen Funktion der Zelle abhängig. Als Beispiel kann das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  erwähnt werden, welches auf zirkulierenden Blutplättchen stark in nicht aktiver Form exprimiert ist. Im normalen physiologischen Zustand ermöglicht dieses Protein die Anlagerung der Blutplättchen bei Blutgefäßverletzungen. Permanente, anormal starke Expression dieses Integrins auf Blutplättchen in aktiver Form würde die erhöhte Bindung des Hauptliganden, Fibrinogen, aus dem Plasma verursachen und folglich zu Aggregation und Thrombose führen.<sup>[3]</sup>

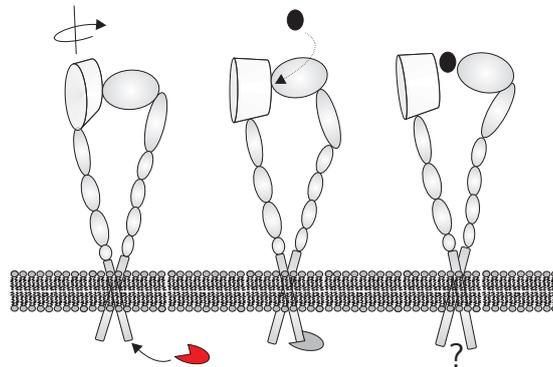
Zahlreiche Studien, wie z.B das Mapping der I-Domäne mit monoklonalen Antikörpern, die Aufklärung der Anordnung der Aminosäurereste im MIDAS Motiv der I-Domäne und die Ligandenbindung durch isolierte I-Domänen beweisen, dass in Integrinen mit I-Domäne diese die Hauptligandenbindestelle ist.<sup>[15,16,26-28]</sup> Die Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR-Untersuchungen der I-Domäne der Integrine  $\alpha_M$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_L$  zeigen, dass diese Domäne sich in zwei unterschiedlichen Konformationen befinden kann, die als offenes (*open*) und geschlossenes (*closed*) Konformer definiert wurden.<sup>[6,18,29,30]</sup> Im offenen Konformer werden zweiwertige Kationen, wie z. B.  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ , unter anderem durch einen sauren Aminosäurerest des Liganden koordiniert. Demgegenüber wird dieser saure Rest in der geschlossenen Konformation mit einem Wassermolekül substituiert



**Abbildung 2.4:** Elektronenmikroskopaufnahme von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in zwei Konformationen. Inaktive Form in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen (links), aktive Form in Anwesenheit von  $\text{Mn}^{2+}$ -Kationen rechts.<sup>[31]</sup>

und kein Ligand-Kontakt beobachtet. Die beiden Konformere unterscheiden sich ebenfalls in der Struktur der Umgebung der Kationenbindestelle. Es wird auch eine Änderung in der Position der C-terminalen  $\alpha$ -Helices beobachtet.<sup>[29]</sup> Die Aufgabe der  $\alpha$ -Domäne wird in Integrinen, in welchen diese Domäne fehlt, durch die  $\alpha$ -ähnliche Domäne der  $\beta$ -Integrinuntereinheit übernommen.<sup>[31]</sup>

Takagi und Springer haben auf Basis von elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  einen konformationsinduzierten Mechanismus zur Integrinaktivierung vorgeschlagen und zwei grundlegende Zustände beschrieben.<sup>[31]</sup> In Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen nimmt das Integrin eine kompakte V-förmige Konformation an, dessen Größe und Form mit den Kristallstruktur-Daten von Xiong *et al.* übereinstimmt (Abb. 2.4). Die Spitze der geknickten Konformationsform entspricht der Gelenkregion zwischen den *Thigh* und *Calf 2* Domänen.<sup>[22]</sup> In Anwesenheit von  $\text{Mn}^{2+}$ , welches als starker Aktivator der Integrine bekannt ist, nimmt das Integrin eine gestreckte Konformation an, in welcher der globuläre Teil und die *Calf* Region vollständig getrennt ist.<sup>[31]</sup> Plow *et al.* und Shattil *et al.* haben einen Mechanismus zur Integrinaktivierung vorgeschlagen, der zwei Zustände für die signaltransduktionsinduzierten Konformationsänderungen beschreibt. Die intrazelluläre Aktivierung des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  involviert eine Dissoziation des  $\alpha_v$  Propellers von der  $\beta_A$ -Domäne der  $\beta_3$ -Integrinuntereinheit.<sup>[7,32]</sup> Ein weiterer vorgeschlagener Aktivierungsmechanismus basiert auf der dreidimensionalen Kristallstruktur des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  von Xiong *et al.* und auf *molecular modeling* und wurde von Gottschalk *et al.* beschrieben. Dieser Mechanismus zur Integrinaktivierung umfasst drei Schritte.<sup>[33]</sup> Zunächst bindet ein intrazelluläres Protein an das Integrin. Dies führt zu einer rotierenden Bewegung der Integrinuntereinheit, die das Integrin aktiviert und die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle freigibt (Abb. 2.5). In diesem Schritt sind die beiden Integrinuntereinheiten immer noch assoziiert. Die Bindung des Liganden an das aktivierte Integrin führt zu einer wei-



**Abbildung 2.5:** Der vorgeschlagene Mechanismus zur Integrinaktivierung und Signaltransduktion.<sup>[33]</sup> Intrazelluläres Protein bindet an das Integrin und induziert eine Drehbewegung des Kopfteils des Integrins (links). Bindung des Liganden an das Integrin (mittel) verursacht Konformationsänderungen im Kopfteil und Dissoziation der Integrinuntereinheiten (rechts).

teren Konformationsänderung der beiden Integrinuntereinheiten und resultiert in ihrer Dissoziation, welche ein Ausgangspunkt weiterer intrazellulärer Ereignisse sein kann (Abb. 2.5).<sup>[33]</sup> Dieser Mechanismus stimmt mit den *molecular modeling* Studien der transmembranen Domäne überein, die ebenfalls drei grundlegende mögliche Zustände dieser Domäne beschrieben haben. Die ersten zwei Zustände entsprechen dem nichtaktiven und aktiven Zustand, die sich in der relativen Konformation der transmembranen  $\alpha$ -Helices unterscheiden. Der dritte Zustand weist einen größeren Winkel zwischen den  $\alpha$ -Helices auf, die die Zellmembran durchdringen.<sup>[34]</sup>

### 2.1.3 Integrine und Signaltransduktion

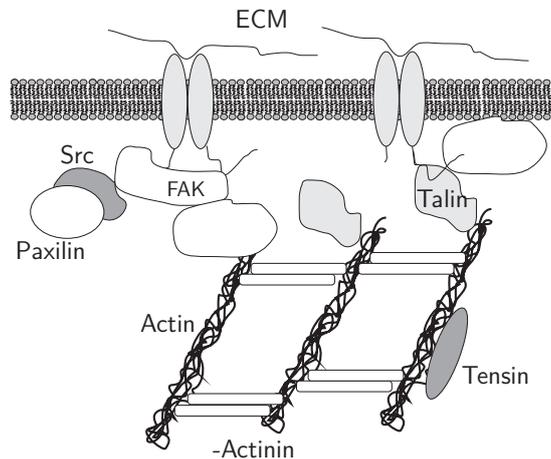
Integrine vermitteln die Zelladhäsion an viele Proteine der Extrazellulärmatrix wie auch an andere Oberflächenrezeptoren einschließlich der Immunglobuline und Cadherine. Integrine können auch mit Proteinen anderer Proteinfamilie wechselwirken, wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Proteinasen.<sup>[35]</sup> In den letzten Jahrzehnten wurden Tausende von Studien mit Hilfe von Zellkulturen und Tieren durchgeführt, die zeigten, dass Integrine eine zentrale Rolle bei der Regulierung vieler biologischer Prozesse und Zellverhalten einschließlich Migration, Wachstum und Differenzierung spielen.<sup>[21,36]</sup> Des Weiteren üben die Integrine ebenfalls einen Einfluss auf die Expression der Gene aus, die andere Proteine, wie z. B. Metalloproteinase oder Cytokine, kodieren.<sup>[37,38]</sup>

Bei der Regulation der extrazellulären und intrazellulären Prozesse stellen die Integrine als bidirektionale Proteine ein wichtiges Bindeglied dar. Die Übertragung biologischer

Signale erfolgt in beide Richtungen, aus dem Zellinneren in das Zelläußere (*inside-out signaling*), wie auch aus dem Extrazellulärraum in das Zellinnere (*outside-in signaling*).<sup>[39]</sup> Im *inside-out signaling* führen die Interaktionen der cytoplasmatischen Teile der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrinuntereinheiten mit Proteinen des Cytoplasmas zu einer Konformationsänderungen der Integrine und ihrer Aktivierung und so zur Übertragung des biologischen Signals. Talin gilt als einer der wichtigsten cytoplasmatischen Integrinpartner und bindet mit Hilfe der konservierten Phosphotyrosinbindende-Domäne (PDB-like) meistens an die  $\beta$ -Integrinuntereinheit.<sup>[39]</sup> Allerdings sind die genauen Mechanismen der intrazellulären Aktivierung der Integrine nicht bekannt.

Im Gegensatz zur intrazellulären Aktivierung sind viele Informationen über die Weiterleitung der Signale von außen in das Zellinnere vorhanden. Eine Ligandenbindung an Integrine kann das *outside-in signaling* aktivieren, wobei die Konformationsänderungen im extrazellulären Teil der Integrine auf den transmembranen (TM) Teil und weiter auf die cytoplasmatische Domäne übertragen wird. Die Weiterleitung des Signals kann durch die Homooligomerisation der TM-Domänen unterstützt werden.<sup>[40]</sup> *Outside-in signaling* involviert Enzyme wie z. B. FAK/c-Src Komplexe (Fokal-Adhäsion-Kinase/c-Src Kinase Komplexe), Phosphatidylinositol-3-kinase, Ras und Rho GTPase als auch Adapterproteine wie CAS mit ihren Partnerprotein Crk und Paxilin.

Fokal-Adhäsion-Kinase (FAK) ist eines der wichtigsten Bauelemente fokaler Komplexe. Dieses Protein bindet an die  $\beta$ -Integrinuntereinheit und andere zahlreiche Bausteine fo-



**Abbildung 2.6:** Vereinfachtes Modell des Integrin-Signaling-Komplexes. Das Modell beschreibt die Kontakte zwischen den Basisbausteinen, die in dem Integrin-Signaling-Komplex vorkommen. Der Komplex enthält Kinase, wie z. B. Src-Kinase, duale Kinase/Adapter Proteine wie FAK, Gerüstproteine wie Paxilin und Bindeglieder des Cytoskellets wie  $\alpha$ -Actinin.

kaler Adhäsion (Abb. 2.6). Die Ligandenbindung an Integrine induziert eine Phosphorylierung von FAK und führt zur Aktivierung seiner Kinase-Aktivität. Da Phosphorylierung und Aktivierung des FAK Proteins ebenfalls durch bestimmte Wachstumsproteine reguliert wird, wird ein Mechanismus vorgeschlagen, der beide Signale integriert.<sup>[41]</sup> Die Liste anderer Proteine, die in Signalübertragung involviert sind, ist lang und wächst stetig. Kleine integrininduzierte Ansammlungen der Signaling-Proteine konnten mit Hilfe von Immunofluoreszenz-Mikroskopie visualisiert werden und zeigten, dass diese Komplexe einige hundert Integrine und zugehörige Proteine enthalten, die als *microcluster* bezeichnet werden.<sup>[39,42]</sup> Zusätzliche Bausteine der Signaling-Komplexe stellen transmembrane Proteine dar, die eine Proteinfamilie, Tetraspanine, enthalten. Tetraspanine binden hauptsächlich an Integrine über den extrazellulären Teil. Sie können aber ebenfalls an unterschiedliche Bindestellen des cytoplasmatischen Teils der Integrine binden.<sup>[43,44]</sup> Zu den wichtigsten integrininduzierten Signalwegen und Prozessen gehören:

- Aktivierung der Proteinkinase C
- ILK-abhängige Regulierung von Wachstumsfaktor-Signaling
- Phosphorylierung von Lipid-Signaling Intermediate
- Erhöhung der Calcium-Ionenkonzentration
- Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskaden.<sup>[45]</sup>

#### 2.1.4 Biologische Funktion der Integrine

Jedes der 24 bislang bekannten Integrine zeichnet sich durch selbstständige spezifische Funktionen aus, die zur Kontrolle wichtiger biologischer Prozesse eingesetzt werden. Für die Spezifität der Integrine sind sowohl die  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Integrinuntereinheit relevant. Auf zellulärem Niveau werden Integrine in Prozessen wie adhäsionsinduzierte Zellmigration, Zelldifferenzierung und Zellausbreitung (*cell spreading*) involviert. Diese Prozesse tragen zu komplexeren physiologischen Ereignissen bei, die mehrere Gewebe oder sogar den ganzen Organismus betreffen können. Zu den Prozessen in welchen Integrine involviert sind, gehören unter anderem: Blutplättchen-Aggregation, Wundheilung, Regulierung der Knochenfunktion, Gefäßneubildung, Immunantwort (Rezirkulation von T-Lymphocyten, Migration von Leukocyten in die Entzündungsstellen), Fertilisation und Embryogenese.

Die biologische Relevanz der Integrine wurden in Studien mit *knock out* Mäusen untersucht. In den untersuchten *knock out* Mäusen wurde jeweils ein Gen des entsprechenden

fehlendes Integrin-Gen	Phänotyp der Mäusen
$\alpha_1$	Entwicklungsdefekte, reduzierte Tumor-Gefäßneubildung
$\alpha_2$	Entwicklungsdefekte, verzögerte Blutplättchen-Aggregation, reduzierte Bindung an monomeres Kollagen
$\alpha_3$	Nierendefekte, reduzierte Verzweigungsmorphogenese in Lungen
$\alpha_4$	Defekte in Plazenta und Herz
$\alpha_5$	Defekte bei Embryo- und Gefäßentwicklung, neuronale Apoptose
$\alpha_v$	embryonale Letalität aufgrund von Plazentadefekten, perinatale Letalität mit zerebralen Gefäßdefekten aufgrund neuroepithelialer Defekte, Gaumenspalte, die Mehrheit der Blutgefäße wird normal entwickelt
$\alpha_{IIb}$	schwere Blutungen, keine Blutplättchen-Aggregation
$\alpha_L$	beeinträchtigte Leukocyten-Rekrutierung
$\beta_1$	Letalität des Embryo beim Einnisten, Embryodefekte
$\beta_2$	Leukocytose, beeinträchtigte Immunantwort
$\beta_3$	schwere Blutungen, keine Blutplättchen-Aggregation, Osteosklerose, erhöhte Tumor-Gefäßneubildung

**Tabelle 2.1:** Phänotyp der *knock out* Mäuse. Ergebnisse der ausgewählten Studien.<sup>[3]</sup>

Integrins inaktiviert. Dies resultierte in Defekten und Störungen im Ablauf normaler physiologischer Prozesse (Tab. 2.1).<sup>[3]</sup> Im Gegensatz dazu kann eine nicht kontrollierte Zelladhäsion ebenfalls eine Ursache von nicht erwarteten biologischen Phänomena sein. Die Expression bzw. Überexpression der Integrine auf der Oberfläche bestimmter Zelltypen stellt in diesem Fall eine der Grundlagen der beobachteten Erkrankungen dar. Unter anderen nehmen die Integrine an folgenden Krankheiten und pathophysiologischen Prozessen teil:

- Immunkrankheiten (chronischer Gelenkrheumatismus, Darmentzündung, Asthma)
- Tumorentwicklung, Tumormetastase, tumorinduzierte Angiogenese
- Osteoporose
- integrinvermittelte virale und bakterielle Infektionen.<sup>[46-49]</sup>

Die größte Untergruppe der Integrinfamilie stellen 12 Integrine dar, die die  $\beta_1$ -Integrinuntereinheit enthalten. Alle diese Proteine können an Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) binden. Die Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$  und  $\alpha_{11}\beta_1$  binden an Kollagen. Die Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_7\beta_1$  binden an Laminin. Die Integrine  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$  binden an Fibronectin,  $\alpha_9\beta_1$  bindet an Tenascin C und  $\alpha_v\beta_1$  bindet an

Vitronectin. Manche der  $\beta_1$ -Integrine binden an zelluläre Rezeptoren, wie Integrin  $\alpha_4\beta_1$  an VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und  $\alpha_9\beta_1$  an MadCAM1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*). Durch Interaktionen mit mehreren ECM-Molekülen und Zellrezeptoren spielen die  $\beta$ -Integrine eine multifunktionelle Rolle in der Kontrolle diverser Prozesse. Unter anderem zählt dazu die Fertilisation, in welche Integrin  $\alpha_6\beta_1$  involviert ist. Dieses Integrin vermittelt den Kontakt zwischen Spermien und Eizelle.<sup>[50]</sup>

Aktivierung, Wachstum und Überleben von Leukocyten werden vor allem durch die  $\alpha_4$ -Integrine ( $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_7$ ) kontrolliert. Diese tragen zusammen mit ihrem Hauptliganden VCAM-1 und anderen Liganden wie Fibronectin und MadCAM-1 zur mechanischen Unterstützung der Zelladhäsion und Zellmigration bei.  $\alpha_4$ -Integrine spielen ebenfalls eine signifikante Rolle bei der Leukocytenentwicklung, speziell der T- und B-Lymphocyten. Integrin- $\alpha_4$ -vermittelte Adhäsion fördert die Lokalisation der B-Zellen in Knochenmark und Keimzentrum. Die durch Integrine  $\alpha_4$  vermittelte Signaltransduktion unterstützt das Überleben von B-Lymphocyten, da es zur Aktivierung der anti-apoptotischen Gene der B-Lymphocyten beiträgt.<sup>[47]</sup> Die  $\alpha_4$ -Integrine leisten einen entscheidenden Beitrag zu chronischen Immunkrankheiten (Asthma, chronischer Gelenkrheumatismus, Multiple Sklerose, Darmentzündung).<sup>[47,51]</sup> Integrin  $\alpha_5\beta_1$  reguliert durch Interaktion mit Fibronectin die Anordnung der extrazellulären Matrix und die Zellmigration. Dieses Integrin ist ebenfalls an Zellwachstum und Embryogenese beteiligt.<sup>[52,53]</sup>

Physiologische Funktionen der Knochen werden im größten Teil durch Gefäßneubildung und Kontrollmechanismen der Osteoklasten und Osteoblasten reguliert.<sup>[54]</sup> Die beiden Zelltypen sind für die Knochenremodellierungskaskade relevant. Osteoklasten generieren neue Knochen, während Osteoblasten für den Abbau der Knochen sorgen. In Knochen werden generell Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  gefunden. Die Integrine  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$  binden an Kollagen I, welches mehr als 90% der gesamten Knochenproteine darstellt.<sup>[54]</sup> Die restlichen Integrine sind in die Wechselwirkungen mit Matrixproteinen (Knochensialoprotein, Osteopontin und Fibronectin) bzw. in die Gefäßneubildung (Angiogenese) ( $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ ) involviert.

Die durch  $\alpha_v\beta_3$  unterstützte Angiogenese ist ebenso an pathophysiologischen Prozessen, wie der Metastasierung von Tumoren, involviert. Integrin  $\alpha_{11b}\beta_3$  reguliert die Aggregation der Blutplättchen und ermöglicht im Ruhezustand ihre Anlagerung an Stellen mit Gefäßverletzungen.<sup>[3]</sup>

## 2.2 Liganden der Integrine

Wie schon früher erwähnt, können die Integrine mit unterschiedlichen Proteinen wechselwirken und auf diese Weise eine biologische Funktion eines Organismus kontrollieren. In der Regel erkennen die Integrine in einem Proteinliganden eine relativ kurze Aminosäuresequenz mit einem sauren Schlüssel-Aminosäurerest (Tab. 2.2).

Integrine	Liganden	Erkennungsmotiv
$\alpha_1\beta_1$	Kollagen, Laminin	R...D
$\alpha_2\beta_1$	Kollagen, Laminin	YYGDLR, FYFDLR
$\alpha_3\beta_1$	Fibronectin, Laminin 5, Kollagen I, Epiligrin	RGD bzw. andere Motive
$\alpha_4\beta_1$	VCAM-1, Fibronectin, Osteopontin	LDV, IDS, IDA, QIDSP
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin	RGD, LDV, IDS, KQAGDV, PHSRN
$\alpha_6\beta_1$	Laminin	nicht bekannt
$\alpha_v\beta_1$	Vitronectin, Fibronectin, Osteopontin	RGD
$\alpha_v\beta_3$	Vitronectin, Fibronectin, von Willebrand Faktor, Trombospondin, Tenascin Osteopontin, Fibrilin, Fibulin, Gelatin	RGD
$\alpha_v\beta_5$	Vitronectin, Osteopontin	RGD
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand Faktor, Trombospondin	RGD, PHSRN
$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	nicht bekannt

**Tabelle 2.2:** Liganden und Erkennungssequenzen der ausgewählten Integrine. <sup>[54-57]</sup>

### 2.2.1 Integrin $\alpha_4\beta_1$ und VCAM1

Integrin  $\alpha_4\beta_1$  wird auf den Zelloberflächen von T- und B-Lymphocyten, natürlichen Killerzellen, Monocyten, basophilen und eosinophilen Granulocyten gefunden und spielt eine wichtige Rolle bei der Rezirkulation der Leukocyten im Immunsystem. <sup>[55;58]</sup> Dieses Integrin kontrolliert normale biologische Immunprozesse und ist für viele pathologische Prozesse von Bedeutung. Eine Aggregation von Leukocyten wird durch eine homophile Interaktion des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  verursacht. Dabei wird Integrin  $\alpha_4\beta_1$  auf verschiedenen Zellen exprimiert. <sup>[59]</sup> Als natürliche Liganden des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  kommen VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), Fibronectin und Osteopontin vor. <sup>[55]</sup>

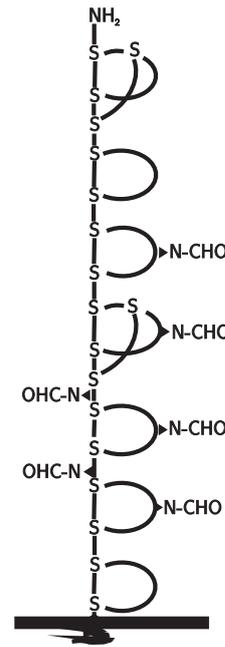
Fibronectin enthält drei Bindestellen für Integrin  $\alpha_4\beta_1$ . Eine der Bindestellen für das Integrin  $\alpha_4\beta_1$  in Fibronectin befindet sich in der alternativ gespleißten Region, die als variable Region V oder verbindendes Segment des Typs III (*connecting segment IIIc*)

bezeichnet wird.<sup>[60]</sup> Dieses Erkennungsmotiv entspricht der Aminosäuresequenz LDV. In dieser Region wurde eine andere zusätzliche Erkennungssequenz REDV für Integrin  $\alpha_4\beta_1$  entdeckt, für die allerdings eine schwächere Affinität nachgewiesen wurde. Die dritte Bindestelle dieses Integrins befindet sich innerhalb der C-terminalen Heparinbindedomäne des Fibronectins mit der Erkennungssequenz IDA.<sup>[57,58,60,61]</sup>

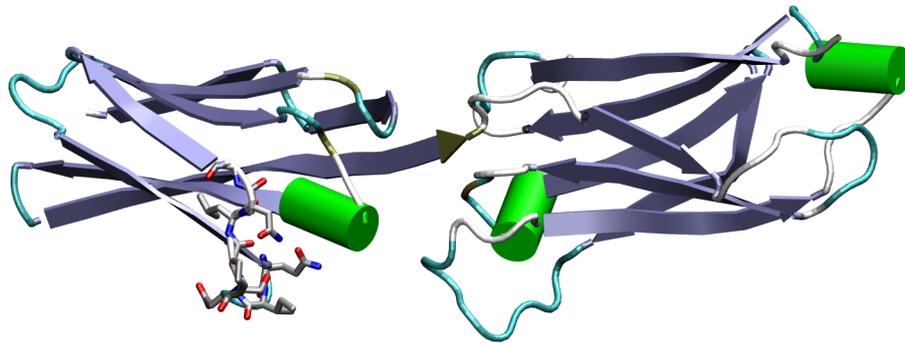
VCAM-1 fungiert als Hauptligand von Integrin  $\alpha_4\beta_1$ . Dieses Protein wird auf der Oberfläche von Endothelzellen kleiner Venen nach der Aktivierung mit Polysaccharid und Entzündungscytokinen präsentiert.<sup>[62]</sup> Als Konsequenz der Interaktion dieses Proteins mit Integrin  $\alpha_4\beta_1$ , das auf unterschiedlichen Lymphocyten und Leukocyten präsentiert wird, können die Lymphocyten durch die Venenwände aus dem Blutstrom in andere Gewebe eindringen und sich anschließend an der Entzündungsstelle ansammeln.<sup>[62]</sup> Die Interaktion des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  mit VCAM-1 ist ebenfalls in die Blutbildung (Hämatopoese) involviert. Die Bindung der Blutstammzellen und Vorläuferzellen an die Bindegewebszellen des Knochenmarks wird über diese Interaktion unterstützt.<sup>[63]</sup>

VCAM-1 gehört zu der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF), und ist in zwei gespleißten Varianten, die als VCAM-6D und VCAM-7D bezeichnet werden, bekannt. Die beiden Varianten des VCAM-1 enthalten dementsprechend sechs bzw. sieben immunoglobulinartige Domänen, die in den Extrazellulärraum ragen. Die Immunglobulin-Domänen werden ausgehend vom N-Terminus mit D1 bis D6 bzw. D7 nummeriert (Abb. 2.7). Die ersten drei Domänen D1-D3 weisen eine hohe Homologie mit den Domänen D4-D6 auf. Die Erkennungssequenzen für Integrin  $\alpha_4\beta_1$  befindet sich in den Domänen D1 und D4, wobei die letzte in der kürzeren VCAM-6D Variante fehlt. Jede Immunglobulin-Domäne des VCAM-1 enthält sieben  $\beta$ -Faltblätter, die mit A bis G bezeichnet werden.

Die Röntgenstruktur der ersten zwei Domänen des N-terminalen Fragments des VCAM-1 zeigt, dass sich die Erkennungssequenz QIDSP innerhalb der Schleife (CD-loop) befindet und auf der Oberfläche von VCAM-1 präsentiert wird. Diese Schleife verbindet zwei  $\beta$ -Faltblätter (C und D) der ersten Domäne (D1) im Protein.<sup>[64]</sup> Die Sequenz dieser Schleife umfasst



**Abbildung 2.7:** Modell der längeren Variante VCAM-7D. Die sieben Domänen sind in Form von Schleifen dargestellt.



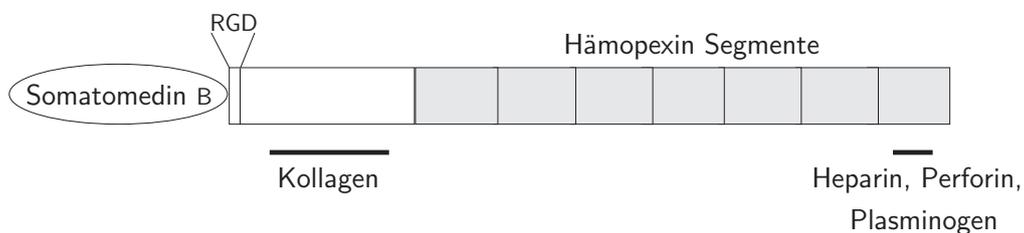
**Abbildung 2.8:** Röntgenstruktur der ersten und zweiten immunoglobulinartigen Domäne des humanen VCAM-1 mit einer Auflösung von 0.19 nm. Die vermutliche Erkennungssequenz TQIDSPLN ist mit Hilfe des Atommodells dargestellt.<sup>[65]</sup>

acht Aminosäuren TQIDSPLN (37-44) (Abb. 2.8).<sup>[65]</sup> Das vollständige Erkennungsmotiv TQIDSPLN wurde als Ausgangsstruktur für Design und Synthese der Peptidliganden und Peptidomimetika-Liganden des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  verwendet (siehe Kap. 2.3).<sup>[66]</sup>

### 2.2.2 Integrin $\alpha_v\beta_3$ und Vitronectin

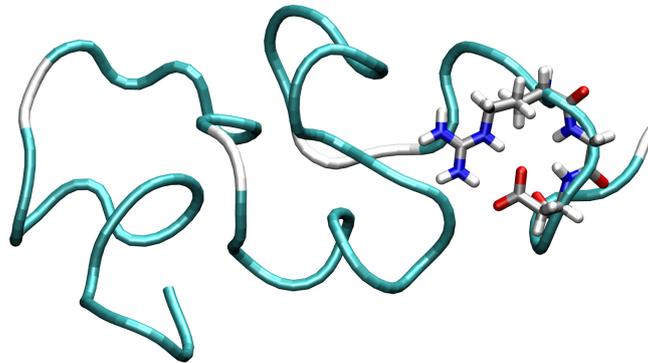
Vitronectin, welches auch *serum spreading* Faktor oder s-Protein genannt wird, ist ein multifunktionelles Glycoprotein, das im Blutplasma und in der extrazellulären Matrix gefunden wird. Einige biologische Funktionen des Vitronectins sind bekannt. Vitronectin unterstützt Anheftung und Ausbreitung der Zellen und reguliert die Koagulation des Blutes durch Modulation der Aktivität des Thrombin-Antithrombin-Komplexes und des Plasminogen Aktivator Inhibitor 1.<sup>[67,68]</sup>

Vitronectin ist ein relativ kleines Protein von 75 kDa, das enzymatisch gespalten werden und als ein durch eine Disulfidbrücke gebundener 65 kDa + 10 kDa Konstrukt vorkommen kann. Am N-Terminus des Vitronectins ist eine Somatomedin B-Domäne lokalisiert (Abb.



**Abbildung 2.9:** Schematischer Aufbau des Vitronectins. Am C-Terminus des Vitronectins befindet sich die Somatomedin B-Domäne, benachbart zum RGD Motiv. Die Bindestellen der anderen Liganden sind mit schwarzen horizontalen Balken markiert.

2.9). Benachbart ist ein RGD Aminosäuremotiv zu finden, welches als Bindungsstelle für Integrine dient (Abb. 2.10).<sup>[69,70]</sup> Anschließend folgt eine Domäne mit Kollagen-Bindestellen. Der Rest des Moleküls besteht aus sieben wiederholenden Hämopexin-Segmenten.<sup>[71]</sup> Besonders wichtig für die biologische Funktion des Vitronectins ist das letzte Hämopexin-Segment, welches eine Heparin-Bindestelle mit einem hohen Anteil basischer Aminosäuren aufweist. Diese Stelle ist ebenfalls für die Bindung von Plasminogen Aktivator Inhibitor 1, Plasminogen und Perforin an Vitronectin verantwortlich.<sup>[72]</sup> Vitronectin ist im Plasma meistens in einer nicht aktiven Form lokalisiert. Die geschlossene Form wird durch Wechselwirkung zwischen den sauren Aminosäureresten, die nah des N-Terminus lokalisiert sind, und einem basischen Fragment, das sich innerhalb der Heparin-Bindestelle befindet, stabilisiert.<sup>[73]</sup>



**Abbildung 2.10:** Struktur der N-terminalen Domäne des humanen Vitronectins bestimmt durch NMR. Die RGD Erkennungssequenz ist im Atommodell dargestellt.<sup>[70]</sup>

Vitronectin erkennt die Integrine  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_v\beta_1$ , wobei Integrin  $\alpha_v\beta_3$  als wichtigster Vitronectin-Bindungspartner fungiert. Aus diesem Grund wird Integrin  $\alpha_v\beta_3$  als Vitronectin-Rezeptor bezeichnet. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  ist gleichzeitig ein Rezeptor vieler anderer Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Fibrinogen, Fibrin, von Willebrand Faktor, Trombospondin, Tenascin, Osteopontin und Fibrillin.<sup>[55]</sup> Dieses Integrin bindet ebenfalls an das zelluläre Protein PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*). Auf diese Weise ist  $\alpha_v\beta_3$  an der Zell-Zell Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukocyten beteiligt.<sup>[74]</sup>

Integrin  $\alpha_v\beta_3$  ist in viele Zelladhäsionsphänomene involviert. So spielt dieses Protein eine wichtige Rolle unter anderem bei der Angiogenese<sup>[75]</sup>, der Tumormetastasierung<sup>[76]</sup>, der Knochenresorption<sup>[77]</sup>, dem akuten Nierenversagen und der Phagozytose von Zellen, die in die Apoptose übergehen.<sup>[78]</sup>

Integrin  $\alpha_v\beta_3$  wird vor allem auf Tumorzellen präsentiert. Zu diesen Tumorzellarten zählen Osteosarkome, Lungen-, Brust-, Prostata-, Blasenkarzinome sowie invasive Melanome und Neuroblastome.<sup>[20]</sup> Bei der Tumoermetastasierung sind mehrere Schritte beteiligt. Zunächst verlassen Tumorzellen den Primärtumorverband und wandern durch das lymphatische System und die Blutgefäße bis sie das Kapillarsystem des Zielorgans erreichen und dort Metastasen bilden. Parallel dazu erfolgt die tumorinduzierte Blutgefäßneubildung (Angiogenese).<sup>[20,79]</sup>

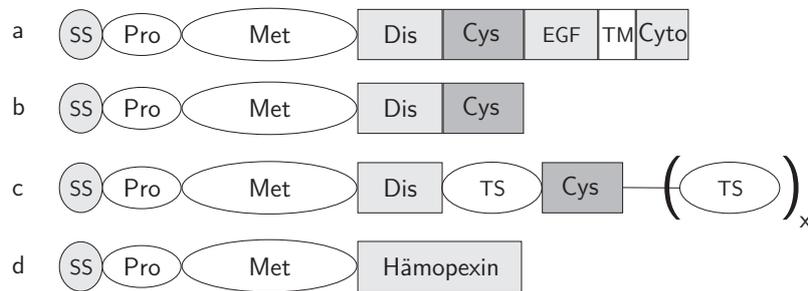
Angiogenese spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Organen und bei der Wundheilung. Die dabei ablaufende Prozesse werden durch Zelladhäsion kontrolliert und sind auf die beteiligten Zellen und eine bestimmte Zeit begrenzt. An der Kontrolle der Angiogenese sind Cytokine, Wachstumsfaktoren, wie z. B. Tumornekrosefaktor  $\text{TNF-}\alpha$ , und Angiogenin beteiligt.<sup>[80]</sup> Angiogenese spielt, wie schon früher erwähnt, ebenfalls in der Pathophysiologie mancher Krankheiten eine Rolle. Bei der rheumatischen Arthritis führt die Angiogenese zur Zerstörung des Knorpels der Gelenke. Bei Diabetes führt ein unkontrolliertes Wachstum der Blutgefäße in der Retina zu Blutungen und zur Zerstörung des Glaskörpers. Dies kann Erblindung verursachen.<sup>[81]</sup> Bei allen diesen Prozessen spielt die Interaktion des  $\alpha_v\beta_3$  mit Vitronectin, mit dem RGD Motiv als Erkennungssequenz, eine essentielle Rolle. Diese Tripeptidsequenz dient als Basisstruktur zur Entwicklung von Peptidliganden, die die oben genannten Prozesse inhibieren können (siehe Kap. 2.3).

### 2.2.3 ADAM Proteine

ADAM Proteine – (*a disintegrin and metalloproteases*) sind Transmembranproteine, die zur Superfamilie der Zink-Proteasen gehören. Zink-Proteasen werden aufgrund der primären Struktur ihres katalytischen Zentrums in weitere Unterfamilien, wie Gluzincine, Metzincine, Inuzincine, und Carboxypeptidasen unterteilt. Die Metzincin-Familie ist in weitere Untergruppen, wie die Serralysine, Astacine, Matrixine und Adamalysine, gegliedert. Die ADAM Proteine gehören zur letzten Gruppe.

Die Metalloproteinase-Domäne der Adamalysine zeigt in der Struktur Ähnlichkeit zu den Proteinen der Matrixinfamilie. Im Gegensatz zu den Matrixinen besitzen ADAM Proteine eine zusätzliche Disintegrin-Domäne, die eine Bindung an Integrin-Rezeptoren ermöglichen sollte.<sup>[82]</sup>

Die ADAM Proteine zeigen einen komplexen Aufbau bestehend aus mehreren Domänen. Sie enthalten Pro-, Metalloproteinase-, Disintegrin-, cysteinreiche, EGF-ähnliche Domänen sowie einen transmembranen und cytoplasmatischen Teil. Bisher wurden 34 ADAM Gene identifiziert, 19 wurden im humanem Genom gefunden.<sup>[83]</sup> Zur Adamalysin-Proteinfamilie



**Abbildung 2.11:** Aufbau von ADAM und verwandten Metalloproteinasen; a) ADAM Proteine, b) Schlangengiftmetalloproteinase, c) ADAM-TS Proteine, d) Matrixmetalloproteinase. SS steht für Signalsequenz, Pro, Met, Dis, Cys, EGF, TM, Cyto stehen für Pro-, Metalloproteinase-, Disintegrin-, cysteinreiche, EGF-ähnliche, transmembrane und cytoplasmatische Domänen. TS bezeichnet die Thrombospondin-ähnliche Domäne in ADAM-TS Proteinen. Durch "x" wird die variierende Anzahl der TS Domänen in ADAM-TS Proteinen markiert. Hämopexin steht für eine Hämopexin-ähnliche Domäne in Matrixmetalloproteinasen.

gehören ebenfalls die Schlangengiftmetalloproteinasen (*snake venom metalloprotease* SVMP) der Klasse III und ADAM-TS Proteine, die einige strukturelle Abweichungen von ADAM aufweisen. Ihr schematischer Aufbau ist in Abbildung 2.11 dargestellt.<sup>[83]</sup>

Die ADAM Proteine werden manchmal in mehrere Formen gespleißt (z.,B. ADAM12, ADAM22, ADAM29 oder ADAM30). Im Fall von ADAM12 sind zwei Formen bekannt. Die L Form dieses Protein ist in der Zellmembran verankert, während in der s Form die transmembrane und cytoplasmatische Domäne fehlen. Dadurch wird die kürzere s Form dieses Protein aus einer Zelle sezerniert.<sup>[84]</sup>

### 2.2.3.1 Funktion der Domänen in ADAM Proteinen

Der Multidomänenbau der ADAM Proteine ermöglicht es diesen Proteinen mehrere Funktionen zu erfüllen. Die Pro-Domäne der ADAM Proteine spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Proteins. Solange die Pro-Domäne vorhanden ist, befindet sich das Protein im nicht aktiven Zustand. Das verwendete Aktivierungsmechanismus wird als *cystein switch* bezeichnet. Konservierte Cysteinreste innerhalb der Pro-Domäne koordinieren bevorzugt das Zink-Kation des aktiven Zentrums und halten dadurch das Protein in nicht aktiver Form. Die Proprotein-Konvertase (PC) schneidet das Proprotein in dem konservierten Motiv RXKR bzw. RXRR. In Folge dessen wird die Pro-Domäne von dem Protein getrennt und die Koordination des Zink-Kations wird durch die Metalloproteinase-Domäne übernommen. Dieser Mechanismus wird von vielen Studien unterstützt. ADAM15 wird *in vitro* durch die Proprotein-Konvertase Furin geschnitten.<sup>[85]</sup> Die Überexpression von

bestimmten Proprotein-Konvertasen wie Furin und PC7 verursacht, dass die Menge des prozessierten ADAM10 Proteins *in vivo* steigt. Zusätzlich wird die Prozessierung dieses Proteins durch Peptidanaloga inhibiert, die die Schnittstelle der Proprotein-Konvertasen nachahmen.<sup>[86]</sup> Der oben beschriebene Mechanismus der Prozessierung der ADAM Proteine wird auch durch die Mutagenesestudien der Schnittstellen der Proprotein-Konvertasen bestätigt. In Folge dessen wird keine Umwandlung der ADAM Proteine zur aktiven Form beobachtet.<sup>[86]</sup> Eine andere bekannte Funktion der Pro-Domäne ist die Unterstützung der korrekten Proteinfaltung (Chaperon-Funktion). Studien mit ADAM17 zeigten, dass die Entfernung der Pro-Domäne zu einer katalytisch inaktiven Form dieses Proteins führt.<sup>[87]</sup>

Eine der wichtigsten Funktionen der ADAM Proteine ist der Abbau und Umbau der extrazellulären Matrix. Die Aufklärung der Kristallstruktur der Metalloproteinase-Domäne einiger ADAM Proteine, einschließlich ADAM17, ermöglichte eine genauere Charakterisierung des Mechanismus der proteolytischen Aktivität der ADAM Proteine. Im aktiven Zentrum der Metalloproteinase-Domäne befinden sich ein Zink-Kation und ein Wassermolekül. Diese werden durch konservierte Histidinreste und Methionin koordiniert. Das Methionin befindet sich in einem Methionin-*turn* Motiv, welches gegenüber des Histidinmotivs HEXXHXGXHXH lokalisiert ist. Das Histidinmotiv ist innerhalb einer  $\alpha$ -Helix positioniert, so dass sich die Histidinreste auf einer Seite der  $\alpha$ -Helix befinden und sich an der Koordination des Zink-Kations im aktiven Zentrum beteiligen können.<sup>[88]</sup> Die katalytische Aktivität der ADAM Proteine kann durch diverse Inhibitoren gehemmt werden. Diese können in vier Untergruppen unterteilt werden. Zu den ersten beiden Gruppen gehören nicht selektiv reduzierende Verbindungen und  $Zn^{2+}$  chelatisierende Verbindungen. Die dritte Gruppe umfasst Hydroxamat-basierte Verbindungen, die das aktive Zentrum der ADAM und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) blockieren. Zur vierten Gruppe gehören Peptidverbindungen, deren hydrophober Teil sich in das aktive Zentrum anpasst und dieses dadurch unzugänglich macht.<sup>[83]</sup> Endogen wird die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen durch TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteases*) reguliert.<sup>[89]</sup> TIMPs zeigen jedoch nicht gegen alle ADAM Proteine Aktivität. TIMP3 inhibiert z. B. ADAM17 während ADAM10 durch TIMP1 und TIMP3 inhibiert wird.<sup>[90]</sup> Die enzymatische Aktivität von ADAM8 und ADAM9 ist durch TIMPs nicht reguliert.<sup>[91]</sup>

Die zweitwichtigste Funktion der ADAM Proteine, die Bindung an Integrin-Rezeptoren, wird durch die Disintegrin-Domäne vermittelt. Die Disintegrin-Domäne ist aus den Schlangengift-Proteinen bekannt (Abb. 2.11), in welchen diese für die Bindung an die Integrin-Rezeptoren der Blutplättchen verantwortlich ist. In Folge dessen wird die Assoziation von Blutplättchen an den wichtigsten Liganden, Fibrinogen, verhindert und die Blutplättchen-Aggregation unterdrückt. Diese disintegrinvermittelten Störungen der Funktion der ex-

trazellulären Matrix nach einem Schlangenbiss verursachen schwere Blutungen und führen zum Tod.<sup>[83]</sup> Die Disintegrin-Domäne der ADAM Proteine wird gerne mit solchen Schlangengiftproteinen verglichen, bei welchen die Bindung an die Integrine häufig über RGD Erkennungssequenzen erfolgt. Dieses Erkennungsmotiv befindet sich innerhalb der Disintegrin-Schleife in der Disintegrin-Domäne der SVMP. Die Disintegrin-Schleife ist, wie im Fall des bekannten Integrinliganden Fibronectin, auf der Proteinoberfläche lokalisiert.<sup>[92]</sup>

ADAM15 bindet an die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$ , und ist das einzige ADAM Protein mit einem RGD Erkennungsmotiv innerhalb der Disintegrin-Domäne. Die Mutation dieses Motivs blockiert die Bindung des ADAM15 an Integrin  $\alpha_v\beta_3$  vollständig.<sup>[93,94]</sup> Die Anwesenheit des RGD Motivs ist jedoch nicht essentiell für die Bindung der Integrine an andere ADAM Proteine. Die Sequenzanalyse der Disintegrin-Domäne innerhalb der ADAM Proteinfamilie zeigt Unterschiede in der primären Struktur innerhalb der Disintegrin-Schleife (Tab. 2.3). Allerdings, wurde gezeigt, dass ADAM12 und ADAM15 Liganden des Integrins  $\alpha_9\beta_1$  sind. In diese Interaktionen sind nicht RGD-Motive sondern andere Erkennungssequenzen involviert.<sup>[95]</sup> Integrin  $\alpha_6\beta_1$  bindet an ADAM1 und ADAM2, diese Wechselwirkungen sind bei der Fertilisation beteiligt. ADAM28 bindet an Integrin  $\alpha_4\beta_1$ . Bei dieser Interaktion sind das Tripeptid KDE der Disintegrin-Schleife sowie andere, saure Aminosäurereste, die sich

ADAM Protein	alternativer Name	Disintegrin-Schleife
hADAM2	Fertilin $\beta$	CRPS <b>FEE</b> CDLP
hADAM7	GP-83	CRPA <b>KDE</b> CDFP
hADAM8	CD156	CRPK <b>KDM</b> CDLE
mADAM8	CD156	CRLS <b>KDK</b> CDLE
hADAM9	MDC-9	CRGKT <b>SE</b> CDVP
hADAM11 (1)	MDC-524	CREA <b>VNE</b> CDIA
hADAM11 (2)	MDC-769	CREA <b>VNE</b> CDIA
hADAM12 (1)	Meltrin-S	CRDSS <b>NS</b> CDLP
hADAM12 (2)	Meltrin-L	CRDSS <b>NS</b> CDLP
hADAM15	MDC-15	CRPTR <b>GD</b> CDLP
hADAM20		CRQQ <b>VGE</b> CDLP
hADAM21		CRQE <b>VNE</b> CDLP
hADAM22 (1)	MDC-2 $\alpha$	CREA <b>VND</b> CDIR
hADAM22 (2)	MDC-2 $\beta$	CREA <b>VND</b> CDIR
hADAM23	MDC-3	CRDA <b>VNE</b> CDIT
hADAM28	MDC-L	CRPA <b>KDE</b> CDLP

**Tabelle 2.3:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der ausgewählten ADAM Proteine innerhalb der Disintegrin-Schleife. Die vorgeschlagenen Tripeptid-Erkennungssequenzen für die Integrine sind rot markiert. Im Fall von ADAM11, ADAM12 und ADAM22 wurden die Sequenzen der beiden gespleißten Proteinformen (1 und 2) angegeben.<sup>[96,97]</sup>

außerhalb der Disintegrin-Schleife des ADAM Proteins befinden, beteiligt.<sup>[97]</sup> In vielen Fällen sind die genauen Mechanismen der Adhäsion der ADAM Proteine an Integrine noch nicht geklärt. Da diese Interaktionen in vielen physiologischen Prozessen, wie z. B. Fertilisation oder Immunantwort, beteiligt sind, ist die adhäsive Funktion der ADAM Proteine ein interessantes Forschungsobjekt.

Im Fall von ADAM8 wurde von einer homophilen Interaktion berichtet, die über die Disintegrin-Domäne vermittelt wird und in die Zelladhäsion im zentralen Nervensystem involviert ist.<sup>[98]</sup> ADAM8 wird auf der Oberfläche von Makrophagen, Neuronen und Oligodendrocyten präsentiert. Überexpression dieses Proteins nach der Neurodegeneration im zentralen Nervensystem auf Gliazellen, Astrocyten und Mikroglia suggeriert, dass ADAM8 eine Rolle bei der Interaktion zwischen Glia- und Nervenzellen spielen kann.<sup>[98]</sup> Schluesener zeigte, dass die Disintegrin-Domäne des ADAM8 Proteins eine wichtige Rolle im Verlauf der Immunerkrankungen des zentralen Nervensystems spielen kann.<sup>[99]</sup> Aufgrund der potenziellen Rolle des ADAM8 Proteins im Immun- und Nervensystem sind sowohl die Interaktionen dieses Proteins mit Integrinliganden, als auch seine homophilen Interaktion ein bedeutendes Forschungsgebiet. Die Untersuchung dieser Wechselwirkungen und die Entwicklung von Peptidliganden, die diese Wechselwirkungen hemmen, können relevante Information in Hinblick auf die Entwicklung von Medikamenten liefern.

Die vollständige Funktion der cysteinreichen und EGF-ähnlichen Domäne wurde bisher noch nicht geklärt. Es wird angenommen, dass die cysteinreiche Domäne die Bindungskapazität der Disintegrin-Domäne ergänzt und möglicherweise die Selektivität der ADAM Proteine unterstützt.<sup>[83]</sup> Der cytoplasmatische Teil der ADAM Proteine ist in die Signaltransduktion involviert.

### 2.2.4 Bakterielle und virale Liganden

Integrine werden in vielen Fällen durch Viren und Mikroorganismen zum Anheften an die Wirtszelloberfläche und darauf folgenden Eindringen in das Zellinnere verwendet. Neben anderen Oberflächenrezeptoren wie z. B. VCAM-1 und ICAMs werden Integrine am häufigsten zu diesem Zweck ausgenutzt.<sup>[100]</sup>

Integrin  $\alpha_2\beta_1$  dient als Rezeptor für den Echovirus, während Integrin  $\alpha_v\beta_5$  einen der vielen Rezeptoren des Adenovirus darstellt.<sup>[49,101]</sup> Ein weiteres Beispiel ist Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , das sich das FMDV (*foot and mouth disease virus*) Virus bei der Erkennung der Wirtszelle zunutze macht.<sup>[65]</sup>

Integrine können ebenfalls die Adhäsion von Bakterien und ihre Internalisierung in die Wirtszellen vermitteln. Die bekanntesten Beispiele der Verwendung der Integrine durch

Bakterien sind Infektionen mit Mikroorganismen wie *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Coxiella burnetii*.<sup>[102–104]</sup>

*Yersinia pseudotuberculosis* sind pathogene gramnegative Bakterien, welche zuerst das Lumen des Darms infizieren. In der ersten Phase bindet *Y. pseudotuberculosis* an die Integrin-Rezeptoren, die auf der Oberfläche der M Zellen im Darm vorkommen. Die in dieses Infektionsereignis involvierten Integrine binden an Invasin, welches ein Protein der äußeren Bakterienmembran darstellt. Invasin erkennt zumindest fünf unterschiedliche  $\beta$ -Integrine wie  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$  und ist somit verantwortlich für das Eindringen der *Yersinia* in die M-Zellen des Darms. Eine Internalisierung von *Y. pseudotuberculosis* führt zur nachfolgenden Translokation der Bakterien in die lokalen Lymphknoten.<sup>[103]</sup>

*Coxiella burnetii*, der Erreger des Q-Fiebers, dringt in humane Monocyten ein und besiedelt sie. Das Eindringen von *C. burnetii* in die Wirtszellen wird durch Integrin  $\alpha_v\beta_3$  ermöglicht. In infizierten Zellen wird die Produktion von entzündungsinduzierenden Cytokinen einschließlich des Tumornekrosefaktor (TNF) stimuliert. Schon die Adhäsion von *C. burnetii* an die Monocyten ist ausreichend, um die Cytokinproduktion zu induzieren. In diesem Fall wird das biologische Signal durch Integrin  $\alpha_v\beta_3$  vermittelt. Dieses Integrin ist in die Synthese von TNF involviert und kann mit Hilfe von RGD-Peptiden bzw. blockierenden Antikörpern gegen Integrin  $\alpha_v\beta_3$  gehemmt werden.<sup>[104]</sup>

#### 2.2.4.1 Integrine als *Helicobacter pylori*-Rezeptoren?

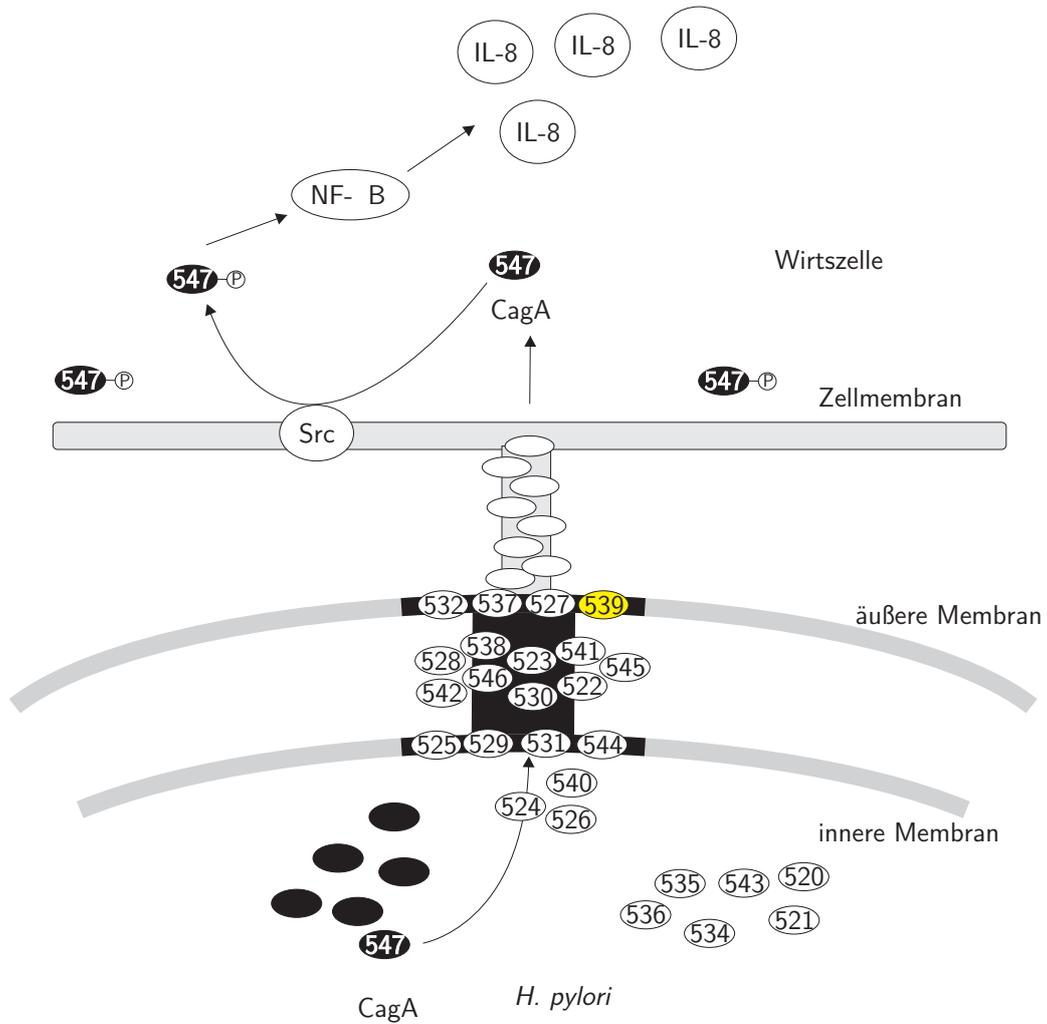
*Helicobacter pylori* ist ein humanspezifisches gramnegatives Bakterium, welches die Magenschleimhaut des Menschen besiedelt und ihre Epithelzellen infiziert. Hauptsächlich werden *H. pylori*-Stämme in zwei Familien, Typ I und II, unterteilt.<sup>[105]</sup> Die Klassifizierung beruht auf der Anwesenheit bzw. Abwesenheit der *cag* Pathogenitätsinsel (*cag* PAI) (*cytotoxic associated gene pathogenicity island*) in dem Genom von *H. pylori*. Typ I besitzt *cag* PAI, welche in Typ II fehlt.<sup>[105]</sup> Die Infektion mit diesem Bakterium verursacht unterschiedliche Magen-Darm-Krankheiten, wie z. B. Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre oder sogar Magenkrebs.<sup>[106,107]</sup> Allerdings zeigten serologische Studien von mit *H. pylori* infizierten Patienten, dass die Infektion mit *H. pylori* des Typs II starke Magenschäden verursacht, während die Änderungen im Magenbereich nach der Infektion mit *H. pylori* des Typs I eher mild sind. Die *cag* PAI kodierten Proteine spielen folglich eine wichtige Rolle in der Pathogenität von *H. pylori*.<sup>[105]</sup> Viele der Virulenzfaktoren wurden allerdings in allen Stämmen gefunden. Dazu zählen das Enzym Urease, das das azide Milieu des Magens neutralisiert und somit das Überleben des Bakteriums sichert, die Anwesenheit

von Flagellen und das multifunktionelle *vacuolating* Cytotoxin VacA.<sup>[108]</sup>

Die *Cag* Pathogenitätsinsel umfasst ein 40 kbp DNA-Fragment und kodiert mehrere Komponenten des Typs IV Sekretionssystems (TFSS, *type four secretion system*).<sup>[109–111]</sup> Das komplexe TFSS besteht aus einem Sekretionskanal in der Bakterienmembran und einem extrazellulären Pilus. *Cag* PAI enthält 27 Gene, die eine hohe Sequenzhomologie mit dem TFSS anderer Bakterien aufweisen. Das am besten charakterisierte TFSS ist das Sekretionssystem des *Agrobacterium tumefaciens*. *A. tumefaciens* ist in den Transfer von DNA in die Wirts-Pflanzenzelle involviert.<sup>[112,113]</sup>

Eines der Gene innerhalb der *cag* PAI, *cagA*, kodiert ein Substrat für TFSS. Das Substrat, CagA Protein, wird in die Wirtszelle sezerniert und verursacht zahlreiche Änderungen in der Signaltransduktion der Wirtszelle.<sup>[114]</sup> Das CagA Protein wird an seinen Tyrosinresten durch die eukaryontische Src-Kinase phosphoryliert. Das phosphorylierte Protein wird in die Nähe der Membranstellen der Wirtszelle geleitet, an welcher das Bakterium angeheftet wird. Zu den wichtigsten Konsequenzen der Infektion der Epithelzelle durch *H. pylori* gehört eine erhöhte Produktion von Cytokinen wie Interleukin-8 (IL-8) durch die Wirtszelle. Während des Kontakts zwischen *H. pylori* und der Epithelzelle werden Signal-Kaskaden induziert, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin und ERK-Kinase (*extracellular signal-regulated kinase*) involvieren. Die ERK-Kinase induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der die IL-8 Produktion aktiviert.<sup>[117]</sup> Ein vereinfachtes Schema des Typ IV Sekretionssystems ist in Abbildung 2.12 dargestellt. Interessanterweise verursacht das phosphorylierte CagA Protein die Inaktivierung von Src-Kinase, woraus eine Dephosphorylierung mehrerer Wirtszellproteine resultiert. Dieser Mechanismus kann zur Etablierung eines chronischen Zustands führen, in welchem die durch das CagA Protein verursachte Cytotoxizität vermindert wird.<sup>[116]</sup> Mutagenesestudien zeigten, dass lediglich 18 der 27 Gene der *cag* PAI absolut essentiell für die Translokation des CagA Protein sind und 14 für die *cag* PAI-abhängige Induktion von IL-8 Cytokin.<sup>[115]</sup>

Die durch *H. pylori* induzierten Signalwege sind in der Literatur ausführlich beschrieben, demgegenüber sind die Adhäsionsmechanismen bislang unklar.<sup>[109,116]</sup> Die Sequenzanalyse der durch *cag* PAI kodierten Proteine zeigte, dass das Protein CagL (Protein 539 in Abbildung 2.12) das einzige Protein ist, das ein RGD Aminosäuresequenzmotiv enthält. Dies kann als eine Erkennungssequenz für Integrine fungieren.<sup>[48]</sup> Das CagL Protein stellt aus diesem Grund einen interessanten Forschungsbereich im Aspekt der Adhäsionsfunktion von *H. pylori* an der Wirtszelle dar und seine Wechselwirkungen mit Integrinen ist ein Forschungsobjekt dieser Arbeit.



**Abbildung 2.12:** Vereinfachtes Modell des Typ IV Sekretionssystems von *Helicobacter pylori*<sup>[115]</sup> und der Signaltransduktion des CagA Proteins<sup>[116]</sup>. Die 27 Proteine des TFSS sind markiert. Das CagA Protein (547) wird in die Wirtszelle sezerniert, phosphoryliert und in die weitere Signalübertragung involviert. Das Protein 539, als vorgeschlagener Ligand humaner Integrine, ist gelb markiert.

## 2.3 Peptide

### 2.3.1 Peptide als Wirkstoffe

Native Peptide können als Medikamente nur bei limitierten Indikationen eingesetzt werden. Das größte Problem stellt die Degradation der Peptide durch Proteinasen dar. Native Peptide zeigen ebenfalls unerwartete Nebenwirkungen, die durch die hohe Flexibilität der Seitenketten verursacht werden und so zu Wechselwirkungen mit verschiedenen Rezeptoren führen. Weiterhin ist die Permeabilität biologischer Membranen für die hydrophilen Peptide gering, was einen weiteren großen Nachteil darstellt. Die Ausscheidung der Peptide aus dem Organismus und die Unfähigkeit nativer Peptide zum Passieren der biologischen Schranke, wie z. B. der Hirn-Blut-Schranke, stellen weitere Probleme dar.

In den letzten Jahren wurden signifikante Fortschritte in der Peptidchemie gemacht, so dass mit Hilfe von chemischen Modifikationen das Design biologisch aktiver und selektiver Peptidliganden möglich ist. Diese können als pharmakologisch aktive Substanzen verwendet werden und als Leitstruktur zur Entwicklung weiterer Medikamente eingesetzt werden.

Als Beispiel kann das Peptid T20 erwähnt werden, welches in der Therapie von HIV (*human immunodeficiency virus*) unter dem Namen Fuzeon® (*enfuvirtide*, *pentafuside*) eingesetzt wird. Das Peptid enthält 36 Aminosäuren und bindet kompetitiv an das durch den Virus präsentierte Glycoprotein GP41. Auf diese Weise wird die Bildung der *hairpin* Struktur innerhalb des HR1 (*heptad repeat 1*) Fragments von GP41 Protein, welche zur Fusion des HIV-Virus mit der Zielzelle notwendig ist, inhibiert.<sup>[118,119]</sup> Das Peptid T20 eröffnete neue Wege in der anti-HIV Therapie und führte bislang zur Entwicklung neuer peptidischer Fusionsinhibitoren, wie z. B. T1249 und N36 Wirkstoffe, welche mit einem IC<sub>50</sub>-Wert im nanomolaren Bereich identifiziert wurden.<sup>[119]</sup>

Als Anhaltspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente steht die Integrin-Proteinfamilie im Zentrum des Interesses vieler Laboratorien auf der ganzen Welt. Integrine vermitteln eine Vielzahl biologischer und pathophysiologischer Prozesse. Die dabei beteiligten Zell-Zell und Zell-extrazelluläre Matrix Wechselwirkungen erfolgen durch kurze Aminosäure-Erkennungssequenzen, die auf der Oberfläche der Integrinliganden lokalisiert sind. Dies weckt das pharmakologische Interesse an Integrin-Antagonisten. Die Entwicklung von Integrinliganden, die zur Kontrolle der Pathophysiologie und der Hemmung diverser Prozesse führen würde, ist eine der aktuellsten Aufgaben der chemischen Medizin.

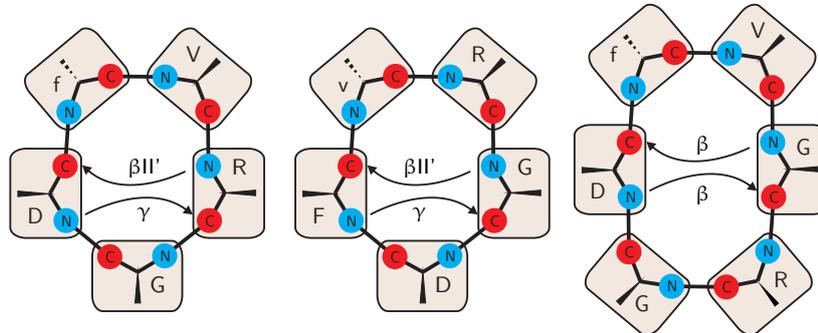
### 2.3.2 RGD-Peptide als Integrinliganden

Zu den wichtigsten Erkennungssequenzen der Integrine gehört die Arg-Gly-Asp Aminosäuresequenz (RGD Motiv). Diese Sequenz ist bei vielen Integrine (Tab. 2.2) an der Wechselwirkung mit Liganden beteiligt und dient als Ausgangsstruktur zur Entwicklung verschiedenster Antagonisten. Zu den am häufigsten untersuchten Integrinen, die die Arg-Gly-Asp Aminosäuresequenz in Liganden erkennen, gehören die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Liganden von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  werden zur Inhibierung der Blutplättchen-Aggregation eingesetzt, während Liganden von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  zur Hemmung von tumorinduzierter Angiogenese und Tumormetastasierung verwendet werden (Kap. 2.1.4, 2.2.2).

Die lineare RGD Aminosäuresequenz weist eine relativ geringe Affinität zu Integrinen auf. Die große Flexibilität der linearen Peptide wird durch die Zyklisierung des Peptidrückgrats verringert. Dies resultiert in erhöhter Aktivität der Peptide, falls dadurch die Erkennungssequenz an die rezeptorgebundene Konformation angenähert wird.<sup>[120,121]</sup>

Infolge einer Zyklisierung des Peptides werden bestimmte Strukturelemente induziert. Das Auftreten von definierten  $\beta$ - oder  $\gamma$ -turns in zyklischen Peptiden spielt eine signifikante Rolle für die biologische Aktivität dieser Verbindungen. Die Einführung von Peptid-Bausteinen, wie z. B. D-Aminosäuren oder  $\beta$ -Aminosäuren, kann zur Optimierung der Sekundärstruktur führen. Der Einbau von D-Aminosäuren erzeugt eine Einschränkung der Flexibilität des Peptidrückgrats und eine Stabilisierung diskreter Konformationen. Er führt ebenfalls zur Erhöhung der Proteinasestabilität, da die Peptidbindungen der synthetischen Aminosäuren von den Enzymen meist nicht angegriffen werden. D-Aminosäuren bevorzugen die  $i+1$  Position eines  $\beta$ II'-turn.<sup>[122]</sup> Aumailley *et al.* zeigten, dass die zyklischen Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) und cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-) im Vergleich zu ihren linearen Varianten eine erhöhte Affinität zu Integrinen aufweisen. Die inhibitorische Aktivität zyklischer Peptide stieg 20 bis 100-fach im Vergleich zu den linearen Analoga. Das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) wurde als Ligand von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  mit einem  $IC_{50}$ -Wert im submikromolaren Bereich identifiziert und ist bis jetzt eines der wichtigsten Peptidliganden dieses Integrins. Seine Struktur dient als Leitstruktur zur Entwicklung neuer Peptidliganden und Peptidomimetika. Das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-) zeigt eine erhöhte Aktivität zu Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .<sup>[120]</sup>

Für die biologische Aktivität ist die Konformation der Erkennungssequenz von eminenter Bedeutung. Die pharmakophore RGD-Sequenz im Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -selektiven Peptidliganden cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) befindet sich in einem  $\gamma$ -turn und ist somit stark geknickt. Die RGD Sequenz im Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -selektiven Liganden cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Gly-) befindet sich in einem  $\beta$ -turn und nimmt eine gestrecktere Konformation



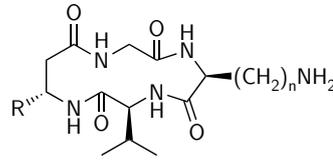
**Abbildung 2.13:** Unterschiedliche Konformation der Arg-Gly-Asp Erkennungssequenz in zyklischen Penta- und Hexapeptiden, die eine D-Aminosäuren enthalten. D-Aminosäuren nimmt die  $i+1$  Position eines  $\beta$ -turn in Peptiden  $c(\text{RGDfV})$  (links),  $c(\text{RGDFv})$  (mittig) und  $c(\text{RGDFVG})$  (rechts) ein.<sup>[120]</sup>

als die RGD Sequenz im cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) Peptid ein (Abb. 2.13). Der Abstand zwischen den  $C^\beta$ -Atomen von Arg und Asp ist in  $\alpha_v\beta_3$ -selektiven Peptidliganden besonders klein und beträgt z. B. für das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) 668 pm. In  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -selektiven Peptidliganden ist dieser Abstand größer.<sup>[120,123]</sup>

Detaillierte Kenntnisse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglichen ein Design neuer, biologisch aktiver Peptide. Anfangs der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde in der Arbeitsgruppe Kessler eine Bibliothek stereoisomerer zyklischer Peptide synthetisiert, mit Hilfe derer eine optimale Struktur für einzelne Rezeptorsubtypen eingegrenzt werden konnte. Dieses Verfahren wurde als *spatial screening* bezeichnet und ist derzeit eine Standard-Methode bei der Suche nach biologisch aktiven Konformationen und der Entwicklung neuer Medikamente.<sup>[20,124]</sup>

Neben D-Aminosäuren können weitere Bausteine wie  $\beta$ -Aminosäuren in das Peptidrückgrat eingeführt werden, die zur Stabilisierung bestimmter Sekundär-Strukturelemente führen.  $\beta$ -Aminosäuren enthalten ein zusätzliches Kohlenstoffatom zwischen der Carboxyl- und der Aminofunktion.  $\beta$ -Homoaminosäuren bezeichnen  $\beta$ -Aminosäuren, die eine zusätzliche Methylengruppe zwischen dem  $C^\alpha$ -Atom und der Carboxylgruppe enthalten. Abhängig von der Position der Seitenkette in  $\beta$ -Aminosäuren werden  $\beta^2$ -,  $\beta^3$ - und  $\beta^{2,3}$ -substituierte Aminosäuren unterschieden.<sup>[122]</sup>  $\beta$ -Aminosäuren werden meist als nicht-natürliche Aminosäuren bezeichnet. Sie treten jedoch als Komponenten natürlicher Peptide bei manchen Meeresorganismen und bei einigen Prokaryonten auf. Diese Peptide besitzen antibakterielle, cytotoxische oder andere pharmakologische Eigenschaften. Ein Beispiel für das natürliche Vorkommen von Peptiden mit inkorporierten  $\beta$ -Aminosäuren sind durch

*Rhodococcus*-Bakterien produzierte Tetrapeptide Rhodopeptine, welche eine  $\beta$ -lipidähnliche Aminosäure besitzen und eine fungizide Wirkung aufweisen (Abb. 2.14).<sup>[125,126]</sup> Ein Beispiel für natürlich vorkommende  $\beta$ -Aminosäuren in Säugetieren ist das Dipeptid Carnosin ( $\beta$ Ala-His), das in Muskelgewebe vorkommt und antioxidative Eigenschaften besitzt.<sup>[127]</sup>



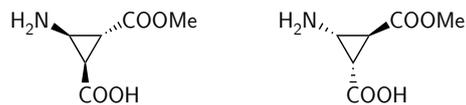
**Abbildung 2.14:** Schematische Darstellung der Rhodopeptine. a) Rhodopeptin C1:  $n=3$ ,  $R=(CH_2)_6CH(CH_3)CH_2CH_3$ , b) Rhodopeptin B5:  $n=4$ ,  $R=(CH_2)_8CH(CH_3)_2$ .<sup>[125]</sup>

$\beta$ -Aminosäuren sind  $\gamma$ -turn Mimetika und nehmen z. B. in zyklischen Pentapeptiden die zentrale Position eines modifizierten  $\gamma$ -turns ein. Da sie eine zusätzliche  $CH_2$ -Gruppe enthalten, wird aus diesem Grund der durch sie stabilisierte  $\gamma$ -turn als pseudo- $\gamma$ -turn ( $\Psi\gamma$ -turn) bezeichnet. Die konformationelle Präferenz der  $\beta$ -Aminosäuren kann in manchen Fällen sogar die konformationelle Präferenz von D-Aminosäuren überwiegen, die üblicherweise die  $i+1$  Position eines  $\beta$ -II'-turns einnehmen.<sup>[128]</sup> Das Pentapeptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D- $\beta$ Phe-Val-), in welchem D-Phe durch D- $\beta$ Phe ersetzt wurde, zeigt eine vergleichbare Aktivität zu Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wie das Hexapeptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-Gly-). Die RGD Sequenz nimmt in beiden Peptiden die Positionen  $i+1$  bis  $i+3$  eines  $\beta$ -turns ein.<sup>[20,128]</sup>

$\beta$ -Aminosäuren gewährleisten ebenfalls eine höhere Stabilität gegen Peptidhydrolasen. Die Peptidasen zeigen eine Unfähigkeit zum Spalten der Peptidbindung, die sich in der Nachbarschaft der  $\beta$ -Aminosäuren befindet. Ondetti und Engel zeigte, dass die Einführung von  $\beta$ -Homoaminosäuren in die Bradykinin-Analoga in erhöhter Peptidasenstabilität resultiert.<sup>[129]</sup>

Eine Unterklasse der  $\beta$ -Aminosäuren stellen zyklische  $\beta$ -Aminosäuren (2-Aminocycloalkancarbonsäuren) dar, die aufgrund ihrer konformationellen Einschränkung für ein gezieltes Design neuer Strukturen interessant sind. Lineare Peptide, die aus den proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäuren und den nicht-natürlichen zyklischen  $\beta$ -Aminosäuren bestehen, bilden stabile helicale Strukturen.<sup>[130]</sup> Hayen *et al.* zeigte, dass die Peptide mit inkorporierten 2-Aminocyclopentancarbonsäuren (Acpc) die stabilen 11-, 12- und 14-Helices bilden.<sup>[130]</sup> Die  $\beta$ -Aminosäuren Achc und Acpc zeigen unterschiedliche strukturelle Präferenzen in Peptiden, die ausschließlich aus Achc oder Acpc bestehen. Der Cyclohexanring in *trans*-Achc stabilisiert 14-Helices, während der Cyclopropanring in *trans*-Acpc 12-Helices stabilisiert.<sup>[131]</sup> Strijowski und Sewald zeigten, dass sich 2-Aminocyclohexancarbonsäure (Achc) in zyklischen Tetra- und Pentapeptiden in einem pseudo- $\gamma$ -turn ( $\Psi\gamma$ ) befindet. Im Fall der Hexapeptide nimmt Achc an der Bildung von pseudo- $\beta$ -turns ( $\Psi\beta$ ) teil.<sup>[132]</sup>

Ein Sonderfall der zyklischen  $\beta$ -Aminosäuren sind Derivate von  $\beta$ -Aminocyclopropan-carbonsäure ( $\beta$ Acc), die aufgrund der konformationellen Einschränkung des Cyclopropan-rings die Peptide sehr stark rigidisieren.<sup>[133]</sup> Die Einführung von  $\beta$ -Aminocyclopropan-carbonsäure-monomethylester in synthetische Neuropeptid-Analoga resultierte in einer starken Einschränkung der Flexibilität des Peptidrückgrats und führte zur Erhöhung der Affinität und Selektivität zu dem Neurorezeptor-Subtyp  $\gamma_1$  (Abb. 2.15). Die  $\beta$ Acc wurden als neuartige konformativ eingeschränkte Bausteine identifiziert, die sehr effektiv Sekundärstruktur in linearen Peptiden stabilisieren und bekannte, konformativ eingeschränkte  $\alpha$ -Aminosäuren wie Prolin zusätzlich in ihrer Eigenschaften komplementieren können.<sup>[134]</sup>



**Abbildung 2.15:** Schematische Darstellung der Struktur von (+) $\beta$ Acc (links) und (-) $\beta$ Acc (rechts).

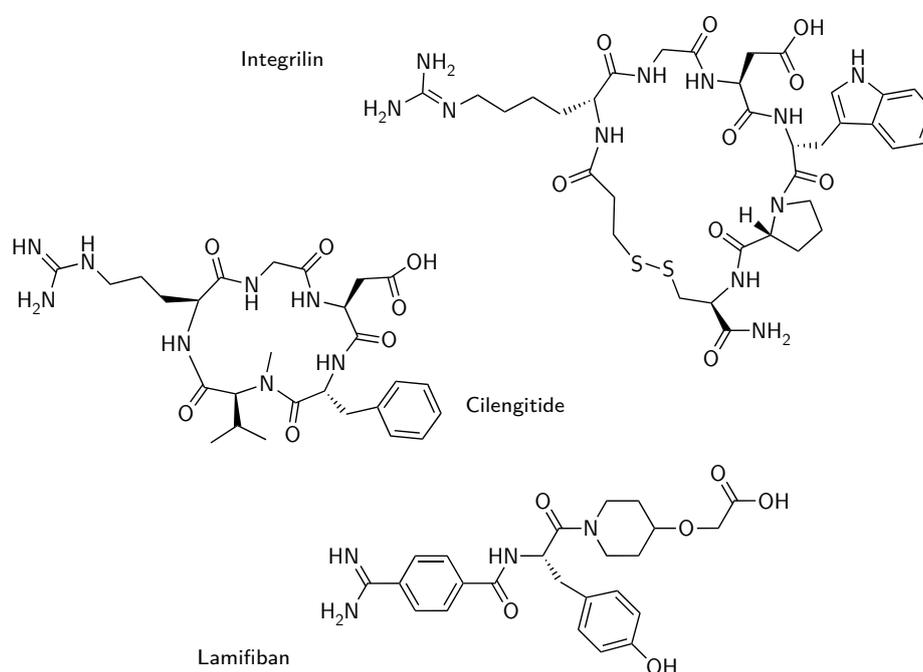
Weiterhin umfassen Modifikationen zyklischer Peptide die chemische Derivatisierung der Seitenketten oder Peptidbindungen. Diese können in erhöhter Aktivität und Spezifität dieser Peptide resultieren. *N*-Methylierung der Peptidbindung des bislang bekanntesten Peptidliganden von Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-), führte zu dem neuen Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-<sup>*N-Me*</sup>Val-), das sich durch höhere Aktivität und Selektivität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  im Vergleich zu cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) auszeichnet.<sup>[123]</sup> Dieses Peptid wird zurzeit unter der Bezeichnung Cilengitide<sup>®</sup> (EMD121974) in klinischen Tests der Phase II als Tumorthapeutikum getestet.<sup>[123,135,136]</sup>

Kohlenhydratderivate können ebenfalls im Design neuer selektiver Strukturen verwendet werden. Diese können entweder direkt in das Peptidrückgrat eingebaut oder zur Derivatisierung der Seitenketten eingesetzt werden. Lohof *et al.* zeigten, dass der Einbau von benzylierten Zuckeraminosäuren, hydrophoben  $\beta$ II'-Schleifen-Mimetika, anstelle von D-Phe-Val in Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) zu keinem großen Aktivitätsverlust führte, jedoch zu einem Selektivitätsverlust. Das modifizierte Peptid zeigte eine unerwartet erhöhte Affinität zu Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften der Peptide kann eine Glycosylierung der Seitenketten erfolgen. Lohof *et al.* zeigten, dass *C*-Glycosidderivatisierungen der Seitenketten im Peptid besonders interessant sein können, da diese Verknüpfungen enzymatisch stabil sind. Diese Modifikation der Valinseitenkette in cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) führte zur Entdeckung einer neuen Verbindung, die eine hohe Aktivität und sehr hohe Selektivität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  zeigt.<sup>[137]</sup>

Bisherige Studien an peptidischen Integrinliganden brachten bislang mehrere Verbindungen auf den Markt, die als Therapeutika verwendet werden können. Einige Beispiele sind in Tabelle 2.4 aufgelistet und in Abbildung 2.16 dargestellt.

**Tabelle 2.4:** Integrinliganden, die als Therapeutika eingesetzt werden. [46,135,138]

Integrin	Indikation	Ligand/Wirkstoff	aktueller Status
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Herzinfarkt	Reopro (Antikörper)	auf dem Markt
	Koronarthrombose	Integrilin <sup>®</sup> (Peptid)	auf dem Markt
	Koronarthrombose	Lamifiban	auf dem Markt
$\alpha_v\beta_3$	Krebs, Thrombose	zyklisches Peptid	präklinisch
		Peptidomimetikum	präklinisch
	Osteoporose	Peptidomimetikum	präklinisch
	Krebs	Peptidomimetikum	präklinisch
$\alpha_4\beta_1$	Leukämie, Hirntumor, Kaposi-Sarkom	Cilengitide <sup>®</sup> (zyklisches Peptid)	Phase II
	Asthma, Darmentzündung	Peptidomimetikum	Phase I
	chronische Entzündungen	Peptidomimetikum	präklinisch

**Abbildung 2.16:** Schematische Darstellung der Strukturen der ausgewählten Integrinliganden.

### 2.3.3 Peptide mit anderen Erkennungssequenzen

Peptide und Peptidomimetika, die die Erkennungssequenz des VCAM-1 nachahmen, werden zur Hemmung der Interaktion dieses Proteins mit Integrin  $\alpha_4\beta_1$  eingesetzt. Auf diese Weise können bestimmte Entzündungsprozesse und Immunkrankheiten kontrolliert werden. Basierend auf der mutmaßlichen Bindungssequenz des VCAM-1 (TQIDSPLN Motiv) wurden sowohl zyklische Oktapeptide als auch kürzere Peptide synthetisiert und im Kontext der inhibierenden Eigenschaften untersucht. Wang *et al.* konnte die Bindung von  $\alpha_4\beta_1$  an VCAM-1 durch zyklische Peptide inhibieren. Besonders aktiv erschien das zyklische Peptid cyclo-(H-Cys<sup>S-S</sup>-Gln-Ile-Asp-Ser-Pro-Cys<sup>S-S</sup>-OH), in welchem eine Zyklisierung über eine Disulfidbrücke erzeugt wurde. Im Gegensatz dazu war die kürzere, lineare Variante Gln-Ile-Asp-Ser-Pro nicht aktiv.<sup>[64]</sup> Für das zyklische Oktapeptid cyclo-(H-Cys<sup>S-S</sup>-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser-Pro-Cys<sup>S-S</sup>-OH), das über eine Disulfidbrücke zyklisiert ist, wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert im mikromolaren Bereich bestimmt. Die Analoga dieses Peptides, in welchen eine Amidierung der C-terminalen Carboxylfunktion (Peptid cyclo-(H-Cys<sup>S-S</sup>-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser-Pro-Cys<sup>S-S</sup>-NH<sub>2</sub>)) oder eine Verlängerung des Peptidrückgrats (Peptid cyclo-(H-Cys<sup>S-S</sup>-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser-Pro-Cys<sup>S-S</sup>-Gly-OH)) durchgeführt wurde, zeigten eine dramatische Minderung der Affinität zu Integrin  $\alpha_4\beta_1$ .<sup>[66]</sup> Die Konformationsanalyse des Oktapeptides cyclo-(H-Cys<sup>S-S</sup>-Thr-Gln-Ile-Asp-Ser-Pro-Cys<sup>S-S</sup>-OH) zeigte, dass dieses Peptid mit der Struktur des Bindungs epitops des VCAM-1 (TQIDSPLN) eine geringe Ähnlichkeit aufweist.<sup>[64,66]</sup>

Quan *et al.* untersuchte zyklische Oktapeptide, in welchen die Relevanz der einzelnen Aminosäuren innerhalb des Bindungs epitops durch Substitution mit Alanin (Alanin-Scan) geprüft wurde. Die Aminosäuren Gln, Asp und Pro erschienen als besonders wichtig für die Bindung des VCAM-1 an Integrin  $\alpha_4\beta_1$ , während die Substitution von Ser sogar zur Erhöhung der inhibitorischen Aktivität führte. Als aktivste Strukturen wurden die Oktapeptide cyclo(-Thr-Ala-Ile-Asp-Ala-Pro-Asn-Ala-) und cyclo(-Val-Gln-Ile-Asp-Ala-Pro-Asn-Ala-) mit IC<sub>50</sub>-Werten in mikromolaren Bereich bestimmt. Allerdings zeigten die Versuche der Konformationsanalyse, dass diese Oktapeptide eine so große Beweglichkeit innerhalb des Peptidrückgrates aufweisen, dass eindeutige Strukturen der Peptide nicht definiert werden konnten.<sup>[66]</sup>

Die inhibitorische Wirkung der aktivsten Oktapeptide, die im mikromolaren Bereich liegt, ist nicht zufriedenstellend. Daher ist die weitere Suche nach aktiveren Strukturen erforderlich. In seiner Dissertation beschäftigte sich Malešević mit der Synthese von Peptidliganden von Integrin  $\alpha_4\beta_1$ . Er synthetisierte eine Peptid-Bibliothek, die zyklische Penta- und Hexapeptide enthält, deren Sequenz anhand des N- und C-terminalen Endes wie auch

des zentralen Bereiches des Bindungsepitops von VCAM-1 konzipiert wurde. Um die Konformation der Erkennungssequenz in Peptiden einzuschränken und vielfältige Strukturen zu bekommen, verwendete Malešević  $\beta$ - und  $\beta$ -Homo-Aminosäuren anstelle der natürlichen  $\alpha$ -Aminosäuren.<sup>[139]</sup> Strijowski synthetisierte ebenfalls zyklische Penta- und Hexapeptide, die das Bindungsepitop von VCAM-1 nachahmen sollten. Um bestimmte Strukturelemente in den Peptiden zu induzieren, verwendete Strijowski  $\beta$ -Aminosäuren wie 2-Aminomethylbutansäure (Ambs, Isoleucinmimetikum), 2-Aminocyclopentancarbonsäure (Ahc) und 2-Aminocyclohexancarbonsäure (Acpc) (Kap. 6.1.2, Abb. 6.5).<sup>[140]</sup> Die Untersuchung der biologischen Aktivität der durch Malešević und Strijowski synthetisierten Peptide ist ein Gegenstand dieser Arbeit.

## 2.4 Oberflächenplasmonresonanz

Viele Biomoleküle, die an Signaltransduktion und Kontrolle biologischer Systeme beteiligt sind, besitzen keine katalytischen Eigenschaften und die Etablierung eines Messsystems, das die notwendige Information für deren funktionelle Analyse liefert, ist nicht trivial. Zur Gewinnung von Information über die Wechselwirkung der Biomoleküle werden diese meistens enzymatisch oder fluoreszent markiert und mit Hilfe der bekannten biochemischen Methoden wie z. B. ELISA oder FACS untersucht. Diese beiden Methoden liefern jedoch keine Information über die untersuchte Interaktion in Abhängigkeit von der Zeit. Eine Möglichkeit zur Gewinnung solcher Informationen bietet die in den 90iger Jahren entwickelte BIA-Technologie (*Biomolecular Interaction Analysis*). Zur Beobachtung der Wechselwirkungen der Biomoleküle wird das Phänomen der *Surface Plasmon Resonance* (SPR) eingesetzt, welches ursprünglich durch Turbadar und Otto beobachtet wurde.<sup>[141,142]</sup> Ein großer Vorteil der auf SPR basierenden Technologie ist, dass sie die Untersuchung von Interaktionen der Biomoleküle in Echtzeit ohne die Notwendigkeit einer Markierung erlaubt.<sup>[143,144]</sup>

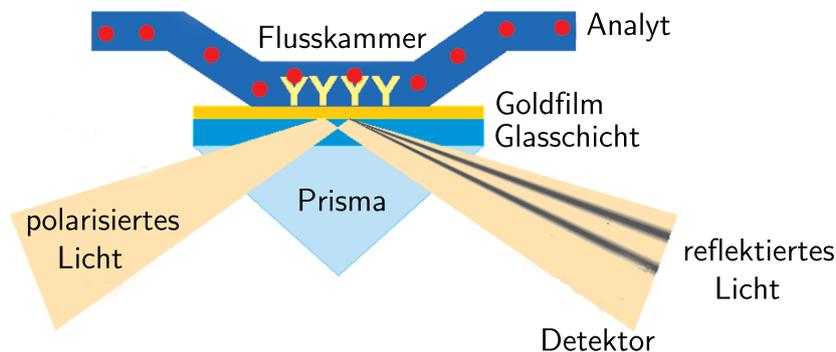
Die SPR Technologie findet breite Anwendung zur Untersuchung biospezifischer Wechselwirkungen. Mit ihrer Hilfe werden die folgenden Interaktionen untersucht: Antigen-Antikörper, Protein-Protein, Protein-Nukleinsäure, Protein-niedermolekularer Ligand, Nukleinsäure-niedermolekularer Ligand, Zelle-Zelle.<sup>[53,145-147]</sup> Die häufigsten Anwendungen der Biosensoren sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Die Kombination aus BIA-Technologie und Massenspektrometrie stellt eine moderne Variante der BIA-Analyse dar. Mit Hilfe dieser Methode werden direkt die an den Chip gebundenen Biomoleküle untersucht. Die Matrix wird auf die Chipoberfläche gegeben und der Chip wird im Massenspektrometer

**Tabelle 2.5:** Anwendungen der SPR Biosensoren.<sup>[145]</sup>

qualitative Anwendung	quantitative Anwendung
Spezifität	Bestimmung der Konzentration
Epitop-Mapping	Kinetik ( $k_a$ , $k_d$ )
Ligandenfischen	Gleichgewichtskonstanten ( $K_D$ )
Screening	Thermodynamik ( $\Delta H$ )
Aufreinigung	Stöchiometrie

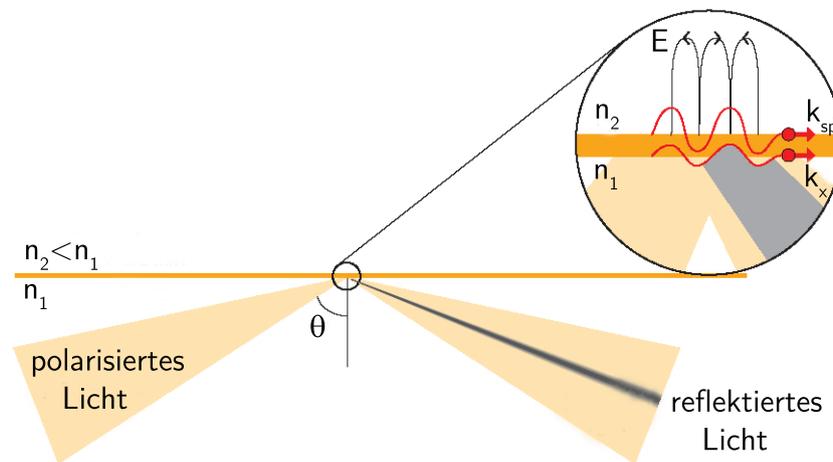
montiert und untersucht. Dadurch werden zusätzliche Manipulationen der Probe vermieden. Die hohe Sensitivität (Nachweisgrenze im femtomolaren Bereich) ist ein großer Vorteil dieser Methode.<sup>[148]</sup>

Bei der SPR Technologie werden Biosensoren mit biospezifischen Oberflächen eingesetzt. Mit Hilfe der Biosensoren können reversible Bindungen der Analytmoleküle in der mobilen Phase an einem auf der Sensoroberfläche immobilisierten Liganden qualitativ und quantitativ untersucht werden (Abb. 2.17). Die Affinitäten der Interaktionen können in einem breiten Bereich ( $\mu\text{M}$  bis  $\text{pM}$ ) untersucht werden.

**Abbildung 2.17:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Biosensors.

Oberflächenplasmonen sind Wellen einer oszillierenden Oberflächenladungsdichte in einem Metallfilm, die entlang der Oberfläche propagieren. Die elektromagnetische Amplitude der Oberflächenplasmonen nimmt exponentiell mit steigender Distanz senkrecht zur Oberfläche ab (evaneszentes Feld). Das elektromagnetische Feld dieser Wellen dringt einige hundert Nanometer in das Medium ein und ist asymmetrisch verteilt. Die Plasmonen in der Metallschicht können durch an der Metalloberfläche totalreflektiertes Licht bei einem definierten Einfallswinkel resonant angeregt werden. Die Resonanzbedingungen werden erfüllt, wenn der Wellenvektor ( $k_x$ ) des Lichtes in der Ebene des Sensors mit dem Wellenvektor ( $k_{sp}$ ) der Plasmonen übereinstimmt (Abb. 2.18). Die Resonanz verursacht einen

Energieverlust im reflektierten Licht und wird als Minimum der Intensität des reflektierten Lichtes beobachtet. Dieser Resonanzwinkel wird experimentell bestimmt und hängt vom Brechungsindex des Mediums im Bereich des evaneszenten Feldes ab. Die an der Sensoroberfläche stattfindenden Interaktionen der Biomoleküle bewirken eine lokale Änderung des Brechungsindex und damit eine Veränderung des Resonanzwinkels. Der Brechungsindex ist proportional zur Konzentration der Biomoleküle (bis zu  $50 \text{ ng mm}^{-2}$ ) an der Sensoroberfläche. Die Veränderungen des Brechungsindex in der Umgebung der Sensoroberfläche während der Bindung der Biomoleküle werden als Funktion der Zeit vermessen. Als Messeinheit wird 1 RU (*resonance unit*) definiert, was einer Zunahme der Masse an der Sensoroberfläche von  $1 \text{ pg mm}^{-2}$  entspricht.<sup>[146,149]</sup>

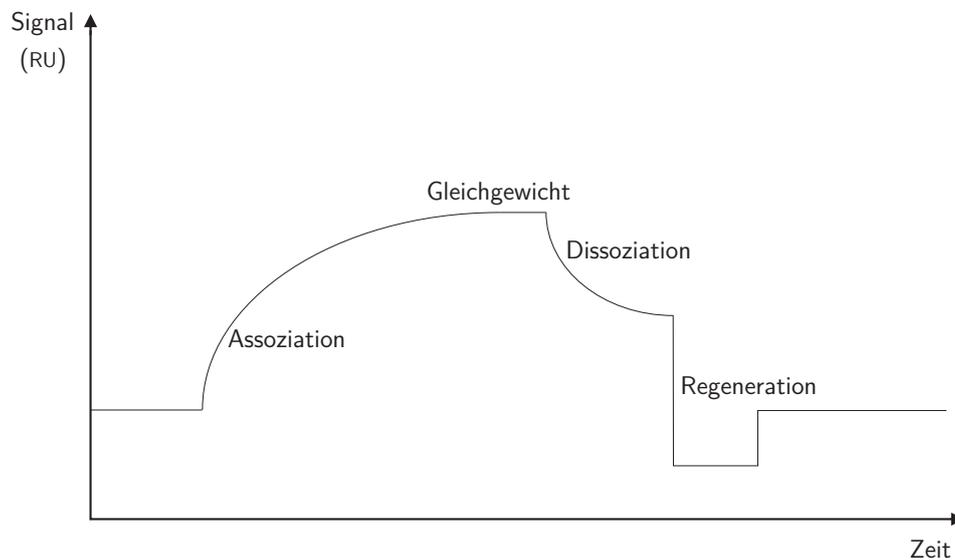


**Abbildung 2.18:** Das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz auf einer Metalloberfläche.

Ein auf dem Oberflächenplasmonresonanzsystem basierendes Experiment umfasst die folgenden Schritte:

- Immobilisierung des Liganden auf der Sensoroberfläche
- Äquilibrieren des Systems mit Bindungspuffer
- Injektion des Bindungspartners und Detektion der Bindung (Assoziations- und Dissoziationsphase)
- Regenerierung der Sensoroberfläche

Ein typisches Sensorgramm ist in Abbildung 2.19 dargestellt. Nach der Stabilisierung der Basislinie erfolgt die Zugabe des Bindungspartners. Die Bindung wird als Anstieg der

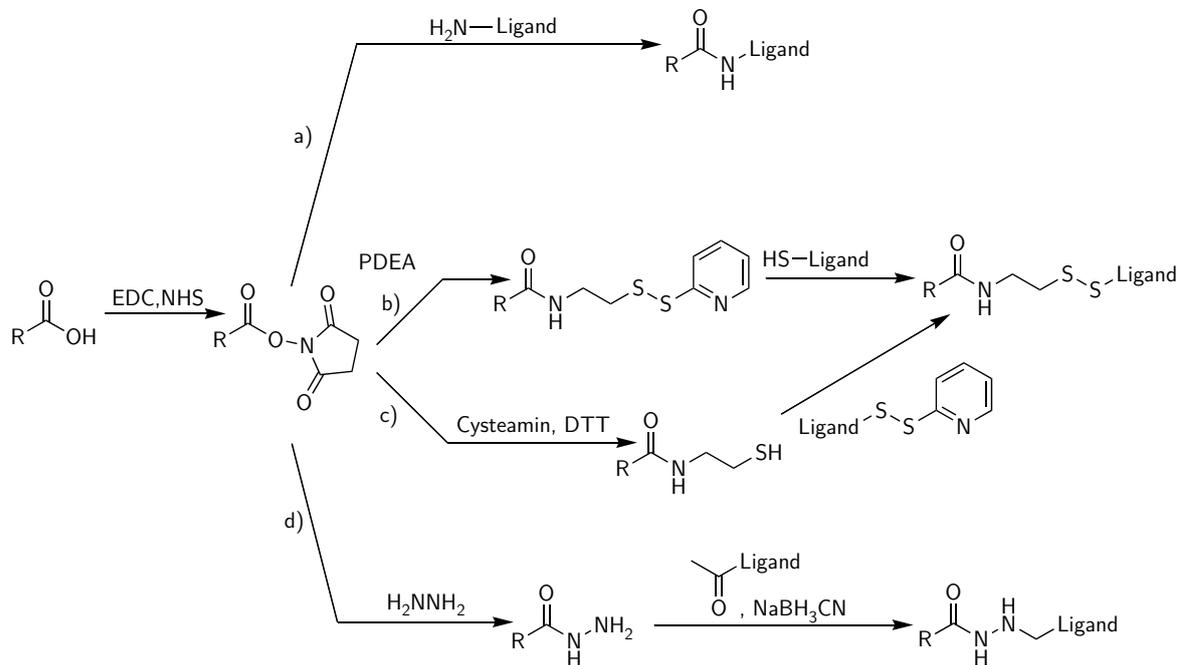


**Abbildung 2.19:** Typisches Sensorgramm.

Basislinie während der Assoziationsphase beobachtet. Nach der Beendigung der Assoziationsphase erfolgt Dissoziation der gebundenen Moleküle, die als Abfall der Linie detektiert wird. Im Fall geringer Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten muss die Sensoroberfläche mit einer entsprechenden Lösung regeneriert werden. Die Regenerierungsbedingungen sollten jeweils so angepasst werden, dass sie für den immobilisierten Ligand schonend sind.

Die ersten Biosensoren wurden 1990 durch die Firma Biacore eingeführt und werden bis heute am häufigsten verwendet.<sup>[144,146,150]</sup> Ein Biosensor besteht aus einem Glasträger mit einer dünnen Metallschicht (Gold oder Silber). Die Metallschicht ist meistens mit einem dünnen Dextranfilm ( $1\text{-}3\text{ ng mm}^{-2}$ ) beschichtet, der ein flexibles Hydrogel bildet und kann chemisch derivatisiert werden. Die Einführung von variablen funktionellen Gruppen ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{CHO}$ ) ermöglicht die Anwendung diverser Immobilisierungsverfahren.

Eine sehr häufig verwendete Immobilisierungstrategie beruht auf der Aktivierung der Carboxygruppen einer Carboxydextranschicht mit einem Gemisch aus *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC). Es entsteht ein Succinimidester, der spontan mit freien Aminogruppen des Liganden (z. B. Protein) reagiert (Abb. 2.20 (a)).<sup>[151,152]</sup> Die Immobilisierung von Proteinen erfolgt in der Regel durch Aminogruppen von Lysinseitenketten, die fast immer in Proteinen vorhanden sind. Da die Aminogruppen der Proteine in diese Immobilisierung zufällig involviert werden, entstehen Subpopulationen verschieden immobilisierter Proteine mit unterschiedlichem Zugang zu



**Abbildung 2.20:** Immobilisierungsstrategien auf der modifizierten Dextranoberfläche eines Biosensors: a) Immobilisierung über Aminokupplung, b) und c) Thiolkupplung über aktivierte Disulfidbrücken an der Sensoroberfläche bzw. in einem Ligand, d) Aldehydkupplung.

den Bindungsstellen. Dies kann zur Abnahme oder sogar zum Verlust der biologischen Aktivität des Proteins führen.<sup>[153,154]</sup> Werden die Bindungsbedingungen bei der Immobilisierung zu drastisch gewählt (z. B. pH Wert kleiner als pI des Proteins), können die Proteine denaturiert werden.<sup>[155]</sup> Neben der Immobilisierung durch Aminokupplung stehen auch andere Immobilisierungsstrategien zur Verfügung. Die Thiolkupplung beruht auf einer Austauschreaktion zwischen einem Thiol und einer reaktiven Disulfidbrücke.<sup>[156,157]</sup> Reaktive Disulfidbrücken können sowohl in dem Liganden als auch auf der Sensoroberfläche erzeugt werden. Zur Aktivierung des Liganden oder eines oberflächen-gebundenen Thiols wird z. B. 2-(2-Pyridinyldithio)-ethanamin (PDEA) verwendet. Aktivierte Disulfide auf der Sensoroberfläche werden mit einem Gemisch von Cysteamin und Dithioerythritol (DTE) gefolgt von der Aktivierung mit PDEA, hergestellt (Abb. 2.20 (b,c)). Liganden, die eine Aldehydgruppe besitzen, können nach Aktivierung der Sensoroberfläche mit Hydrazin immobilisiert werden (Abb. 2.20 (d)). Diese Methode ist besonders empfehlenswert für Glycoproteine und Glycokonjugate.<sup>[153,157]</sup> Auch indirekte Immobilisierungsstrategien werden häufig verwendet. Diese Immobilisierungsmethoden werden als *capture methods* bezeichnet, da ein Ligand auf Grund der hohen Affinität zu einem kovalent auf Sensoroberfläche immo-

bilisierten Molekül „gefangen“ und auf diese Weise immobilisiert wird. Beispielsweise wird immobilisiertes Streptavidin zur Bindung biotinylierter Liganden verwendet. Die Affinität der Streptavidin-Biotin-Bindung ist sehr hoch ( $K_D = 1 \cdot 10^{-15} \text{ M}$ ), so dass der biotinylierte Bindungspartner praktisch irreversibel auf der Oberfläche immobilisiert wird und nur unter Zerstörung der Streptavidinoberfläche abgetrennt werden kann.<sup>[158,159]</sup> Proteinliganden können ebenfalls über die entsprechenden spezifischen Antikörper immobilisiert werden. Der Antikörper wird zuerst kovalent auf der Sensoroberfläche immobilisiert und anschließend wird das Protein durch den immobilisierten Antikörper erkannt und „gefangen“. Die Bindung Antikörper-Antigen zeichnet sich ebenfalls durch eine hohe Affinität aus, die  $K_D$ -Werte dieser Wechselwirkungen sind jedoch in der Regel größer als der  $K_D$ -Wert der Streptavidin-Biotin Interaktion.<sup>[159]</sup>

Für SPR Bindungsstudien wurde in dieser Arbeit ein CM5 Chip verwendet, dessen Oberfläche mit carboxymethyliertem Dextran modifiziert ist. Zur Durchführung einer effizienten Aminokupplung auf der Sensoroberfläche eines CM5 Chips werden die optimalen Bedingungen in einem sogenannten *pH-scouting* ermittelt. Ist der pH Wert der Ligand-Lösung größer als 3.5, werden die Carboxygruppen der Dextranschicht negativ geladen. Aufgrund elektrostatischer Attraktion können dann positiv geladene Moleküle auf der Sensoroberfläche angereichert werden. Eine Voraussetzung dieser elektrostatisch bedingter Anreicherung der Moleküle auf der Sensoroberfläche ist, dass der pH Wert einer Ligand-Lösung größer als 3.5 ist und gleichzeitig unter dem pI Wert dieses Liganden liegt. Die Carboxygruppen der Dextranschicht wie auch zu immobilisierende Moleküle sollten unter diesen Bedingungen entgegengesetzt geladen sein. Die elektrostatische Attraktion der Moleküle auf der Oberfläche wird ebenfalls durch Lösungen mit niedriger Ionenstärke begünstigt. Mit der Anreicherung eines Liganden auf der nicht-aktivierten Sensoroberfläche unter diversen Bedingungen (pH Wert, Ionenstärke des Puffers) werden die optimalen Bedingungen für eine erfolgreiche Immobilisierung ermittelt. CM5 Sensorchips werden sehr häufig zur Immobilisierung von Proteinen und anderer Moleküle (z. B. Peptide) eingesetzt. Manche Liganden, wie z. B. saure Proteine oder Nukleinsäure sind jedoch sogar bei niedrigeren pH Werten negativ geladen und können auf der Sensoroberfläche eines CM5 Chips nicht angereichert werden. Eine Modifikation dieser Liganden, die ihre Azidität vermindert (z. B. Einführung der reaktiven Disulfidbrücken für Thiolkupplung), kann jedoch zu einer erfolgreichen Immobilisierung führen.

## 3 Zielsetzung

Integrine sind Zelloberflächenproteine, die durch Wechselwirkungen mit ihren Liganden eine Vielfalt von physiologischen und pathologischen Prozessen regulieren. Die durch Integrine kontrollierten biologischen Prozesse umfassen unter anderem Embryogenese, Wundheilung, Regulierung der Knochenfunktion und Immunantwort. Zu den pathogenen Prozessen, in denen Integrine eine signifikante Rolle spielen, zählen Tumorentwicklung, Osteoporose oder Immunkrankheiten wie z. B. Asthma und chronischer Gelenkrheumatismus. Die Entwicklung von Integrinliganden, die diese pathogenen Prozesse kontrollieren und hemmen würden, hilft bei der Entdeckung neuer Medikamente. Die Bedeutung der Forschung an Peptiden und Peptidomimetika als Integrinliganden stieg in den letzten Jahren signifikant und führte bereits zur Markteinführung einiger therapeutischer Wirkstoffe. Allerdings sind die Abläufe integrinabhängiger Krankheiten sehr komplex und in vielen Fällen nicht ausreichend verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Wechselwirkungen der Integrine mit ihren natürlichen Liganden und synthetisierten Peptiden untersucht werden. Das Hauptziel der Arbeit fokussiert sich auf die Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften von chemisch modifizierten Peptiden. Die biologische Funktion der Peptide kann durch Zyklisierung und Einbau bestimmter sekundärstrukturinduzierender Bausteine beeinflusst werden. Die Bestimmung der biologischen Aktivität der untersuchten Peptide im Zusammenhang mit Strukturdaten sollte einen Einblick in die Wechselwirkungsmechanismen der Integrine mit ihren Liganden und strukturelle Präferenz der biologisch aktiven Verbindungen liefern. Die detaillierten Aufgaben der Arbeit umfassen folgende Forschungsprojekte:

- Untersuchung des Einflusses zyklischer Peptide auf die Wechselwirkung des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  mit natürlichem Ligand VCAM-1.

Hier sollten die inhibitorische Eigenschaften der Peptide untersucht werden, die anhand der Erkennungssequenz des VCAM-1 konzipiert wurden und in welche bestimmte D- und  $\beta$ -Aminosäuren als sekundärstrukturinduzierende Bausteine inkorporiert wurden.

- Untersuchung des ADAM8 Proteins als Integrinligand.

In einem Teil dieses Projektes sollte die Fähigkeit des murinen ADAM8 zur homophilen Interaktion untersucht werden und der Einfluss zyklischer Peptide auf diese Interaktion bestimmt werden. Im zweiten Teil dieses Projektes sollte der Einfluss zyklischer Peptide auf die Interaktionen des humanen ADAM8 mit Integrinen bestimmt werden.

- Untersuchung der RGD-abhängigen Bindung verschiedener Liganden an Integrine.

In diesem Projekt sollte der Einfluss von zyklischen Peptiden mit RGD-Aminosäuremotiv untersucht werden. Im ersten Teil sollten die inhibitorischen Eigenschaften der zyklischen RGD-Peptide auf die Wechselwirkungen der Integrine mit Matrixproteinen untersucht werden. Im zweiten Teil sollten die Bindungsfähigkeit des bakteriellen CagL Proteins an Integrine und die Auswirkung zyklischer RGD-Peptide auf diese Interaktionen bestimmt werden.

Um die oben genannten Aufgaben zu erfüllen, sollten entsprechende Assaysysteme entwickelt werden. Neben einem klassischen Zelladhäsionstest sollten Bindungsstudien mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz und Durchflusszytometrie etabliert werden.

## 4 Materialien

### 4.1 Chemikalien

40% Acryl/Bisacrylamid	Fluka (Neu-Ulm)
Agar	Acros Organics (New Jersey, USA)
Agarose	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	ICN (Eschwege)
<i>BM Blue POD Substrate</i>	Roche (Mannheim)
Bromphenolblau	ICN (Eschwege)
Brij 35P	Fluka (Neu-Ulm)
1-(3-dimethylaminpropyl)-3-ethyl- carbodiimid Hydrochlorid (EDC)	AppliChem (Darmstadt)
<i>Coomassie Blue G-250</i>	ICN (Eschwege)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma (Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
D-Glucose	ICN (Eschwege)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraethansäure (EDTA)	ICN (Eschwege)
Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraethansäure (EGTA)	Fluka (Neu-Ulm)
Glutaraldehyd	Fluka (Neu-Ulm)
Glycin	ICN (Eschwege)
Glycerin	ICN (Eschwege)
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	ICN (Eschwege)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
Imidazol	Fluka (Neu-Ulm)
Maleinsäure	AppliChem (Darmstadt)
$\beta$ -Mercaptoethanol	ICN (Eschwege)
2-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Sigma (Deisenhofen)
Natriumazid	Fluka (Neu-Ulm)

Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN (Eschwege)
Natriumhydrogencarbonat	ICN (Eschwege)
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS)	AppliChem (Darmstadt)
Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid ( $\beta$ -OG)	AppliChem (Darmstadt)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA)	AppliChem (Darmstadt)
Ponceau s (3-Hydroxy-4-[2-sulfo-phenylazo]- 2,7-naphtalindisulfidsäure)	Sigma (Deisenhofen)
Silbernitrat	Fluka (Neu-Ulm)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (POD)	Roche (Mannheim)
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	ICN (Eschwege)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Fluka (Neu-Ulm)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN (Eschwege)
Tris·HCl	Sigma (Deisenhofen)
Trypton	AppliChem (Darmstadt)
Tween 20	ICN (Eschwege)
Wolframatokieselsäure Hydrat	Fluka (Neu-Ulm)

Sonstige verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, AppliChem und Sigma bezogen. Alle Chemikalien waren mindestens analysenrein (p. A.).

## 4.2 Peptide

Nummer	kurzer Name	langer Name
1	c(SPLND)	cyclo-(-Ser-Pro-Leu-Asn-Asp-)
2	c(SPL $\beta^h$ ND)	cyclo-(-Ser-Pro-Leu- $\beta^h$ Asn-Asp-)
3	c(SPQID)	cyclo-(-Ser-Pro-Gln-Ile-Asp-)
4	c(S-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-LND)	cyclo-(-Ser-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-Leu-Asn-Asp-)
5	c(S-(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-LND)	cyclo-(-Ser-(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-Leu-Asn-Asp-)
6	c(S-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Acpc-LND)	cyclo-(-Ser-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Acpc-Leu-Asn-Asp-)
7	c(S-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Acpc-QID)	cyclo-(-Ser-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Acpc-Gln-Ile-Asp-)
8	c(S-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-QID)	cyclo-(-Ser-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-Gln-Ile-Asp-)
9	c(SPLNID)	cyclo-(-Ser-Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-)
10	c(S $\beta^h$ PLNID)	cyclo-(-Ser- $\beta^h$ Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-)
11	c(S $\beta^h$ PLNVD)	cyclo-(-Ser- $\beta^h$ Pro-Leu-Asn-Val-Asp-)

<b>12</b>	c( $\beta^h$ SPL $\beta^h$ NID)	cyclo-(- $\beta^h$ Ser-Pro-Leu- $\beta^h$ Asn-Ile-Asp-)
<b>13</b>	c(S-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-LNID)	cyclo-(-Ser-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-Leu-Asn-Ile-Asp-)
<b>14</b>	c(S-(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-LNID)	cyclo-(-Ser-(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-Leu-Asn-Ile-Asp-)
<b>15</b>	c(SPLN-( <i>R</i> )-Ambs-D)	cyclo-(-Ser-Pro-Leu-Asn-( <i>R</i> )-Ambs-Asp-)
<b>16</b>	c(SPLN-( <i>S</i> )-Ambs-D)	cyclo-(-Ser-Pro-Leu-Asn-( <i>S</i> )-Ambs-Asp-)
<b>17</b>	c(SPTQID)	cyclo-(-Ser-Pro-Thr-Gln-Ile-Asp-)
<b>18</b>	c(S-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-TQID)	cyclo-(-Ser-(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Achc-Thr-Gln-Ile-Asp-)
<b>19</b>	c(S $\beta$ PTQID)	cyclo-(-Ser- $\beta$ Pro-Thr-Gln-Ile-Asp-)
<b>20</b>	c(SPTQVD)	cyclo-(-Ser-Pro-Thr-Gln-Val-Asp-)
<b>21</b>	c( $\beta^h$ SPD $\beta^h$ QID)	cyclo-(- $\beta^h$ Ser-Pro-Asp- $\beta^h$ Gln-Ile-Asp-)
<b>22</b>	c(TAIDAPNA)	cyclo-(-Thr-Ala-Ile-Asp-Ala-Pro-Asn-Ala-)
<b>23</b>	c(KDKRLS)	cyclo-(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-Ser-)
<b>24</b>	c(KDKRLS)	cyclo-(-Lys-Asp-Lys-Arg-D-Leu-Ser-)
<b>25</b>	c(KDKrLS)	cyclo-(-Lys-Asp-Lys-D-Arg-Leu-Ser-)
<b>26</b>	c(KDKRLs)	cyclo-(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-D-Ser-)
<b>27</b>	c(KKDMRP)	cyclo-(-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-Pro-)
<b>28</b>	c(KKDMrP)	cyclo-(-Lys-Lys-Asp-Met-D-Arg-Pro-)
<b>29</b>	c(kKDMRP)	cyclo-(-D-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-Pro-)
<b>30</b>	c(KKDMRp)	cyclo-(-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-D-Pro-)
<b>31</b>	c(RGDfV)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)
<b>32</b>	c(RGDVf $\beta$ A)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-)
<b>33</b>	c(RGD-(+) $\beta$ Acc-V)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-(+) $\beta$ Acc-Val-)
<b>34</b>	c(RGD-(-) $\beta$ Acc-V)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-(-) $\beta$ Acc-Val-)
<b>35</b>	c(RG $\beta$ EfV)	cyclo-(-Arg-Gly- $\beta$ Glu-D-Phe-Val-)
<b>36</b>	c(RGDlA)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-)
<b>37</b>	c(RGDLa)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-)
<b>38</b>	c(RGDlAl)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-Leu-)
<b>39</b>	c(RGDLaL)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Leu-)
<b>40</b>	c(RGDlAl)	cyclo-(-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala-D-Leu-)

## 4.3 Materialien für die Zell- und Bakterienkultur

### 4.3.1 Zelllinien

CHO	Universität Bielefeld, Prof. Dr. Frey
CHO-Integrin	Universität Bielefeld, Prof. Dr. Frey
K562	I.A.Z (München)
N1321N1	Universität Bielefeld, PD Dr. Bartsch
N1321N1-mADAM8	Universität Bielefeld, PD Dr. Bartsch
Ramos	DSZM (Braunschweig)
WM115	ATCC (Manassas, USA)

#### 4.3.1.1 CHO Zellen

CHO-Zellen wurden anfangs der sechziger Jahre als eine entwicklungsfähige Epithelzelllinie in die Forschung eingeführt. CHO-Zellen sind aus den Ovarien chinesischer Hamster (*chinese hamster ovary*) abgeleitet. Speziell werden sie zur Genexpression, Genforschung und Toxikologieforschung eingesetzt. Von dieser Zellart existieren Zell-Linien mit unterschiedlichen genetischen Veränderungen.

#### 4.3.1.2 K562

K562 Zellen sind aus der Pleuraleffusion eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie in terminaler Blastenkrise abgeleitet. Die K562 Blasten sind multipotente, hämatopoetische maligne Zellen, die in die Vorläufer von Erythrocyten-, Granulocyten- und Monocyten-Serien differenzieren können. Da K562 Zellen hauptsächlich Integrin  $\alpha_5\beta_1$  exprimieren, werden sie als Modelzelllinie zur Untersuchung von Interaktionen des Integrins  $\alpha_5\beta_1$  verwendet.

#### 4.3.1.3 N1321N1

N1321N1 Zellen wurden aus einer primären Zellkultur eines zerebralen neuroepithelialen Hirntumors isoliert.<sup>[160]</sup> Diese Zellen exprimieren p53 Protein und das Oncogen c-myc. Sie werden in der Forschung des Tumorwachstums und zu Expressionsstudien der c-myc Oncogene verwendet.<sup>[161]</sup>

#### 4.3.1.4 WM115

WM115 Zellen wurden aus einer primären Haut-Tumor-Epithelzelllinie abgeleitet. Diese Zellen exprimieren Proteoglykan-Antigene, die charakteristisch für Melanoma sind.

Die Zelllinie WM115 wird häufig in Untersuchungen zu Melanomen und Integrinen eingesetzt.<sup>[162–166]</sup>

#### 4.3.1.5 Ramos

Ramos Zelle sind morphologisch B-Lymphocyten, die aus dem humanen Caucasian-Burkitt's-Lymphom abgeleitet wurden.<sup>[167]</sup> Sie exprimieren Integrin  $\alpha_4\beta_1$  und stellen eine Modellzelllinie zur Untersuchung von Wechselwirkungen des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  dar.<sup>[168–170]</sup>

#### 4.3.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21	<i>recA1 ΔlacU169ψ80dlacZΔM15</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> <i>deoR recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Bethesda Research Laboratories (USA)
pTrcHis2-BL21	<i>E. coli</i> BL21 transformiert mit pTrcHis2-mADAM8-Fr Vector	Universität Bielefeld PD Dr. Bartsch

#### 4.3.3 Medien und Medienzusätze

##### 4.3.3.1 Medien für die Zellkultur

RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA (Cölbe)
MEM mit L-Glutamin	PAA (Cölbe)
EMEM mit L-Glutamin	PAA (Cölbe)
DMEM mit L-Glutamin	PAA (Cölbe)
IMDM mit L-Glutamin	PAA (Cölbe)

##### 4.3.3.2 Medien für die Bakterienkultur

LB Medium	1 mM NaCl
	1% (w/v) Trypton
	0.5% (w/v) Hefeextrakt
	pH 7.0
LB Agar	1 mM NaCl
	1% (w/v) Trypton
	0.5% (w/v) Hefeextrakt
	1.5% (w/v) Agar
	pH 7.0

soc Medium	2% ( <i>w/v</i> )	Trypton
	0.5% ( <i>w/v</i> )	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	20 mM	Glucose
		pH 7.0

#### 4.3.3.3 Medienzusätze

Ampicillinsulfat	AppliChem (Darmstadt)
Arabinose	Sigma (Deisenhofen)
fetales Kälberserum Kategorie EU	PAA (Cölbe)
Gentamicinsulfat	AppliChem (Darmstadt)
$\beta$ -Isopropylthio-D-galactopyranosid (IPTG)	AppliChem (Darmstadt)
G418-Sulfat	PAA (Cölbe)
nicht essenzielle Aminosäuren-Lösung (100 $\times$ )	PAA (Cölbe)
Natriumpyruvat 100 mM	PAA (Cölbe)
Normocin <sup>TM</sup>	Cayla (Frankreich)
Trypsin	PAA (Cölbe)

## 4.4 Proteine, Kits und Standards

### 4.4.1 Proteine

bakterielles CagL	Universität Magdeburg, Dr. Backert
humanes ADAM8	Universität Bielefeld, Prof. Dr. Frey
humanes Integrin $\alpha_5\beta_1$	Chemicon (Hofheim)
humanes Integrin $\alpha_v\beta_3$	Chemicon (Hofheim)
humanes Integrin $\alpha_v\beta_5$	Chemicon (Hofheim)
humanes Fibronectin	Gibco-BRL (Eggenstein)
humanes VCAM-1	R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt)
humanes Vitronectin	Chemicon (Hofheim)
Rinderserumalbumin	PAA (Cölbe)

#### 4.4.2 Kits

<i>MicroBC Assay: protein quantitation kit</i>	Interchim (Montluçon, Frankreich)
<i>Nucleo-Spin<sup>®</sup> RNA II</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>QIAprep Miniprep Kit</i>	Qiagen GmbH (Hilden)
<i>ThermalAce<sup>™</sup> DNA Polymerase Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>peqGOLD Single Tube RT-PCR-kit</i>	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

#### 4.4.3 Standards

DNA-Längestandard (100–5 000 bp)	MBLL (Bielefeld)
Hyperladder IV <sup>™</sup> (100–1 000 bp)	Bioline GmbH (Luckenwalde)
<i>Nondenatured Protein Molecular Weight Marker Kit</i> (14–545 kD)	Sigma (Deisenhofen)
<i>SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Standard</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Precision Plus Protein Standard</i> (10–250 kD)	BIO-RAD (München)

### 4.5 Puffer und Lösungen

#### 4.5.1 Allgemeine Puffer

Alle hier verwendeten Puffer und Lösungen werden mit Reinwasser hergestellt. Wasser wurde mit Milli-Q<sup>®</sup> Biocel Reinstwassersystem (Millipore) gereinigt.

##### 4.5.1.1 Elektrophoresepuffer/Färbelösungen

Beschleuniger	5% (w/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
<i>Coomassie</i> Färbelösung	0.05% (w/v)	<i>Coomassie Blue</i> G-250
	25% (v/v)	2-Propanol
	10% (v/v)	Ethansäure
<i>Coomassie</i> kolloidale Färbelösung	0.1% (w/v)	<i>Coomassie Blue</i> G-250
	34% (v/v)	Methanol
	17% (w/v)	Ammoniumsulfat
	3% (w/v)	ortho-Phosphorsäure

#### 4 Materialien

---

DNA-Probenpuffer (6×)	100 mM	EDTA
	30% (v/v)	Glycerin
	0.25% (w/v)	Bromphenolblau
	0.25% (w/v)	Xylencyanol
		pH 8.0
Entwickler	3% (v/v)	Methanol
Fixierer	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Ethansäure
	10% (v/v)	Glycerin
Moderator	10%	(w/v) Wolframatokieselsäure
nativer Elektrophoresepuffer	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris·HCl
		pH 8.8
nativer Probenpuffer (5×)	3.1 mL	Sammelgelpuffer
	5 mL	Glycerin
	0.5 mL	Bromphenolblau
		gesättigt in 0.1% Ethanol
	1.4 mL	H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer	0.5 M	Tris·HCl
		pH 6.8
Silberkomplexlösung	2% (w/v)	AgNO <sub>3</sub>
	2% (w/v)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
SDS Elektrophoresepuffer	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris
	1% (w/v)	SDS
		pH 8.3

SDS-PAGE Probenpuffer (3×)	1.75 mL	Sammelgelpuffer
	1.5 mL	Glycerin
	5 mL	10% SDS-Lösung ( <i>w/v</i> )
	0.5 mL	β-Mercaptoethanol
	1.5 mL	Bromphenolblau gesättigt in 0.1% Ethanol
	0.5 mL	H <sub>2</sub> O
Stopplösung	5% ( <i>v/v</i> )	Ethansäure
TAE Elektrophoresepuffer	40 mM	Tris
	0.1% ( <i>v/v</i> )	Ethansäure
	2 mM	EDTA
		pH 8.0
Trenngelpuffer	1.5 M	Tris·HCl pH 8.8

#### 4.5.1.2 Puffer und Lösungen für Western Blotting

Blockierungspuffer	7.5 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	136 mM	NaCl
	5% ( <i>w/v</i> )	Magermilchpulver
Transferpuffer	39 mM	Glycin
	48 mM	Tris
	40% ( <i>v/v</i> )	Methanol
	0.038% ( <i>w/v</i> )	SDS
	0.01% ( <i>w/v</i> )	NaN <sub>3</sub>
Ponceau s Lösung	0.1% ( <i>w/v</i> )	Ponceau s
	0.1% ( <i>v/v</i> )	Ethansäure

PBST	7.5 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	136 mM	NaCl
	0.1% (v/v)	Tween 20
TBS	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
		pH 8.0

#### 4.5.2 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

HBSS	5.4 mM	KCl
	0.4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	4.1 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	0.3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	136 mM	NaCl
Trypanblaulösung	0.5% (w/v)	Trypanblau
	0.9% (w/v)	NaCl
PBS	7.5 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	136 mM	NaCl
PBS-EDTA	7.5 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	136 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
Puck's Salzlösung	5.4 mM	KCl
	4.1 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	5.6 mM	D-Glucose
	136 mM	NaCl
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2 mM	MnCl <sub>2</sub>

**4.5.3 Puffer für FACS Analyse**

Tyrode's HEPES	5 mM	HEPES
	150 mM	NaCl
	2.6 mM	KCl
	2 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	5 mM	D-Glucose
	0.02% ( <i>w/v</i> )	BSA
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	MnCl <sub>2</sub>
		pH 7.4

Trägerpuffer (gebrauchsfertig bestellt)	Becton Dickinson (Meylan Cedex, Frankreich)
--	--

**4.5.4 Puffer für SPR Experimente**

HBS-N (ohne Surfactant)	10 mM	HEPES
	150 mM	NaCl pH 7.4
CagL Puffer	50 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	200 mM	NaCl pH 7.5
ME Puffer	20 mM	Tris·HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	MnCl <sub>2</sub>
	0.125% ( <i>v/v</i> )	Triton X-100 pH 7.4

**4.5.5 Sonstige Puffer**

Puffer A	20 mM	Tris·HCl
	1 mM	EGTA pH 9.0

#### 4 Materialien

---

Puffer B	20 mM	Tris·HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	MnCl <sub>2</sub>
	0.5% (v/v)	Triton X-100 pH 7.4
Puffer C	7.5 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	136 mM	NaCl
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	100 mM	Octyl-β-D-glucopyranosid (β-OG) pH 7.4
Puffer D	30 mM	Tris·HCl
	20% (w/v)	Saccharose pH 8.0
Puffer E	30 mM	Tris·HCl pH 7.5
Bindungspuffer	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	500 mM	NaCl
	5 mM	Imidazol pH 7.8
Waschpuffer	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	500 mM	NaCl
	5 mM	Imidazol pH 6.0
Elutionspuffer	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	500 mM	NaCl
	15, 50, 500 mM	Imidazol pH 6.0

## 4.6 Antikörper

### 4.6.1 Antikörper für Western Blotting

Bezeichnung	Spezifität	Firma
<b>Primäre Antikörper</b>		
I-19	Ziege anti humanes Integrin $\alpha_3$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
H-210	Kaninchen anti humanes Integrin $\alpha_4$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
H-104	Kaninchen anti humanes Integrin $\alpha_5$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
K-18	Ziege anti humanes Integrin $\alpha_{IIb}$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
Q-20	Ziege anti humanes Integrin $\alpha_v$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
M-106	Kaninchen anti humanes Integrin $\beta_1$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
C-20	Ziege anti humanes Integrin $\beta_3$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
H-96	Kaninchen anti humanes Integrin $\beta_5$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
H-120	Kaninchen anti humanes Integrin $\beta_7$	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
c-myc-Tag	Maus anti c-myc Epitop	Invitrogen (Karlsruhe)

His <sub>6</sub> -Tag	Maus anti His-Epitop (C-Terminal)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ser-mADAM8	Kaninchen-Serum anti mADAM8	Universität Bielefeld PD Dr. Bartsch
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
	HRP-konjugiert Esel anti Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)
	HRP-konjugiert Ziege anti Kaninchen	Rockland (Gilbertsville, USA)
	HRP-konjugiert Ziege anti Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg)

#### 4.6.2 Antikörper für Zelladhäsionstest und FACS Analyse

Bezeichnung	Spezifität	Firma
3S3	Maus anti humanes Integrin $\beta_1$	Serotec Ltd (Oxford, England)
CD49b	FITC-konjugiert Maus anti humanes Integrin $\alpha_2$	Immuno Tools (Friesoythe)
CD49c	FITC-konjugiert Maus anti humanes Integrin $\alpha_3$	Serotec Ltd (Oxford, England)
CD49d	FITC-konjugiert Maus anti humanes Integrin $\alpha_4$	Serotec Ltd (Oxford, England)
BU49	Maus anti humanes Integrin $\alpha_4$	Ancell (Bayport, USA)

---

CD49f	FITC-konjugiert Maus anti humanes Integrin $\alpha_6$	Immuno Tools (Friesoythe)
CD11a	FITC-konjugiert Maus anti humanes Integrin $\alpha_L$	Immuno Tools (Friesoythe)
LM609	Maus anti humanes Integrin $\alpha_v\beta_3$	Chemicon (Hofheim)
P1F6	FITC-konjugiert Maus anti humanes Integrin $\alpha_v\beta_5$	Chemicon (Hofheim)
JBS5	Maus anti humanes Integrin $\alpha_5\beta_1$	Chemicon (Hofheim)
AIIB2	Maus anti humanes Integrin $\alpha_5\beta_1$	Chemicon (Hofheim)
143338	Maus anti humanes ADAM8	R&D Systems, GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt)
CD18	FITC-konjugiert Maus anti humanes Integrin $\beta_2$	Immuno Tools (Friesoythe)
CD17	FITC-konjugiert Maus anti humanes Integrin $\beta_3$	Immuno Tools (Friesoythe)
	Cy2-konjugiert Ziege anti Maus	Dianova GmbH (Hamburg)
	Cy3-konjugiert Ziege anti Maus	Dianova GmbH (Hamburg)

## 4.7 Materialien für die Molekularbiologie

### 4.7.1 Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaft	Herkunft
pBADgIIIa	Klonierungs- und Expressionsvektor 4 100 bp	Invitrogen (Karlsruhe)
pBADgIIIb	Klonierungs- und Expressionsvektor 4 100 bp	Invitrogen (Karlsruhe)
pBAD-hADAM-Fr	Expressionsvektor 4 844 bp 744 bp hADAM8-Fr kloniert in pBADgIIIa über Xba I und BglII	hergestellt in Rahmen dieser Arbeit
pBAD-mADAM-Fr	Expressionsvektor 4 826 bp 726 bp mADAM8-Fr kloniert in pBADgIIIb über Xba I und Xho I	hergestellt in Rahmen dieser Arbeit
pUC 18	Kontrollvektor 2 686 bp	Invitrogen (Karlsruhe)
pTrcHis2-mADAM8-Fr	Expressionsvektor mADAM8-Fr kloniert in pTrcHis2 Vektor	Unviersität Bielefeld PD Dr. Bartsch

## 4.7.2 Primer

### 4.7.2.1 Primer für die Klonierung

Primer für Klonierungen und Sequenzierungen wurden bei der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) oder Invitrogen (Karlsruhe) bestellt.

Primer	Sequenz 5'→3'
hADAM8-Fr <i>forward</i>	taataaagatctaggccccgtgtgtggg
hADAM8-Fr <i>reverse</i>	ataaattctagattggggaggctcccga
mADAM8-Fr <i>forward</i>	aaataactcgagaggtggccctgtgtgt
mADAM8-Fr <i>reverse</i>	aaatattctagatttacacagttgggtggtgc
pBAD <i>forward</i>	atgccaatagcatttttatcc
pBAD <i>reverse</i>	gatttaatctgtatcagg

### 4.7.2.2 Primer für die RNA Analyse

Alle Primer für die RNA Analyse wurden bei der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bestellt.

Primer	Sequenz 5'→3'
Integrin $\alpha_3$ <i>forward</i>	gcctgccaagctaatgagac
Integrin $\alpha_3$ <i>reverse</i>	caccagcagagtgaggatca
Integrin $\alpha_4$ <i>forward</i>	gagtgcaatgcagaccttga
Integrin $\alpha_4$ <i>reverse</i>	tggatttggctctggaaaac
Integrin $\alpha_5$ <i>forward</i>	agcgactggcatccccgaga
Integrin $\alpha_5$ <i>reverse</i>	accctcgggatccaactcca
Integrin $\alpha_8$ <i>forward</i>	cacattctggaggactgtgg
Integrin $\alpha_8$ <i>reverse</i>	aatcccttgttgttcggttc

Integrin $\alpha_v$ forward	acgaccccaatgtttacagc
Integrin $\alpha_v$ reverse	gtccttgctgctcttggaac
Integrin $\alpha_{IIb}$ forward	aggtagagaggagcagaaca
Integrin $\alpha_{IIb}$ reverse	tccaccttgagagggttgac
Integrin $\beta_1$ forward	atctgcgagtgtggtgtctg
Integrin $\beta_1$ reverse	ggggtaatttgtcccgactt
Integrin $\beta_3$ forward	ctttgtggacaagccattt
Integrin $\beta_3$ reverse	gcttcttcacctcctcgttg
Integrin $\beta_5$ forward	gaagctcaccagcaacttcc
Integrin $\beta_5$ reverse	ctgtctgtgagaggcagcag
Integrin $\beta_6$ forward	tgcgaccatcagtgaagaag
Integrin $\beta_6$ reverse	gacaaccccgatgagaagaa
Integrin $\beta_7$ forward	accgtgacccttgaacactc
Integrin $\beta_7$ reverse	tgcaactccacaatcagctc
Integrin $\beta_8$ forward	tgcaaagctgcaactaatgg
Integrin $\beta_8$ reverse	cgaagagccaaacacaatca
Oligo(dT)-Primer	Roche (Mannheim)

### 4.7.3 Enzyme und Reagenzien

#### 4.7.3.1 Enzyme

<i>Expand Reverse Transcriptase</i>	Roche (Mannheim)
Taq PCR-Mastermix	Qiagen GmbH (Hilden)
T4 DNA Ligase	Roche (Mannheim)
dNTP-Mix	Roche (Mannheim)

### 4.7.3.2 Restriktionsenzyme

BglII	5'...a gatct...3' 3'...tctaga...5'	Roche (Mannheim)
XhoI	5'...c tcgag...3' 3'...gagct c...5'	Roche (Mannheim)
XbaI	5'...t ctaga...3' 3'...agatc t...5'	Roche (Mannheim)

## 4.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 4.8.1 Geräte

#### BIAcore

BIAcore<sup>®</sup> 3000 BIAcore (Uppsala, Schweden)

#### Durchflusscytometer

BD FACS Calibur *Flow Cytometer* Becton Dickinson  
(Meylan Cedex, Frankreich)

#### Fluorometer

SPEKTRAFLUOR PLUS Tecan (Crailsheim)

#### PAGE-Apparatur

Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System BIO-RAD (München)

#### pH-Meter

pH-Meter MP 220 METTLER TOLEDO (Gießen)

#### Photometer

*Elisa-Reader* BioPhotometer Eppendorf (Hamburg)

#### Sterilbank

HERAsafe Kendro (Hanau)

#### Western-Blotting-Apparatur

Semi-Dry Trans-Blot SD BIO-RAD (München)

### 4.8.2 Verbrauchsmaterialien

#### Zellkulturflaschen

Gewebekulturflaschen T-75CN für Suspensions- und Hybridomzellen	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturflaschen T-75CN mit CELL <sup>+</sup> -Wachstumsoberfläche	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischalen für Monolayerkultur	Sarstedt (Nümbrecht)

#### Petrischalen für Bakterienkultur

Petrischalen	GREINER GmbH (Frickenheim)
--------------	----------------------------

#### Blotting Membrane

Hybond <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup> <i>Nitrocellulose Membrane</i>	Amersham PHARMACIA Biotech (Freiburg)
--	---------------------------------------

#### Mikrotiterplatten

Polystyrolplatten MicroWell <sup>TM</sup>	Nunc (Wiesbaden)
Immunoplatten MaxiSorp <sup>TM</sup>	Nunc (Wiesbaden)
Immunoplatten PolySorp <sup>TM</sup>	Nunc (Wiesbaden)

#### Säulenmaterial

Ni-NTA Harz	Invitrogen (Karlsruhe)
-------------	------------------------

#### Sensorchips

CM5 Sensorchip ( <i>research grade</i> )	BIAcore (Uppsala, Schweden)
NTA Sensorchip	BIAcore (Uppsala, Schweden)

#### Zentrifugenkonzentratoren

CENTRICON <sup>TM</sup> YM-10	Millipore (Eschboden)
CENTRIPLUS <sup>TM</sup> MWCO-10	Vivascience AG (Hannover)

## 4.9 Software

### **BIACore**

BIACore 3000 *Control Software* Version 4.1

BIAevaluation Version 4.1

### **Auswertung von biologischen Tests**

GraphPad Prism Version 4.0

### **FACS**

CELLQuest™ Version 3.3

WinMDI Version 2.8

### **Design von Primer für die RNA Analyse**

Primer3 Version 0.2



# 5 Methoden

## 5.1 Humane Zellkultur

Die erste *in vitro* Kultivierung von humanen Zellen wurde 1907 durchgeführt. Allerdings erst seit den 70iger Jahren konnte die erforderliche Reproduzierbarkeit und Züchtung von Zellen im großen Maßstab etabliert werden.<sup>[171,172]</sup> Aktuell werden Zellkulturen häufig zur Herstellung humaner Proteine oder monoklonaler Antikörper verwendet. Viele *in vitro* etablierten, humanen Zelllinien fungieren als Modellsysteme für die Untersuchung der molekularen Grundlagen von verschiedenen Krankheiten.<sup>[172,173]</sup>

Bei der Arbeit mit humanen Zelllinien ist eine aseptische Arbeitstechnik zu beachten, um Kontaminationen mit Bakterien und Mykoplasmen sowie mit Eukaryoten, Pilzen und Hefen zu vermeiden.<sup>[173]</sup> Daher wird für alle Arbeitsschritte eine sterile Reinraumwerkbank benutzt. Alle hier verwendeten Puffer, Lösungen und Medien werden vor der Arbeit filtriert (22 µm Porengröße) und sterilisiert.

Alle Zelllinien werden in einer Atmosphäre von 5.3% (*v/v*) CO<sub>2</sub> und 94.7% (*v/v*) Luft bei 37 °C kultiviert. Suspensionkulturen werden in Zellkulturflaschen T-75CN (Größe von 75 cm<sup>2</sup>) kultiviert. Monolayerkulturen werden in Gewebekulturflaschen T-75CN (Größe von 75 cm<sup>2</sup>) mit CELL<sup>+</sup>-Wachstumsfläche oder auf Petrischalen kultiviert.

### 5.1.1 Kultivierung von Suspensionskulturen

#### 5.1.1.1 Ramos Zellen

Ramos Zellen werden in RPMI 1640 Medium komplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 10% (*v/v*) fetalem Rinderkälberserum und Gentamycin (50 µg mL<sup>-1</sup>) kultiviert. Die Zelldichte wird im Bereich von 3 · 10<sup>5</sup> bis 9 · 10<sup>5</sup> Zellen mL<sup>-1</sup> gehalten. Überschreitet die Zelldichte den angegebenen Wert, erfolgt die Subkultivierung. Zur Subkultivierung wird die Zellsuspension aus der Zellkulturflasche entnommen und 7 min bei 150×g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die pelletierten Zellen werden einmal in 10 mL HBSS Puffer resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet mit frischem Medium resuspendiert, so dass sich die Zelldichte im optimalen Bereich befindet.

### 5.1.1.2 κ562 Zellen

κ562 Zellen werden im gleichen Medium wie Ramos Zellen kultiviert. Die Zelldichte wird zwischen  $1 \cdot 10^5$  und  $1 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  gehalten. Als Antibiotikum wird Gentamycin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) oder Normocin<sup>TM</sup> ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) verwendet. Die Subkultivierung erfolgt analog der bei Ramos Zellen angewendeten.

## 5.1.2 Kultivierung von Monolayerkulturen

### 5.1.2.1 Passagieren der Monolayerkulturen

Zur Subkultivierung adhärenter Zellen werden häufig Trypsin-Lösungen in Verbindung mit EDTA verwendet. Kommerzielle Trypsin-Lösungen enthalten auch andere Enzyme wie Chymotrypsin und Elastin. In dieser Arbeit wird auf proteolytische Lösungen verzichtet, um die Membranproteine im nativen Zustand zu erhalten. Zum Passagieren adhärenter Zellen wird 2 mM EDTA in PBS verwendet.

Die Zellen werden zuerst mit 10 mL HBSS oder PBS gewaschen. Danach werden sie mit 2 mL 2 mM EDTA in PBS beschichtet und maximal 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 8 mL Puffer (HBSS oder PBS) vom Boden abgespült und 7 min bei 37°C und  $150 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet mit der gewünschten Menge des neuen Mediums resuspendiert.

### 5.1.2.2 WM115 Zellen

WM115 Zellen werden in Gewebekulturflaschen T-75CN mit CELL<sup>+</sup>-Wachstumsoberfläche kultiviert. Als Wachstumsmedium wird EMEM Medium mit 2 mM L-Glutamin, 10% (*v/v*) fetalem Kälberserum, 1% (*v/v*) nichtessenziellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat und Antibiotikum verwendet. Als Antibiotikum wird Gentamycin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) oder Normocin<sup>TM</sup> ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) eingesetzt. Die Zellen werden bis 70% Konfluenz kultiviert und 1:3 bis 1:6 geteilt.

### 5.1.2.3 N1321N1 Zellen

Sowohl die transfizierte Zelllinie N1321N1-mADAM8 wie auch Wildtyp-Zellen werden in IMDM Medium mit 2 mM L-Glutamin, welches 5% (*v/v*) fetales Kälberserum, 1% (*v/v*) nichtessenzielle Aminosäuren und Gentamycin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) enthält, kultiviert. Als Selektionsantibiotikum für die transfizierte Zelllinie wird G418 ( $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) verwendet. Die Zellen werden bis zu 70% Konfluenz kultiviert und 1:2 bis 1:4 geteilt.

#### 5.1.2.4 CHO Zellen

CHO (*chinese hamster ovary*) Zellen (Wildtyp) als auch transfizierte CHO Zellen werden auf Petrischalen kultiviert. Als Wachstumsmedium wird DMEM Medium mit 2 mM L-Glutamin, 10% (*v/v*) fetalem Kälberserum, 1% (*v/v*) nichtessenziellen Aminosäuren und 40 mM Natriumpyruvat verwendet. Als Selektionsmarker für die transfizierten Zelllinien wird G<sub>418</sub> (400 µg mL<sup>-1</sup>) eingesetzt.

#### 5.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zelldichte spielt eine entscheidende Rolle für ein optimales Zellwachstum in einer Zellkultur. Besonders bei den adhärennten Zellen ist die richtige Zelldichte von großer Bedeutung. Ist die Zelldichte zu niedrig, wachsen die Zellen sehr langsam. Zu dicht ausgesäte Zellen müssen demgegenüber oft subkultiviert werden, wobei jede Subkultivierung, zumindest für nicht transfizierte Zelllinien, die Gesamtlebensdauer der Zelllinie verkürzt. Die optimale Dichte der Zellen in Zellkultur kann mittels eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer) oder eines elektronischen Zählgerätes bestimmt werden.

##### 5.1.3.1 Bestimmung der Zellzahl mittels eines Neubauer-Zählkammer

Auf die mit 70% Ethanol gereinigte Oberfläche einer Zählkammer wird das dazugehörige, leicht angefeuchtete Deckglas gelegt. Mittels einer Pipette werden 10 µL einer Zellsuspension an dem Rand der Zählkammer in die Zählkammer pipettiert. Die Zellen werden separat in mindestens vier der neun großen Quadranten gezählt und der Mittelwert  $\bar{x}$  berechnet. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgt nach Formel (5.1).<sup>[173]</sup>

$$x = \bar{x} \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1} \quad (5.1)$$

#### 5.1.4 Kryokonservierung der Zellen

Die Tendenz der Zellen zur Änderung der Proteinexpression während der Subkultivierung erfordert eine sichere Lagerung der Zellen als Stammkultur.<sup>[172]</sup> Für längere Lagerung der Zellen wird oft die Kryokonservierung genutzt. Bei Temperaturen unter  $-120^\circ\text{C}$  finden kaum biochemische Reaktionen statt. Aus diesem Grund ist Kryokonservierung ein gutes Verfahren für die langfristige Lagerung der Zellen. Bei Lagerung in flüssigem Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) werden die Zellen vor Kontamination und Variabilität geschützt. Um Kristallbildungen innerhalb und außerhalb der Zelle zu vermeiden, werden als Medienzusätze Schutzsubstanzen wie Glycerin oder Dimethylsulfoxid verwendet.<sup>[173]</sup>

#### 5.1.4.1 Einfrieren der Zellen

Die Zellen werden aus der Zellkulturflasche entnommen und pelletiert (7 min,  $150\times g$ ), einmal mit Wachstumsmedium gewaschen und mit Einfriermedium resuspendiert, so dass die Zelldichte ca.  $10^7$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  beträgt. Das Einfriermedium besteht aus 90% Wachstumsmedium und 10% DMSO. Im nächsten Schritt werden die Zellen 2 min bei  $200\times g$  zentrifugiert, langsam bei  $-80^\circ\text{C}$  18 h gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

#### 5.1.5 Auftauen der Zellen

Nach der Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff müssen die Zellen vorsichtig in die Zellkultur gebracht werden.

Zuerst werden die eingefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut, aus dem Kryoröhrchen entnommen und mit 9 mL vorgewärmtem Medium resuspendiert. Zur Entfernung der Kryoschutzsubstanzen wird die Zellsuspension bei  $150\times g$  7 min zentrifugiert und der Überstand wird abgesaugt. Danach werden die Zellen mit so viel Medium resuspendiert, dass die Zelldichte ein optimales Zellwachstum gewährleistet. Die Zellen werden, wie in Kap. 5.1.1 und 5.1.2 beschrieben, weiter kultiviert.

#### 5.1.6 Vitalitätstest von Zellen

Zur Untersuchung der Vitalität von Zellen wird routinemäßig eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion sehr leicht Proteine anfärben kann. Grundlage dieser Methode ist, dass der Farbstoff aufgrund seiner Größe und Ladung nicht in der Lage ist, in das Zellinnere einzudringen. Somit werden lebendige Zellen mit intakten Membranen nicht gefärbt, während tote Zellen intensiv markiert werden. [173,174]

Zuerst werden die Zellen in HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  Kationen resuspendiert, so dass die Zellkonzentration zwischen  $1\cdot 10^5$  und  $1\cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  liegt. 0.1 mL der Zellsuspension werden mit 2.9 mL der Trypanblaulösung (s. Seite 50) vorsichtig vermischt und 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation werden die lebendigen Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

## 5.2 Bakterienkultur

### 5.2.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* Bakterienkulturen werden in LB Medium mit oder ohne Zugabe von Antibiotikum unter Schütteln gezüchtet. Die Wachstumstemperatur wird von 18 °C bis 37 °C variiert. Eine optische Dichte bei 600 nm von 0.1 entspricht einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^7$  Zellen mL<sup>-1</sup>. Übernachtkulturen und LB Agarplatten werden bei 37 °C kultiviert.

### 5.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Als kompetente Zellen werden Zellen bezeichnet, die DNA leicht aufnehmen können. Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgt mit einer 1983 durch Hanahan etablierten Calcium-Behandlung.<sup>[175]</sup>

35 mL LB Medium werden mit 1 mL *E. coli* Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0.5 bei 37 °C ca. 2 h kultiviert. Die Zellsuspension wird 5 min bei 0 °C und 3 200×g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 10 mL eiskalter 100 mM MgCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach werden die pelletierten Bakterien in 10 mL eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien wieder 5 min bei 0 °C und 3 200×g zentrifugiert, in 3.5 mL eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen mit 0.7 mL Glycerin versetzt, in 100 µL Ansätze aliquotiert und auf Trockeneis schockgefroren. Die kompetenten Zellen werden bei -80 °C gelagert.

### 5.2.3 Lagerung der Bakterienkultur

1.5 mL einer Übernachtkultur von *E. coli* werden 5 min bei 1 150×g bei RT zentrifugiert und mit 0.5 mL 87% Glycerin versetzt, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 5.3 Zelladhäsionstest

Der Zelladhäsionstest ist eine sehr weit verbreitete Methode zur Erforschung von Protein-Protein Wechselwirkungen. In diesem Test wird die Wechselwirkung zwischen einem immobilisiertem Protein und einem Zelloberflächenrezeptor untersucht. Neben der Protein-Protein Wechselwirkung wird parallel der Einfluss von fremden Substanzen analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche biologische Testsysteme etabliert, die jeweils eine andere Zelllinie und einen anderen Proteinliganden benötigen. Die Tests werden

nach dem unten beschriebenen Schema durchgeführt. Jede Probe wird dreifach bestimmt und jeder Test wird dreifach wiederholt. Die Tests unterscheiden sich untereinander in der Inkubationstemperatur während des Bindungsschritts und der Konzentration des Proteinliganden (Tab. 5.1). Im Fall des Zelladhäsionstests mit  $\kappa 562$  Zellen, werden diese vor Testdurchführung mit TPA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) behandelt, um die Integrinexpression zu aktivieren. Bei der Durchführung der Tests mit  $N1321N1$  Zellen werden auch einige Abweichungen hinsichtlich der Puffer eingeführt. Die Zellen werden nach der Gewinnung aus der Zellkultur in PBS erhalten, so dass Inkubations- und Waschschrte während des Tests ebenfalls in PBS Puffer durchgeführt werden.

### 5.3.0.1 Aktivierung der $\kappa 562$ Zellen

Die  $\kappa 562$  Zellen werden 18 h vor dem Test durch Zugabe zur Zellkultur von 10 nM TPA aktiviert. Direkt vor dem Zelladhäsionstest werden die Zellen mit HBSS zweimal gewaschen.

### 5.3.0.2 Durchführung des Zelladhäsionstests

1. Eine 96-well Mikrotiterplatte (Immunoplatten MaxiSorp™) wird mit 100  $\mu\text{L}$  Protein (Tab. 5.1) beschichtet und 18 h inkubiert. Die Inkubationstemperatur ist von dem immobilisierten Protein abhängig. Nach der Inkubation wird das ungebundene Protein durch Waschen mit PBS entfernt und die unbesetzten Plätze auf der Plattenoberfläche werden mit 1% (*w/v*) BSA in PBS 1 h blockiert.
2. Die Zellen werden aus der Zellkulturflasche entnommen, mit HBSS gewaschen und anschließend in Puck's Salzlösung, die zusätzlich 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2 mM  $\text{MnCl}_2$  enthält, resuspendiert, so dass die Zelldichte  $1 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  beträgt. Die Zellen werden 30 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen für Kompetitionsstudien mit Peptidlösungen oder Antikörper (Kap. 6) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wird dabei vorsichtig geschüttelt.
3. Die Zellsuspension wird auf die Mikrotiterplatte gegeben (100  $\mu\text{L}$  pro Vertiefung) und 1 h bei 37°C inkubiert.
4. Die Zellsuspension wird entfernt und die gebundenen Zellen werden dreimal mit Puck's Salzlösung mit 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2 mM  $\text{MnCl}_2$  gewaschen (jeweils 100  $\mu\text{L}$  pro Vertiefung).
5. Die Zellen werden mit 5% (*w/v*) Glutaraldehyd 30 min bei RT fixiert und mit 1% (*w/v*) Kristallviolett in 0.1 M MES (pH 6.0) 1 h bei RT gefärbt.

6. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden zweimal mit 200  $\mu\text{L}$  Puck's Salzlösung mit 2 mM  $\text{MgCl}_2$  und 2 mM  $\text{MnCl}_2$  gewaschen und die gefärbten Zellen mit 0.1 M Zitronensäure in Ethanol 30 min bei RT visualisiert.
7. Die Absorption der gefärbten Zellen wird bei 560 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Spektrometers gemessen.

**Tabelle 5.1:** Bedingungen des Zelladhäsionstests.

Protein	Konzentration [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Puffer	Inkubations- temperatur
VCAM-1	4	PBS	37°C
Vitronectin	1	PBS	37°C
Fibronectin	20	PBS	37°C
mADAM8	10 – 50	PBS	37°C
CagL	0.3 – 15	CagL-Puffer	4°C

Um quantitative Aussagen über den Einfluss der getesteten Peptide auf die untersuchten Protein-Protein Interaktionen zu treffen, werden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism berechnet, die jeweils aus den Wendepunkten der Bindungskurve bestimmt werden. Die Bindungskurve bezeichnet die Adhäsion der Zellen gegen den Logarithmus der Peptidkonzentration in  $\text{mol L}^{-1}$ . Ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert entspricht einer Konzentration, bei welcher die untersuchte Wechselwirkung (z. B. Protein-Protein Interaktion, Zelladhäsion an Protein) zu 50% inhibiert wird. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte werden in dieser Arbeit, aus den Ergebnissen der Zelladhäsionsteste berechnet, in welchen die Peptide in einer Konzentrationsreihe vom mikromolaren bis zum pikomolaren Bereich getestet wurden.

## 5.4 Biochemische Methoden

### 5.4.1 SDS-PAGE

Das grundlegende Prinzip aller elektrophoretischen Techniken ist die Wanderung von geladenen Biomolekülen in einem elektrischen Feld. Die eindimensionale Elektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde 1970 durch Laemmli etabliert.<sup>[176]</sup> Bei der Vorbereitung der Probe für die Elektrophorese werden die Polypeptidketten in einem Probenpuffer hitzedenaturiert. Der Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) verursacht eine vollständige Kompensation der Eigenladung der Proteine, so dass die Proteine nur aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt werden. Der Zusatz von niedermolekularen

Thiolen wie z. B.  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) führt zu einer Zerstörung der in den Proteinen vorhandenen Disulfidbrücken.

#### 5.4.1.1 Durchführung einer SDS-PAGE Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen

Die Trennung der Proteine wird in einem Polyacrylamidgel durchgeführt. Zur Herstellung der Acrylamidgele wird zuerst die Trenngellösung vorbereitet (Tab. 5.2). Durch Zugabe von TEMED/APS wird die Polymerisation gestartet. Mittels einer Pipette wird die Trenngellösung blasenfrei zwischen zwei Glasplatten pipettiert, so dass der obere freie Raum zwischen beiden Platten ungefähr 1.5 cm beträgt. Direkt danach wird eine dünne Schicht 2-Propanol auf das Trenngel aufgetragen und die Polymerisation abgewartet. Danach wird 2-Propanol entfernt und die Sammelgellösung (Tab. 5.2) zwischen die beiden Platten bis zum oberen Plattenrand pipettiert. Zur Bildung der Probenaschen (20  $\mu$ L pro Tasche) wird ein Kamm eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation werden die Gele direkt verwendet oder in befeuchteten Papiertücher bei 4°C gelagert. Vor der Elektrophorese wird der Kamm aus dem Trenngel entfernt und die Probenaschen werden mit dem Elektrophoresepuffer gespült. Die Gele werden in die Elektrophoreseapparatur eingebaut, die mit dem Elektrophoresepuffer befüllt wird.

**Tabelle 5.2:** Zusammensetzung der Gellösungen für SDS-PAGE nach Laemmli.<sup>[176]</sup>

	Trenngel 8.5%	Trenngel 9.0%	Trenngel 9.5%	Trenngel 10.0%	Sammelgel 4.0%
Wasser	4.47 mL	4.35 mL	4.22 mL	4.10 mL	2.89 mL
Trenngelpuffer	2.50 mL	2.50 mL	2.50 mL	2.50 mL	–
Sammelgelpuffer	–	–	–	–	1.26 mL
10% SDS	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
40% Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1	2.13 mL	2.25 mL	2.38 mL	2.50 mL	0.50 mL
TEMED	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
1.5% APS	0.80 mL	0.80 mL	0.80 mL	0.80 mL	0.30 mL

Das zu analysierende Proteingemisch wird mit dem dreifachen SDS-PAGE Probenpuffer vermischt und 5 min bei 95°C erhitzt. Danach werden die Proben abgekühlt und in die Probenaschen des Gels pipettiert. Als Referenz wird zusätzlich ein Proteinmarker aufgetragen.

Die Elektrophorese wird zuerst 5 min bei 60 V durchgeführt. Danach wird die Spannung auf 100 V erhöht. Nach 15 min erreichen die Proben das Trenngel und die weitere Elek-

trophorese erfolgt bei einer Spannung von 200 V bis die Lauffront das Gelende erreicht hat.

### 5.4.2 Native Elektrophorese

Bei der nativen Elektrophorese wird auf denaturierende Substanzen im Elektrophoresepuffer (SDS) und reduzierende Substanzen im Probenpuffer ( $\beta$ -Mercaptoethanol) verzichtet. So werden die Proteine in ihren nativen Formen gehalten und nach ihrer Größe und Ladung unter nativen Bedingungen getrennt.

#### 5.4.2.1 Durchführung

Die Vorbereitung der Acrylamidgele und der Elektrophorese verlaufen analog wie bei der SDS-PAGE. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 150 V und 4°C durchgeführt. Dies verhindert eine thermische Denaturierung der Proteine und Zersetzung durch proteolytische Enzyme. Die zu analysierenden Proben werden mit einem fünffachen Probenpuffer vermischt und ohne Erhitzen analysiert. Als Standardproben werden die Proteine aus dem *Nondenatured Protein Molecular Weight Marker Kit* (14–545 kD) verwendet. Für die Zusammensetzung der Gele siehe Tab. 5.3.

**Tabelle 5.3:** Zusammensetzung der Gellösungen für die native Elektrophorese.

	Trenngel 7.5%	Sammelgel 5.0%
Wasser	4.57 mL	2.13 mL
Trenngelpuffer	2.50 mL	–
Sammelgelpuffer	–	1.00 mL
40% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	2.50 mL	0.67 mL
TEMED	10 $\mu$ L	5 $\mu$ L
APS	333 $\mu$ L	200 $\mu$ L

#### 5.4.3 Silberfärbung

Die 1979 durch Merril *et al.* eingeführte Silberfärbung stellt eine sehr sensitive Methode für die Visualisierung der in der Elektrophorese getrennten Proteine dar. Das grundlegende Prinzip beruht auf der Komplexbildung von  $\text{Ag}^+$  Kationen mit Aminosäureseitenketten, wobei besonders Sulfhydryl- und Carbonylgruppen in die Komplexbildung involviert sind. Das Verfahren nach Merril ist bis jetzt eine der empfindlichsten Varianten dieser Methode,

deren Nachweisgrenze weniger als 1 ng Protein pro Bande beträgt und damit ca. 100fach empfindlicher als die *Coomassie* Färbung ist.<sup>[177,178]</sup>

### 5.4.3.1 Durchführung

Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel entfernt und das Trenngel im 50 mL Fixierer 20 min vorsichtig geschüttelt. Danach wird das Gel zweimal 10 min mit 50 mL Wasser gewaschen. Zur Silberfärbung werden jeweils 5 mL der Silberkomplexlösung, des Modulators und des Entwicklers mit 35 mL Wasser vermischt. Diese Lösung wird immer frisch angesetzt und unverzüglich vor dem Beginn der Färbung zu 50 mL des Beschleunigers hinzugegeben. Danach wird das Gel in die vorbereitete Färbelösung überführt und so lange gewartet, bis die entstehenden Proteinbanden die erwartete Intensität erreichen. Anschließend wird das Gel in Stopplösung überführt und dokumentiert. Für die Zusammensetzung der Lösungen siehe Kap. 4.5.1.

### 5.4.4 *Coomassie* Färbung

Die *Coomassie* Färbung weist eine niedrigere Empfindlichkeit als die Silberfärbung auf. Die Detektionsgrenze liegt im Bereich von 0.1 µg bis 2 µg Protein pro Bande. Die Bildung der blauen Komplexe des Farbstoffes mit Proteinen ist bis jetzt nicht vollständig verstanden. *Coomassie* Farbstoffe sind komplexe aromatische Verbindungen mit geladenen funktionellen Gruppen. Es wird angenommen, dass diese Farbstoffe durch Sulfonylgruppen mit positiv geladenen Seitenketten der Proteine wechselwirken, zusätzlich wird die Bildung der Farbstoff-Protein Komplexe durch van der Waals Wechselwirkungen stabilisiert.<sup>[179]</sup> Die Bindung des Farbstoffes an Proteine ist vollständig reversibel.

#### 5.4.4.1 Durchführung

Nach der Elektrophorese wird das Trenngel 20 min fixiert und zweimal 10 min mit Wasser gewaschen (Kap. 4.5.1). Das Gel wird in die *Coomassie* Färbelösung überführt und 2 h vorsichtig geschüttelt. Danach wird das Gel bis zur gewünschten Intensität der Proteinbanden in Wasser entfärbt und dokumentiert.

### 5.4.5 *Coomassie* kolloidale Färbung

Die kolloidale *Coomassie* Methode zeichnet sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich zu der klassischen *Coomassie* Färbung aus. Die Nachweisgrenze dieser Methode beträgt 25 ng Protein pro Bande.<sup>[180]</sup>

#### 5.4.5.1 Durchführung

Das Gel wird kurz mit Wasser gewaschen, in die kolloidale *Coomassie* Färbelösung (Kap. 4.5.1) überführt und 15 h geschüttelt. Anschließend wird das Gel zur gewünschten Intensität entfärbt und dokumentiert.

#### 5.4.6 Immunochemische Proteindetektion – Western Blotting

Western Blotting beruht auf einem Transfer der getrennten Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine proteinbindende Membran, gefolgt von einem Immunnachweis mit proteinspezifischen Antikörpern. Der Transfer der Proteine erfolgt senkrecht zur Trennrichtung. Dies resultiert in der Wiedergabe des Proteinmusters aus dem Gel auf der Membran. Als proteinbindende Membranen werden meistens Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder Nitrocellulose (NC) Membranen verwendet. Die Proteinbindekapazität der PVDF Membran beträgt  $600 \mu\text{g cm}^{-2}$  und ist ca. viermal höher als die Proteinbindekapazität der NC Membran. Aus diesem Grund zeigt die PVDF Membran eine stärkere Tendenz zu unspezifischen Hintergrundreaktionen mit dem Nachweisreagenz. In dieser Arbeit wurde die NC Membran verwendet. Nach Bindung eines mono- oder polyklonalen Antikörpers erfolgt die Detektion des Protein-Antikörper Komplexes mittels einer ausgewählten Detektionsmethode.<sup>[181,182]</sup>

Zur Durchführung des Transfers der Proteine sind zwei Verfahren bekannt, *wet-blot* und *semi-dry-blot*.<sup>[181,183]</sup> Das *Semi-dry-blot* Verfahren ist in der Durchführung schneller als das *wet-blot* Verfahren. Zusätzlich können beim *Semi-dry-blot* Verfahren mehrere Polyacrylamidgele gleichzeitig dem Elektrotransfer unterzogen werden. In dieser Arbeit wurde das *Semi-dry-blot* Verfahren verwendet.

Die Effizienz des Transfers der Proteine auf die Membran wird mittels Ponceau s Färbung nachgewiesen. Ponceau s ist ein anionischer, sehr hydrophiler Diazofarbstoff, der unspezifisch alle Proteine anfärbt. Die Bindung ist reversibel und kann mit wässrigen Puffern leicht entfärbt werden. Die Proteinnachweisgrenze der Färbung liegt bei  $5 - 15 \text{ ng mm}^{-2}$ . Diese Färbung ist besonders empfehlenswert, wenn bei der Elektrophorese keine vorgefärbten Standardproteine verwendet werden.<sup>[184]</sup>

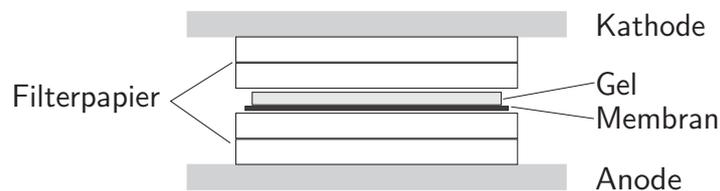
Die transferierten Proteine werden durch spezifische Antikörper direkt oder indirekt markiert. Die direkte Methode involviert nur einen ersten sogenannten primären Antikörper, der mit einem Enzym kovalent konjugiert ist. Bei der indirekten Methode wird zusätzlich ein sekundärer Antikörper verwendet, der mit einem Enzym konjugiert ist und gegen den primären, nicht konjugierten Antikörper gerichtet ist. Diese Variante des Immunnachweises besitzt eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu dem direkten Immunnachweis und wird in dieser Arbeit verwendet.

Nach der Detektion mit spezifischen Antikörpern wird eine Nachweisreaktion durchgeführt. Bei Zugabe entsprechender Substrate liefert das Enzym entweder ein gefärbtes (Farbreaktion) oder ein Licht emittierendes Produkt (Chemilumineszenz). In dieser Arbeit werden die Nachweisreaktionen mit zwei Substraten durchgeführt, POD (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) und DAB (3,3'-Diaminobenzidin). Die beiden Substanzen stellen Substrate für die Meerrettichperoxidase (HRP, EC: 1.11.1.7) dar und in der enzymatischen Reaktion entsteht ein blaues Produkt. POD Substrat ist im Vergleich zu DAB ein effizienteres Substrat für das HRP Konjugat und ist nicht karzinogen oder teratogen.<sup>[185,186]</sup>

#### 5.4.6.1 Durchführung

##### 1. Transfer der Proteine

Nach der Elektrophorese wird das Gel kurz mit Wasser gewaschen und direkt dem Elektrotransfer unterzogen. Zuerst werden Filterpapiere und Nitrocellulose- oder Polyvinylidenfluoridmembran mit Transferpuffer getränkt. Die Apparatur für das Western Blotting nach dem *Semi-dry* Verfahren wird, wie in Abb. 5.1 dargestellt, zusammengebaut. Das Gel wird zwischen getränkte Filterpapiere luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Der Transfer erfolgt mindestens 40 min bei einer Spannung von 16 V.



**Abbildung 5.1:** Schematischer Aufbau einer Western Blotting Apparatur nach dem *Semi-dry* Verfahren.

##### 2. Ponceau s Färbung

Nach dem Transfer wird die Membran in 10 mL Ponceau s Lösung überführt und 5-10 min geschüttelt, bis rote Banden beobachtet werden. Danach wird die Membran mit TBS gewaschen, bis die sichtbaren Banden vollständig entfärbt sind.

##### 3. Nachweisreaktion mit Antikörpern

Zuerst wird die Membran mit 25 mL Blockierungspuffer 30 min bei RT geschüttelt. In diesem Schritt werden freie Stellen auf der Membran gesättigt. Danach wird die Membran zweimal mit PBST gewaschen und der primäre Antikörper, gelöst in PBST

wird hinzugegeben (Tab 5.4). Es wird 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wird drei- bis fünfmal mit ca. 15 mL PBST gewaschen. Anschließend wird der sekundäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in PBST hinzugegeben und 1 h bei RT inkubiert (Tab 5.4). Nachfolgend wird die Membran drei- bis fünfmal mit ca. 15 mL PBST gewaschen.

**Tabelle 5.4:** Verwendete Verdünnungen der Antikörper im Western Blotting.

Bezeichnung	Verdünnung
<i>Primärer Antikörper</i>	
M-106, C-20, H-120	1:100
I-19, H-210, H-104, K-18, Q-20, H-96	1:200
Ser-mADAM8	1:1 000
c-myc-Tag, His <sub>6</sub> -Tag	1:5 000
<i>Sekundärer Antikörper</i>	
Esel anti Ziege	1:2 000
Ziege anti Kaninchen	1:10 000
Ziege anti Maus	1:5 000

#### 4. Detektion des Protein-Antikörper-Komplexes

Bei der Visualisierung mit POD Substrat wird die Membran mit 3 mL der gebrauchsfertigen Färbelösung beschichtet und so lange gewartet, bis die entstehenden blauen Banden die gewünschte Intensität erreichen. Es wird mit Wasser gewaschen und das auf der Membran erhaltene Proteinmuster dokumentiert.

Bei der enzymatischen Reaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin wird zuerst eine DAB-Tablette in 15 mL TBS gelöst und mit 12 µL Wasserstoffperoxid versetzt. Die Lösung wird direkt auf die Membran gegeben und bis zum Erscheinen der braunen Banden gewartet. Die Färbelösung wird entfernt und die Membran wird mit Wasser gewaschen. Das Proteinmuster auf der Membran wird dokumentiert.

#### 5.4.7 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Elektrophorese von Nukleinsäuren eignen sich Agarose- und Polyacrylamidgele. In dieser Arbeit wurde das Agarose-Gelsystem verwendet.

Die Agarosesuspension (Agarose in TAE Elektrophoresepuffer) wird erhitzt und auf ca. 50 °C abgekühlt. Danach wird sie in eine passende Kammer gegossen und ein Proben-taschenkamm eingesetzt. Ist das Gel erstarrt, wird der Taschenkamm entfernt. Das Gel

wird mit TAE Elektrophoresenpuffer beschichtet. Die Proben werden mit sechsfachem DNA-Probenpuffer vermischt und in die Probentaschen (20  $\mu\text{L}$  pro Tasche) gegeben. In dieser Arbeit werden abhängig von der Nukleinsäuregröße 1% und 2% Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgt zuerst 10 min bei einer Spannung von 60 V und dann ca. 1 h bei 100 V. Nach der Elektrophorese wird eine Ethidiumbromidfärbung der Nukleinsäuren durchgeführt. Für die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen siehe Kap. 4.5.1.

### 5.4.8 Ethidiumbromidfärbung von Nukleinsäuren

Die Anfärbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid ist die häufigste Methode zur Identifizierung der elektrophoretisch getrennten DNA und RNA Fragmente. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren. Die Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplexe werden mit UV-Licht (254, 302 oder 366 nm) angeregt und im sichtbaren Lichtbereich als rot-orange leuchtende Banden beobachtet. Die Nachweisgrenze dieser Färbung auf Agarosegelen beträgt 5 ng DNA pro Bande. Bei einzelsträngigen Nukleinsäuren (RNA-Proben) nimmt die Affinität des Ethidiumbromids zu Nukleotiden drastisch ab. Dadurch wird die Nachweisgrenze in diesem Fall stark vermindert.

#### 5.4.8.1 Durchführung

Nach der Elektrophorese wird das Agarosegel mit Wasser kurz gewaschen und in das Ethidiumbromidbad (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) überführt. Es wird 20 min geschüttelt und anschließend 10 min mit Wasser gewaschen. Danach wird das Gel mit Hilfe einer UV-Lampe betrachtet und dokumentiert.

### 5.4.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird ein Bicincholinsäuretest, der *MicroBC Assay: protein quantitation kit* von Interchim verwendet. Der Test basiert auf der Reduktion der zweiwertigen Kupferkationen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) durch in Proteinen vorhandene Peptidbindungen. Bicincholin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) chelatiert die reduzierten einwertigen Kupferkationen ( $\text{Cu}^+$ ) und bildet dabei violette Farbkomplexe, die spektrometrisch quantifiziert werden. Die gemessene Absorption der gebildeten Komplexe ist proportional zu der Proteinkonzentration. Dieser Test weist Toleranz für nichtionische Detergenzien und bestimmte anorganische Salze auf, reduzierende Substanzen wie Mercaptoverbindungen, Wasserstoffperoxid oder chelatierender Substanzen jedoch wie z. B. EDTA stören bei dieser Messung.<sup>[187]</sup> Diese Substanzen waren in den verwendeten Proben nicht vorhanden.

Ein großer Vorteil dieser Proteinkonzentrationsbestimmung ist die hohe Genauigkeit im Vergleich zu anderen Methoden.

Der Test wird auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Als Referenzproben werden BSA Lösungen in einer Konzentrationsreihe von 0.5 bis 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  verwendet. 100  $\mu\text{L}$  eventuell verdünnter Proteinprobe und 100  $\mu\text{L}$  der nach der Vorschrift vermischten Reagenzien werden auf die Platte pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wird die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption bei 560 nm gemessen.

#### 5.4.10 Fällung der Proteine mit organischen Lösungsmitteln

Organische Lösungsmittel wie Aceton oder Ethanol haben einen ähnlichen Effekt auf die Proteinlösungen wie hohe Salzkonzentrationen. Bei Zugabe wird die Löslichkeit der Proteine vermindert und diese präzipitieren. Dieses Verfahren wird meistens in den ersten Schritten einer Proteinaufreinigung oder zur Erhöhung der Konzentration von der Proteinproben benutzt.

Die Proteinprobe wird mit vierfachem Probenvolumen Aceton versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht gefällt. Anschließend wird die Probe bei  $4^{\circ}\text{C}$  20 min und  $20\,000\times g$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit der gewünschten Menge des Puffers resuspendiert und weiter analysiert.

#### 5.4.11 Extraktion der Integrine aus der Zellmembran

Die Isolierung von Membranproteinen aus der Zellmembran erfolgt mit Hilfe von Detergenzien. Die Detergenzmoleküle imitieren die Lipid-Doppelschicht der biologischen Membranen durch Bildung von Mizellen. Die Detergenzmizellen entstehen, wenn die Detergenzkonzentration die kritische Mizellenbildungskonzentration (*critical micelle concentration* – CMC) erreicht hat. Die gebildeten Mizellen ähneln einer Lipid-Doppelschicht, so dass die Zellmembran solubilisiert wird und die Membranproteine in die Detergenzmizellen eingebaut werden. Die auf diese Weise gewonnenen Membranproteine behalten ihre native Struktur und biologische Aktivität.

In dieser Arbeit wurden die Membranextrakte (ME) nach Methoden von Belkin *et al.* und Pytela *et al.* aus humanen Zellen gewonnen, deren Integrinexpression stark variiert. Beide Methoden beruhen auf einer Solubilisierung der Zellmembran durch ein Detergens. In der Methode von Belkin *et al.* wird Triton X-100 und in der Methode von Pytela *et al.* Octyl- $\beta$ -D-glukopyranosid ( $\beta$ -OG) als Detergens benutzt.<sup>[188,189]</sup> Die in Membranextrakten vorkommenden Integrine werden hinsichtlich molekularer und biochemischer Eigenschaften

untersucht und charakterisiert. Die hier verwendeten Prozeduren für die Präparation der Membranextrakte wurden durch Zimmermann optimiert.<sup>[52]</sup>

#### 5.4.11.1 Herstellung des Membranextrakts nach Belkin *et al.*

1. Die Zellen werden aus der Zellkulturflasche entnommen, zweimal mit HBSS gewaschen und pelletiert. 200 µg Zellpellet werden in 1.7 mL Wasser resuspendiert, 10 min bei Raumtemperatur und 20 000×g zentrifugiert und der Überstand wird entfernt. Alle verwendeten Lösungen enthalten 0.5 mM Proteinaseinhibitor PMSF.
2. Das Pellet wird in 1.5 mL Extraktionspuffer (Puffer A) resuspendiert. Die erhaltene Suspension wird 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wird 10 min bei RT und 20 000×g zentrifugiert und der Überstand verworfen. In diesem Schritt werden vor allem die peripheren Membranproteine extrahiert.<sup>[190,191]</sup>
3. Das Pellet wird mit 1.7 mL Wasser gewaschen und wiederum 10 min bei Raumtemperatur und 20 000×g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt.
4. Im nächsten Schritt erfolgt die Solubilisierung der Zellmembran mit Detergens. Zu diesem Zweck wird das Pellet mit 600 µL Extraktionspuffer (Puffer B) resuspendiert und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Um die Integrinkonzentration im ME zu erhöhen, kann das Volumen des Puffers B auf 400 µL reduziert werden. Alternativ zu dem verwendeten Triton X-100 in Puffer B werden auch andere Detergenzien wie β-OG und Brij 35P benutzt.
5. Nach der Solubilisierung mit Detergens erfolgt 20 min eine Zentrifugation des Membranextrakts bei 20 000×g und 4°C. Der integrinhaltige Membranextrakt wird bei -80°C gelagert.

#### 5.4.11.2 Herstellung des Membranextrakts nach Pytela *et al.*

1. Die Zellen werden aus der Zellkulturflasche entnommen und pelletiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Um die Aktivität der Integrine zu gewährleisten, wird PBS mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet.
2. Das Pellet wird mit dem Extraktionspuffer (Puffer C) im Volumenverhältnis 1:2 resuspendiert und 15 h bei 4°C geschüttelt.
3. Nach der Solubilisierung der Zellmembranen wird die Suspension bei 20 000×g und 4°C zentrifugiert. Der Proteinextrakt wird bei -80°C gelagert.

#### 5.4.12 Bestimmung der Integrinkonzentration im Membranextrakt

Die Konzentration der Integrine im ME wird nach einer SDS-Gelelektrophorese in einem Gel bestimmt. Parallel zu den ME-Proben werden BSA-Proben in Konzentrationen von  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  auf das Gel aufgetragen. Die Bestimmung erfolgt durch einen Vergleich der Bandenintensität der Integrinuntereinheiten mit BSA-Banden nach Silberfärbung.

#### 5.4.13 Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression der mADAM8-Fr und hADAM8-Fr Proteine in *E. coli* (BL21 Stämme mit pBAD-hADAM-Fr und pBAD-mADAM-Fr Plasmiden) wird mit Arabinose induziert. Für eine korrekte Expression und Sekretion der Proteine in den periplasmatischen Raum werden optimale Arabinosekonzentration und Kultivierungsbedingungen ermittelt.

50 mL LB Medium werden mit 1 mL entsprechender *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert bis die optische Dichte der Bakteriensuspension einen Wert von  $\text{OD}_{600} = 0.5$  erreicht hat. 1 mL Zellkulturprobe wird entnommen, pelletiert und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Proteinexpression wird durch Zugabe von Arabinose induziert. Um die optimalen Bedingungen für die Proteinexpression zu finden, werden Induktorkonzentrationen von 0.2% bis 0.02% und die Kultivierungstemperaturen 23, 30,  $37^\circ\text{C}$  sowie eine Kultivierungsdauer von 3 bis 15 h getestet. Am Ende der Kultivierung werden 1 mL Zellkulturprobe entnommen und pelletiert. Die Bakterienpellets werden mit  $90 \mu\text{L}$  Wasser und  $45 \mu\text{L}$  SDS-PAGE Probenpuffer (3x) resuspendiert, 5 min auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und elektrophoretisch untersucht.

#### 5.4.14 Proteinaufreinigung aus *E. coli*

Die Aufreinigung der mADAM8-Fr und hADAM8-Fr Proteine erfolgt mit Hilfe eines Ni-NTA Harzes nach der Methode des Herstellers.<sup>[192]</sup> Das mADAM8-Fr wird aus der periplasmatischen Fraktion der *E. coli* Bakterien aufgereinigt. hADAM8-Fr wird aus der periplasmatischen als auch aus der cytoplasmatischen Fraktion aufgereinigt. Für die Präparation der beiden Fraktionen werden die Prozeduren nach Novagen modifiziert.<sup>[193]</sup> Für die Zusammensetzungen der Puffer siehe Kap. 4.5.5.

Zur Aufreinigung der His-markierten Proteine wird eine Polyhistidinaffinitätschromatographie verwendet. Imidazolgruppen des Polyhistidinpeptides chelatieren die freien Koordinationsstellen von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen, welche ihrerseits als Chelatkomplexe mit einer an eine Festphase gebundene Nitrilotriethansäure (NTA) vorliegen. Bei der Festphase handelt es sich in den meisten Fällen um Agarose oder Sepharose. Das an Harz gebundene Protein

wird mit einem Imidazolgradienten eluiert.<sup>[194]</sup> In dieser Arbeit wird Ni-NTA-Agarose von Invitrogen verwendet.

### 5.4.14.1 Präparation der periplasmatischen Fraktion aus *E. coli*

1 L Bakterienkultur wird 20 min bei RT und  $4\,000\times g$  pelletiert. Das Pellet wird in 120 mL Puffer D resuspendiert und es werden EDTA und PMSF zugefügt, so dass eine Endkonzentration von 1 mM bzw. von 0.5 mM erreicht wird. Die Bakteriensuspension wird 10 min bei RT gerührt und danach 10 min bei  $10\,000\times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 60 mL 20 mM eiskalter  $\text{MgSO}_4$ -Lösung mit 0.5 mM PMSF resuspendiert und auf Eis 10 min gerührt, so dass Schaumbildung vermieden wird. In diesem Schritt werden die periplasmatischen Proteine freigesetzt. Danach wird die Suspension 10 min bei  $10\,000\times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand (periplasmatische Fraktion) wird direkt für die Aufreinigung der Proteine eingesetzt oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Das Pellet wird weiter zur Gewinnung der cytoplasmatischen Fraktion verwendet.

### 5.4.14.2 Präparation der cytoplasmatischen Fraktion aus *E. coli*

Sowohl das Pellet direkt nach dem Zentrifugieren der Bakterienkultur, als auch das Pellet nach der Präparation der periplasmatischen Fraktion kann zur Gewinnung der cytoplasmatischen Fraktion verwendet werden. Hierzu wird das jeweilige Pellet mit 40 mL Puffer E resuspendiert.  $1\text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym und  $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  DNase I werden dem Puffer zugegeben. Es wird 15 min bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt und danach im Ultraschall (dreimal 30 s mit einminütigen Pausen) lysiert. Die Suspension wird anschließend 10 min bei  $10\,000\times g$  zentrifugiert. Der Überstand enthält die cytoplasmatische Fraktion und das Pellet Bakterientrümmern und unlösliches Protein („*inclusion bodies*“).

### 5.4.14.3 Polyhistidinaffinitätschromatographie

Die Proteinaufreinigung wird im *batch* Verfahren bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. 4 mL 50% Ni-NTA Harzsuspension (Invitrogen) werden mit 16 mL Wasser gewaschen und 1 min bei  $1\,000\times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Harz wird mit 20 mL Bindungspuffer äquilibriert. Die periplasmatische bzw. cytoplasmatische Fraktion wird konzentriert und auf das Harz in Bindungspuffer aufgetragen. Zur Bindung von His<sub>6</sub>-Tag Protein wird das Harz 1 h geschwenkt. Danach wird das Harz zentrifugiert, der Überstand entfernt und es folgen fünf Waschschritte mit jeweils 20 mL Waschpuffer und 2 min Resuspensionszeit. Es wird zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Die gebundenen Proteine werden mit einem Imidazolgradienten (15, 50, 500 mM) eluiert. Das Harz wird jeweils mit 12 mL

Elutionspuffer resuspendiert, 10 min geschwenkt und zentrifugiert. Der Überstand enthält polyhistidinmarkiertes Protein.

## 5.5 Molekularbiologische Methoden

### 5.5.1 Isolierung von Ribonukleinsäure aus humanen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus humanen Zellen wird mit Hilfe des Kits *Nucleo-Spin*<sup>®</sup> *RNAII* von Macherey-Nagel durchgeführt. Die aufgereinigte Gesamt-RNA ist frei von DNA und kann direkt für die RT-PCR Analyse eingesetzt werden.

Zunächst werden die Zellen aus der Zellkulturflasche entnommen und mit einem Lysepuffer aufgeschlossen. Der Lysepuffer enthält eine hohe Konzentration von chaotropen Ionen und verursacht die sofortige Deaktivierung der RNasen und ist damit schonend für RNA. Die lysierten Zellen werden auf die RNA-bindende Silikamembran aufgetragen. Die enthaltene DNA wird durch Zugabe von DNase I entfernt. Danach wird die Silikamembran gewaschen, um Puffersalze zu entfernen. Anschließend wird die RNA mit RNasen-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der isolierten RNA wird photometrisch bei 260 nm bestimmt.

### 5.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1987 durch Kary B. Mulis entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) revolutionierte die Molekularbiologie.<sup>[195]</sup> 1993 erhielt Mulis für diese Entdeckung den Nobelpreis in Chemie. Die PCR ermöglicht *in vitro* eine schnelle, enzymatische Synthese von millionenfachen Kopien bestimmter Nukleotidsequenzen.

Ausgehend von einem DNA Startermolekül, synthetisiert eine DNA Polymerase einen neuen DNA Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize. Die Reaktion benötigt den Einsatz von spezifischen DNA Oligonukleotiden, die an das DNA Templat hybridisieren. Für die PCR werden thermostabile DNA Polymerasen wie z. B. *Taq* Polymerase oder *ThermalAce*<sup>™</sup> Polymerase verwendet. Die *ThermalAce*<sup>™</sup> Polymerase zeichnet sich durch eine sehr hohe Thermostabilität und eine fünffach höhere Prozessivität im Vergleich zu *Taq* Polymerase aus. *ThermalAce*<sup>™</sup> Polymerase besitzt eine sehr hohe Genauigkeit des neusynthetisierten Nukleotidstranges aufgrund einer *proofreading* Aktivität. Der Fehler bei der Synthese eines neuen Nukleotidstranges ist sehr niedrig und nur ein Nukleotid pro  $6 \cdot 10^5$  wird während der Bildung von Basenpaaren falsch eingebaut.<sup>[196,197]</sup>

### 5.5.3 RT-PCR

Mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-PCR (RT-PCR) werden spezifische RNA-Sequenzen amplifiziert. Zuerst erfolgt die reverse Transkription, in welcher die RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben wird. Bei der Durchführung einer RT-PCR kann zwischen *two-step* RT-PCR und *one-step* RT-PCR unterschieden werden. In der *two-step* RT-PCR erfolgt zuerst die Synthese der cDNA mit RNA als Template. Mit Hilfe eines etwa 15 bis 20 bp langen Oligo(dT)-Primers, der im Bereich des Poly(A)-Endes am 3'-Terminus der eukaryotischen mRNA hybridisiert, werden aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt wird mit Hilfe von spezifischen Primern eine PCR durchgeführt, für die cDNA als die Templat dient. Bei der *one-step* RT-PCR erfolgen beide Schritte der RT-PCR in einem Reaktionsgefäß. Da einer der beiden Primer in der Reaktion für die cDNA-Erststrangsynthese verwendet wird, sind sequenzspezifische Primer eine unabdingbare Voraussetzung für die *one-step* RT-PCR.

In dieser Arbeit wurden beide Varianten der RT-PCR Methode angewendet. Die *two-step* RT-PCR wurde zur Analyse der Integrinexpression in Ramos Zellen eingesetzt. Mit der *one-step* RT-PCR wurde die Integrinexpression in WM115 Zellen untersucht.

#### 5.5.3.1 *two-step* RT-PCR

##### 1. Reverse Transkription

2 µg RNA, 5.7 µL Wasser und 1 µL Oligo(dT)<sub>15</sub> werden vermischt und 10 min bei 65 °C erhitzt. Danach wird 2 min auf eiskaltem Wasser gekühlt. 4 µL fünffacher Reaktionspuffer, 4 µL dNTP-Mix, 2 µL DTT und 0.5 µL RNase-Inhibitor werden vermischt und bei 43 °C erwärmt. Beide Ansätze werden vereinigt und 1 µL reverse Transcriptase wird hinzugegeben (siehe Kap. 4.7.3). Die Transkription erfolgt 1 h bei 43 °C und 10 min bei 70 °C. Das Produkt der *reversen* Transkription wird direkt für die PCR eingesetzt.

##### 2. Polymerase-Kettenreaktion

7.2 µL Wasser, 10 µL zweifacher Taq-PCR-Mastermix (Qiagen), 20 pmol *forward* Primer, 20 pmol *reverse* Primer und 2 µL RT-Ansatz werden gemischt. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 4.11 aufgelistet. Die PCR wird mit dem in Tab. 5.5 dargestellten Programm durchgeführt. Danach werden die Proben auf 20 °C abgekühlt und in einer Agarosegelelektrophorese untersucht. Die Analyse der synthetisierten DNA-Fragmente wird in 2% Agarosegel durchgeführt. Auf das Gel wird parallel ein DNA-Längenstandard (100–5 000 bp) aufgetragen.

**Tabelle 5.5:** Programm für die Polymerase-Kettenreaktion.

Nr.	Schrittbezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	94 °C	4 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Primer-Hybridisierung	65 °C	45 s
4	Polymerisation	72 °C	45 s
	<i>35-fache Wiederholung der Schritte 2-4</i>		
5	Polymerisation	72 °C	10 min

### 5.5.3.2 one-step RT-PCR

Die *one-step* RT-PCR wird mit Hilfe des *peqGOLD Single Tube RT-PCR-kit* von PeqLab Biotechnologie durchgeführt.

5 µL RNA, 5 µL fünffacher Reaktionspuffer, 2.5 µL 5 mM dNTP-Mix, 20 pmol *forward* Primer, 10 pmol *reverse* Primer und 1 µL Enzymgemisch werden gemischt und das Volumen mit Wasser auf 25 µL aufgefüllt. Das Programm für die RT-PCR ist in Tab. 5.6 dargestellt.

**Tabelle 5.6:** Programm für die Reverse Transkription-PCR.

Nr.	Schrittbezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	65 °C	5 min
2	Kühlen	4 °C	3 min
3	<i>reverse</i> Transkription	42 °C	30 min
4	Aktivierung der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	95 °C	10 min
5	Denaturierung	94 °C	1 min
6	Primer-Hybridisierung	65 °C	45 s
7	Polymerisation	72 °C	45 s
	<i>35-fache Wiederholung der Schritte 5-7</i>		
8	Polymerisation	72 °C	5 min

### 5.5.4 Klonierung des ADAM8 Proteins

Im Rahmen dieser Arbeit werden murines und humanes ADAM8 Protein nach der Vorschrift von Bartsch rekombinant in einem bakteriellen Expressionssystem hergestellt. Es wird jeweils ein Fragment des ADAM8 Proteins synthetisiert, das drei nebeneinanderliegende Domänen des extrazellulären Teils des ADAM8 Proteins enthält (Abb. 5.2).



**Abbildung 5.2:** Schematische Darstellung der hergestellten ADAM8 Konstrukte.

Für die Expression der beiden Proteine in *E. coli* wird ein pBADgIII Plasmid verwendet. Dieser Vektor ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus der gewünschten Sequenz und einem N-terminalen Signalpeptid für die Sekretion des Proteins in das Periplasma. Das 18 Aminosäuren lange Signalpeptid wird durch das Gen *gIII* kodiert und ist Bestandteil eines der wichtigsten Capsidproteine des filamentösen Phagen *fd*.<sup>[198]</sup> In die Insertion des Signalpeptides *pIII* in die Membran ist das bakterielle Sekretionssystem *Sec* involviert. Nachdem das Protein die innere Membran passiert, wird das Signalpeptid entfernt und das Protein in das Periplasma sezerniert.<sup>[198–200]</sup>

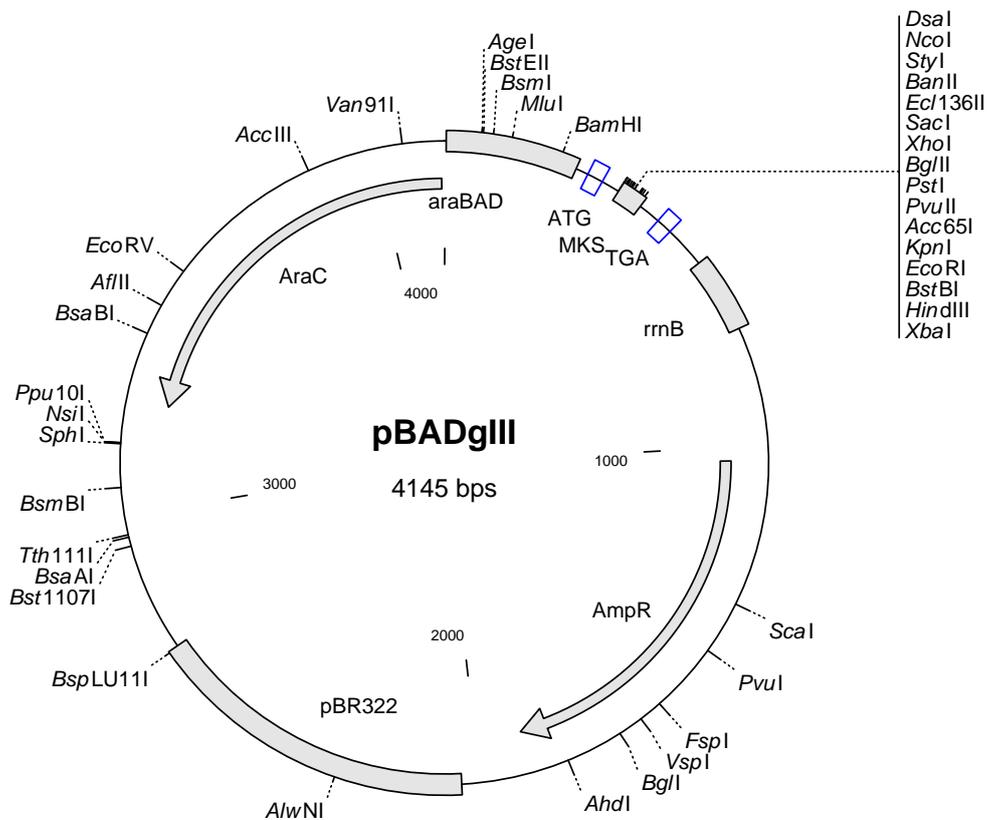
Für die Regulation der Proteinexpression ist das im Plasmid vorhandene *araBAD*-Operon verantwortlich. Die Proteinexpression wird durch die Zugabe von Arabinose zum Medium induziert. Der Aufbau des pBADgIII Plasmids ist in Abb. 5.3 zusammengefasst. Das klonierte Protein enthält am C-Terminus zwei zusätzliche Epitope, c-myc- und ein Polyhistidinepitop. Das c-myc-Epitop besteht aus zehn Aminosäuren und ist Bestandteil des  $p62^{c-myc}$  Proteins. Dieses Epitop ermöglicht die Identifizierung des hergestellten Proteins mit Hilfe eines gegen das c-myc Epitop gerichteten Antikörpers.<sup>[201]</sup> Das am C-Terminus lokalisierte Hexahistidinpeptid ermöglicht die Aufreinigung des Proteins mit Hilfe einer NTA Affinitätschromatographie. Der Antikörper gegen dieses Hexapeptid wird zusätzlich zur Identifizierung des Proteins eingesetzt.

### 5.5.5 Amplifizierung der cDNA für die Klonierung

Die entsprechende DNA Templates für die Klonierung werden zuerst durch PCR amplifiziert. Für die Amplifizierung der *mADAM8* cDNA wird zunächst das pTrecHis2-*mADAM8*-Fr Plasmid aus *E. coli* Bakterien isoliert und anschließend als Templat für die PCR eingesetzt. Für die *hADAM8* Template wird die vollständige DNA-Sequenz des humanen ADAM8 verwendet. Die beiden DNA Konstrukte stammten von PD Dr. Bartsch. Die verwendeten Primer sind im Kap. 4.7.2.1 aufgelistet. Die Polymerase-Kettenreaktion wird mit Hilfe des *ThermalAce*<sup>TM</sup> DNA Polymerase Kit von Invitrogen durchgeführt.

#### 5.5.5.1 Durchführung

100 ng DNA Templat, 100 ng *forward* Primer, 100 ng *reverse* Primer, 1  $\mu$ L 50x dNTP-Mix (10 mM) und 5  $\mu$ L zehnfacher *ThermalAce*<sup>TM</sup> Puffer werden zusammengegeben und mit



**Abbildung 5.3:** Vektorkarte des pBADgIII Plasmids. Die AraC-Region steht für die Gene, die AraC Protein kodiert. AmpR steht für die Gene, die  $\beta$ -Lactamase kodiert. pBR322 steht für pBR322 *origin* und ist verantwortlich für die Replikation des Plasmids in *E. coli*. AraBAD entspricht der Promotor-Region *araBAD*. ATG und TGA bezeichnen das Start- und Stopkodon. MKS steht für die multiple Klonierungsstelle.

Wasser auf 49  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Danach wird 1  $\mu\text{L}$  *ThermalAce*<sup>TM</sup> DNA Polymerase (2  $\text{U}\mu\text{L}^{-1}$ ) hinzugefügt und gemischt. Es wurden zwei Hybridisierungstemperaturen ausgetestet (Tab. 5.7), um die erfolgreiche Synthese der cDNA Fragmenten zu gewährleisten. Die synthetisierten DNA Fragmente werden in 1% Agarosegelen analysiert. Als Marker wird Hyperlader IV<sup>TM</sup> (100–1000 bp) von Bioneer eingesetzt.

### 5.5.6 Restriktionsverdau

Die mittels Polymerase-Kettenreaktion hergestellten Nukleotidsequenzen und die aus Bakterien isolierten Plasmide werden mit Hilfe der entsprechenden Restriktionsenzyme verdaut.

**Tabelle 5.7:** Herstellung der cDNA Template in einer PCR.

Nr.	Schrittbezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95 °C	3 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s
3	Primer-Hybridisierung	54, 64 °C	30 s
4	Polymerisation	74 °C	1 min
	<i>30-fache Wiederholung der Schritte 2-4</i>		
5	Polymerisation	74 °C	10 min

1 µg DNA (Plasmid oder PCR Produkt), 1 µL der entsprechenden Restriktionsenzyme (40 U ml<sup>-1</sup>) und 1.5 µL zehnfacher Puffer werden zusammengegeben und mit Wasser auf 15 µL aufgefüllt. Der Restriktionsverdau erfolgt 3 h bei 37 °C. Der Erfolg des enzymatischen Verdauens wird durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 5.5.7 Ligationsreaktion

Die mit Restriktionsenzymen verdauten Plasmide und PCR Fragmente werden durch T<sub>4</sub> DNA Ligase ligiert.

1 µL geschnittenes Plasmid und 3 µL geschnittenes PCR Produkt werden mit 1 µL T<sub>4</sub> DNA Ligase und 1 µL zehnfachem Reaktionspuffer gemischt. Es wird mit Wasser auf 10 µL aufgefüllt und das Gemisch wird 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Reaktion werden die ligierten Plasmide ohne weitere Aufreinigung in die Bakterien transformiert.

### 5.5.8 Transformation

Die aus dem Ligationsansatz vorliegenden Plasmide werden in kompetente *E. coli* DH5α oder BL21 transformiert. Die Transformation wird mit Hilfe eines Hitzeschocks durchgeführt. Die Aufnahme der fremden DNA durch Bakterien erfolgt bei 42 °C. Der Mechanismus ist bislang nicht bekannt. Diese Transformation wird auch bei Änderung des Bakterienstammes verwendet.

#### 5.5.8.1 Durchführung

Zuerst werden die kompetenten Bakterien (Kap. 5.2.2) auf Eis langsam aufgetaut. 1 µL Ligationsansatz und 200 µL der kompetenten Bakterien werden zusammen vermischt. Die Zellsuspension wird zuerst 5 min auf Eis und danach 45 s bei 42 °C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien 2 min auf Eis gekühlt, mit 250 µL SOC Medium versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. 50–100 µL der Bakterien werden auf Agar-Platten mit Ampicillin

(100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Ist die Transformation der Bakterien erfolgreich, werden einzelne Bakterienkolonien von den Agarplatten isoliert, weiter kultiviert und eine Identifizierung der aufgenommenen DNA durchgeführt.

### 5.5.9 Aufreinigung der Plasmide

Für die Isolierung der Plasmide aus *E. coli* Bakterien wird das *QIAprep Miniprep Kit* von Qiagen verwendet. Die Bakterien werden alkalisch lysiert und das Lysat wird neutralisiert. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgt auf einer Silikamembran in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen. Die Silikamembran wird mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und die DNA mit Wasser eluiert. Die Konzentration der aufgereinigten Plasmide wird spektrometrisch bestimmt. Die DNA wird bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert oder direkt verwendet.

### 5.5.10 Identifizierung der Plasmide

Um nachzuprüfen, ob die während der Transformation aufgenommenen Plasmide das entsprechende PCR Konstrukt enthalten, werden diese mit Restriktionsenzymen verdaut. Der Restriktionsverdau erfolgt wie in Kap. 5.5.6 beschrieben. Die Reaktionsprodukte werden mittels Agarosegelelektrophorese untersucht.

### 5.5.11 DNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Nukleinsäuren wird spektrophotometrisch mit Hilfe eines UV-Spektrometers bei 260 nm bestimmt. Einer Extinktion von 1 entsprechen 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  doppelsträngige DNA, 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  RNA und 33  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Oligonukleotid. Die Überlagerung der Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm und Proteinen bei 280 nm wird ebenfalls zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäure genutzt. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  einer sauberen Nukleinsäurepräparation soll zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

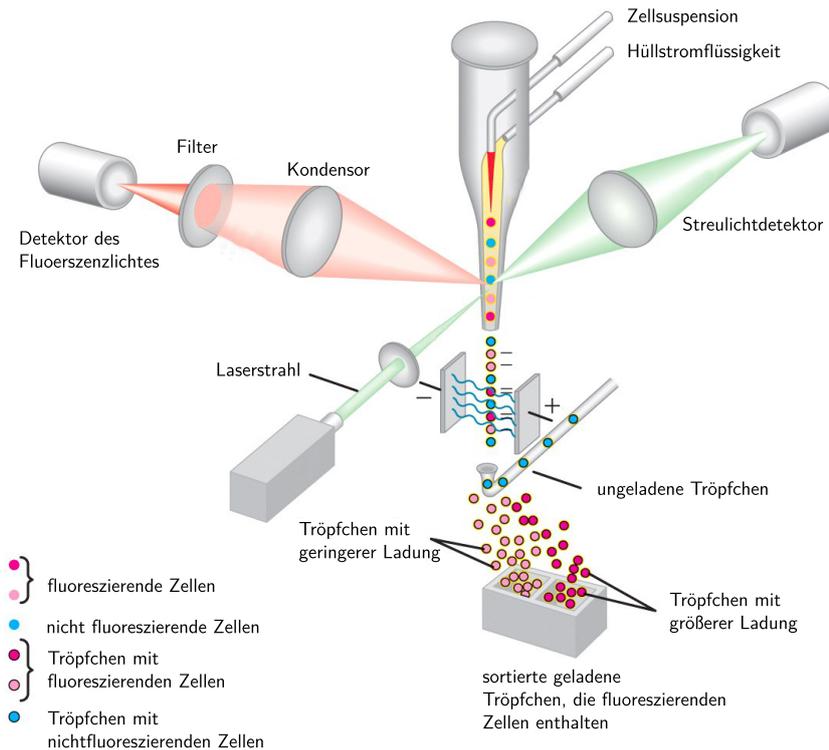
### 5.5.12 DNA Sequenzierung

Die hergestellten DNA Plasmide wurden von der Firma IIT Biotech GmbH sequenziert. Die bei der Sequenzierung verwendeten Primer sind im Kap. 4.7.2.1 dargestellt.

## 5.6 Durchflusscytometrie

Die Durchflusscytometrie (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorting*) stellt eine Methode der modernen Zellbiologie dar, mittels derer physikalische und molekulare Eigenschaften

lebender Zellen bestimmt werden können. Grundlage dieser Methode sind die Antigen-Antikörper-Reaktionen, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Methode erlaubt eine quantitative und statistische Behandlung der Zellen, wobei jeder einzelnen Zelle mehrere Parameter zugeordnet werden können. Die Methode ermöglicht ebenso die Sortierung der Zellen nach bestimmten Kriterien.



**Abbildung 5.4:** Schematischer Aufbau eines Durchfluscytometers. [202]

In den sechziger Jahren wurden von mehreren Gruppen unabhängig voneinander erste Prototypen von Durchfluscytometern entwickelt. In Abbildung 5.4 wird schematisch der Aufbau eines Durchfluscytometers dargestellt. Die Zellen in der Zellsuspension werden über ein Schlauchsystem geleitet. Am Ende des Schlauchsystems befindet sich ein Messkopf mit Öffnungen von  $50\ \mu\text{m}$  bis  $100\ \mu\text{m}$ . Die Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom vereinzelt, so dass nur eine einzelne Zelle die Öffnungen im Messkopf passieren kann. Während des Flusses der Zellen durch den Flusskanal wird auf die Zellen ein Laserstrahl fokussiert. Der Laserstrahl trifft auf die fließenden Zellen und bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau zuerst promoviert und fallen danach

wieder auf das Basisniveau unter Emission von Energie zurück. Die Fluoreszenz der angeregten Farbstoffmoleküle wird detektiert. Zusätzlich werden durch Lichtbeugung und -streuung des Laserlichtes Informationen über Zellgröße und Binnenstruktur der Zellen gewonnen. Die Zellen werden nach ihrem Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter* – FCS) und ihrem Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter* – SSC) in einem Punktwolkendiagramm dargestellt (*Dot-Plot*). Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe der Zelle und Seitwärtsstreulicht über die Granularität der Zelle. Eine gleichzeitige differentielle FACS Analyse mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, wenn Farbstoffe verwendet werden, die sich bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen jedoch über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische, Emissionsspektren verfügen.<sup>[173]</sup>

Die Durchflusscytometrie ermöglicht die Untersuchung der folgenden physikalischen Parameter der Zellen und biochemischen Erscheinungen:<sup>[173,203–205]</sup>

- Größe und Volumen der Zelle, Granularität des Cytoplasmas
- Expression und Quantifizierung von Oberflächenproteinen
- Rezeptorbindung
- Enzymkinetik
- Kinetik des Zellzyklus
- Membrantransport (intrazelluläre Aufnahme)
- Apoptose-Analyse
- Bestimmung von Subpopulationen der Zellen (Zelldifferenzierung).

Mittels Durchflusscytometrie ermittelte Werte stellen nur relativ gemessene Fluoreszenzen dar. Bei der Ermittlung dieser Werte müssen entsprechende Kontrollen untersucht werden, auf welche dann die endgültigen Ergebnisse bezogen werden. Als Negativkontrolle bei Expressionsexperimenten dienen die gemessenen Fluoreszenzen der Zellen, die nicht mit Antikörper markiert werden. Bei Bindungsexperimenten werden die Kontrollen mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt.

### 5.6.1 Nachweis einer stabilen Integrinexpression in CHO Zellen

Die mit Integrinen transformierten CHO Zellen und die als Referenzprobe dienenden Wildtyp-Zellen werden bis 70% Konfluenz bei 37°C kultiviert (Kap. 5.1.2.4). Am Tag des Experiments werden die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen und mit 1 mL 3.5 mM EDTA in

PBS vom Boden der Petrischalen gelöst. Danach werden die Zellen zweimal mit 9 mL PBS gewaschen und die Zelldichte wird auf  $0.5 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt. Die Zellen werden 5 min bei  $200 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, und 1 h mit 10 mL 2% BSA in PBS bei  $4^\circ\text{C}$  blockiert. Danach werden die Zellen wiederum zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit PBS resuspendiert, so dass die entsprechende Zelldichte erreicht wird. Anschließend werden die Zellen mit entsprechenden FITC-markierten Antikörpern (Tab. 5.8) 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Nachher werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und mittels eines Durchflusscytometers analysiert.

**Tabelle 5.8:** Markierung der Zellen mit Antikörpern für eine Expressionskontrolle der Integrine in CHO Zellen.

transfizierte CHO Zelllinien	Antikörper	Konzentration [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Verdünnung
Integrin $\alpha_2$	CD49b	100	1:75
Integrin $\alpha_3$	CD49c	100	1:75
Integrin $\alpha_4$	CD49d	1 000	1:75
Integrin $\alpha_6$	CD49f	1 000	1:10
Integrin $\alpha_L$	CD11a	1 000	1:10
Integrin $\beta_3$	CD17	1 000	1:50
Integrin $\beta_2$	CD18	1 000	1:10

### 5.6.2 Bindung des humanen ADAM8 Proteins an Integrine

In diesem Experiment wird die Bindung des humanen ADAM8 Proteins an durch CHO Zellen exprimierte Integrine untersucht. Der extrazelluläre Teil des humanen ADAM8 Proteins wurde rekombinant in einem Säugezellsystem in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Frey hergestellt. Das Protein wurde in HEK-EBNA 293 Zellen episomal exprimiert und mittels Polyhistidinsäule durch H. A. Al-Riyami chromatographisch aufgereinigt.

Die CHO-WT und die mit Integrienen transfizierten CHO Zellen werden wie in Kap. 5.6.1 von dem Boden der Petrischalen abgelöst und mit PBS gewaschen. Die Zellen werden zuerst mit 10 mL 2% BSA in PBS 1 h bei  $4^\circ\text{C}$  blockiert, dann 5 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert und mit eiskalter Puck's Salzlösung, welche 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  und 2 mM  $\text{Mn}^{2+}$  Kationen enthält, so resuspendiert, dass die Zelldichte auf  $0.5 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  eingestellt ist. Zu 300  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension werden jeweils 20  $\mu\text{g}$  humanes ADAM8 hinzugefügt und 1 h unter Schütteln bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach werden die Zellen zentrifugiert, zweimal mit eiskalter Puck's Salzlösung gewaschen und in 300  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Sie werden mit der empfohlenen Menge ADAM8 Antikörper 143338 ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) versetzt und 1 h unter Schütteln bei  $4^\circ\text{C}$

inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 300  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wird mit sekundärem Antikörper Cy3 (Ziege gegen Maus) in einer Verdünnung 1:100 versetzt und 1 h unter Schütteln im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS zweimal gewaschen und mittels eines Durchflusszytometers analysiert.

### 5.6.3 Inhibitionsexperimente mit zyklischen Peptiden

Die Inhibitionsexperimente werden analog den Bindungsexperimenten durchgeführt. Dabei wird ein zusätzlicher Schritt eingeführt, in welchem eine Inkubation mit Peptiden durchgeführt wird. Die Peptide werden den Zellen 1 h vor der Inkubation mit ADAM8 hinzugefügt, so dass die effektive Konzentration der Peptide 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  beträgt, und die Zellsuspension wird 1 h unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Danach wird den Zellen direkt ADAM8 (20  $\mu\text{g Protein}/300 \mu\text{L Zellsuspension}$ ) hinzugegeben und weiter, wie im Kap. 5.6.2 beschrieben, verfahren.

### 5.6.4 Durchführung der FACS Analyse und Auswertung der Ergebnisse

Die Messung wird bei konstanter Laserintensität durchgeführt. Am Anfang jeder Messung werden die entsprechenden Lichtstreuparameter eingestellt. Für die Messung der Proben mit dem FITC-markierten Antikörper wird ein Filter FL1 mit einem Messbereich von 515–545 nm eingestellt und für die Proben mit dem Cy3-markierten Antikörper wird ein Filter FL2 mit einem Messbereich von 564–606 nm eingestellt. Die FCS und SSC Parameter werden so eingestellt, dass sich die vitalen Zellen im oberen rechten Quadranten und die Zelltrümmer im unteren linken Quadranten eines *Dot-Plot* befinden. Jeder Punkt entspricht einer gemessenen Zelle oder einem gemessenen Ereignis. Das Vorwärtsstreulicht hängt vor allem von der Größe einer Zelle ab. Das heißt, kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes. Seitwärtsstreulicht hängt sehr stark von der Granularität der Zellen ab. Auf einem *Dot-Plot* werden Anhäufungen von Zellen erkannt, die ähnliche Streulichteigenschaften haben. So können verschiedene Populationen der Zellen morphologisch unterschieden werden. Nur vitale Zellen werden zur Analyse ausgewählt. In einem Punktwolkendiagramm wird eine relevante Region ausgewählt und für jede Probe werden 10 000 Ereignisse in dieser Region (*gate*) gezählt.

Die Herstellung der Histogramme ermöglicht einen direkten Vergleich der Fluoreszenzintensität der vermessenen Proben. In einem Histogramm wird die relative Fluoreszenzintensität der Probe (x-Achse) gegen die ausgewählten Ereignisse (y-Achse) dargestellt.

## 5.7 SPR

### 5.7.1 Experimente mit Membranextrakt aus WM115 Zellen

Die Wechselwirkung des humanen Vitronectins mit Integrinen wird in einem Experiment mit integrinhaltigem Membranextrakt aus WM115 Zellen untersucht. Das humane Vitronectin wird auf einem CM5 Chip mittels Aminokupplungschemie immobilisiert. Zuerst wird ein pH-*scouting* durchgeführt, um den optimalen Puffer für die Immobilisierung des Proteins auszuwählen.

#### 5.7.1.1 pH-*Scouting*

Das pH-*Scouting* erfolgt bei einer Flussgeschwindigkeit von  $5 \mu\text{L min}^{-1}$ . Als Laufpuffer wird in beiden Schritten HBS-N-Puffer verwendet. Das humane Vitronectin wird in einer Konzentration von jeweils  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  in unterschiedlichen Puffern über eine nichtaktivierte Chipoberfläche eines CM5 Chips jeweils 10 min injiziert. Die Affinität von Vitronectins zu der Chipoberfläche wurde in folgenden Puffern untersucht: 10 mM Acetat-Puffer (pH 4.5, 5.0, 5.5), 5 mM Maleat-Puffer (pH 5.0, 5.5) und 10 mM Phosphat-Puffer (pH 7.4).

#### 5.7.1.2 Immobilisierung des humanen Vitronectins

Zuerst wird die Dextranchipoberfläche mit einer Lösung bestehend aus EDC (0.4 M) und NHS (0.1 M) aktiviert. Zu diesem Zweck wird die EDC/NHS-Lösung bei einer Flussgeschwindigkeit von  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  in Referenz- und Messzelle 7 min injiziert. Für die Immobilisierung wird das Vitronectin mit Maleat-Puffer pH 5.0 verdünnt, so dass die Endkonzentration  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  beträgt. Die Proteinlösung wird mehrmals 12 min über die aktivierte Chipoberfläche der Messzelle injiziert. Danach erfolgt 7 min die Desaktivierung der reaktiven Chipoberflächen beider Flusszellen mit einer Ethanolaminlösung (1 M Ethanolamin und 1 M NaCl, pH 8.5).

#### 5.7.1.3 Bindungsstudien

Für Bindungsstudien wurden aus WM115 Zellen präparierte Membranextrakte nach einer modifizierten Methode von Belkin *et al.* verwendet.<sup>[188]</sup> Die Bindungsstudien werden im ME Puffer (Kap. 4.5.4) bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. ME Puffer dient als Lauf- und Bindungspuffer. Die bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrten Membranextrakte werden zuerst auf Eis aufgetaut. Danach werden sie mit dem ME Puffer verdünnt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Die verdünnten Membranextrakte werden 3 min über die

Chipoberfläche in beide Flusszellen injiziert. Die Chipoberfläche wird mit 2 zweiminütigen Pulsen Ethanolaminlösung (pH 8.5) und einem einminütigen Puls 5%  $\beta$ -OG-Lösung regeneriert.

#### 5.7.1.4 Inhibitionsexperiment mit zyklischen RGD-Peptiden

Das Inhibitionsexperiment mit zyklischen RGD-Peptiden wird bei gleicher Flussgeschwindigkeit und im gleichen Bindungspuffer wie die oben beschriebenen Bindungsstudien mit Membranextrakten durchgeführt. Der Membranextrakt wird in konstanter Konzentration ( $8.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mit Lösungen der unterschiedlichen Peptide versetzt und 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die effektive Konzentration der Peptide beträgt  $360 \mu\text{M}$ . Danach werden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und 3 min über die Chipoberfläche injiziert. Nach der Injektion wird die Chipoberfläche wie oben beschrieben regeneriert. Als Referenz wird Membranextrakt analysiert, der kein Peptid enthält.

#### 5.7.2 Experimente mit vitalen WM115 Zellen

In diesem Experiment wird die Wechselwirkung lebender Zellen mit immobilisiertem Vitronectin untersucht. Zuerst werden die WM115 Zellen aus Zellkultur gewonnen. Nach dem Ablösen von dem Boden einer Zellkulturflasche werden sie einmal mit HBSS gewaschen, dann mit Puck's Salzlösung, die zusätzlich 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM  $\text{MnCl}_2$  enthält, resuspendiert und auf Eis 20 min inkubiert. Die Zellen werden unter dem Mikroskop betrachtet und gezählt.

Nach der Inkubation auf Eis werden die Zellen mit Laufpuffer (HBS-N mit 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0.05%  $\beta$ -OG) resuspendiert und 3 min bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  über die Chipoberfläche injiziert. Alternativ zu dem HBS-N Puffer mit Kationen kann Puck's Salzlösung verwendet werden.

#### 5.7.3 Interaktion des bakteriellen CagL Proteins mit humanem Fibronectin

In diesem Experiment wird die Wechselwirkung des CagL Proteins sowie seiner Mutanten CagL-RAD und CagL-RGA mit Fibronectin untersucht.

##### 5.7.3.1 Immobilisierung des humanen Fibronectins auf dem CM5 Chip

Die Immobilisierung von Fibronectin auf einem CM5 Chip wird bei einer Flussgeschwindigkeit von  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Als Laufpuffer dient HBS-N. Die Oberfläche des Sensorschips (Referenz- und Messzelle) wird mit EDC/NHS-Lösung 7 min aktiviert. Für die

Immobilisierung wird Fibronectin mit Maleat-Puffer pH 5.0 so verdünnt, dass die Endkonzentration  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  beträgt. Die Fibronectinlösung wird 7 min über die Chipoberfläche in der Messzelle injiziert. Danach erfolgt eine 7 minütige Desaktivierung der Chipoberfläche in beiden Flusszellen mit 1 M Ethanolaminlösung, pH 8.5. Es wird ein Immobilisierungsniveau von 1 180 RU erreicht.

### 5.7.3.2 Bindungsstudien mit CagL Proteinen

Zuerst wird das Messsystem mit CagL Puffer (Kap. 4.5.4) gewaschen und äquilibriert. Die Bindung der CagL Proteine an immobilisiertes Fibronectin findet bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  statt. Unterschiedliche Konzentrationen der CagL Proteine werden im CagL Puffer über die Chipoberfläche von Referenz- und Messzelle 3 min injiziert. Nach der Injektion wird die Chipoberfläche zweimal mit 10 mM Glycin pH 1.5 regeneriert. Die Injektion der Glycinlösung dauert jeweils 1 min. Danach wird die Chipoberfläche zusätzlich mit Laufpuffer 3 min gespült.

### 5.7.4 Interaktion des bakteriellen CagL Proteins mit immobilisiertem Integrin $\alpha_5\beta_1$

In diesem Experiment wird die Wechselwirkung des CagL Proteins und der Mutanten CagL-RAD und CagL-RGA an Integrin  $\alpha_5\beta_1$  untersucht.

#### 5.7.4.1 Immobilisierung des humanen Integrins $\alpha_5\beta_1$ an dem CM5 Chip

Die Immobilisierungsbedingungen entsprechen denen einer Fibronectinimmobilisierung. Die CM5 Chipoberfläche wird zuerst mit EDC/NHS-Lösung 7 min aktiviert. Das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  wird in einer Konzentration von  $18 \mu\text{g mL}^{-1}$  in Maleat-Puffer (pH 5.0) 7 min in die Messzelle injiziert. Danach werden beide Flusszellen wie oben beschrieben mit Ethanolaminlösung desaktiviert. Es wird ein Immobilisierungsniveau von 4 200 RU erreicht.

#### 5.7.4.2 Bindung der CagL Proteine an Integrin $\alpha_5\beta_1$

Die Bindungsstudien werden in ME Laufpuffer (Kap. 4.5.4) bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Das CagL Protein wird mit Laufpuffer verdünnt und in unterschiedlichen Konzentrationen über die Chipoberfläche in Referenz- und Messzelle injiziert. Die Proteinlösung wird mit einem *kInject* Modus injiziert. Die Assoziationsphase dauert jeweils 3 min und die Dissoziationsphase 5 min. Nach der Injektion und dem Ablauf der Dissoziationsphase wird die Chipoberfläche mit einer zweimaligen Injektion von 10 mM

Glycin pH 1.5 und einer einmaligen Injektion von 1%  $\beta$ -OG-Lösung regeneriert, wobei die Regenerierungsschritte jeweils 1 min dauern. Danach wird die Chipoberfläche mit Laufpuffer 5 min gespült. Analoge Messungen werden mit dem CagL-RAD und dem CagL-RGA Protein durchgeführt.

### 5.7.5 Interaktion des Integrins $\alpha_v\beta_5$ mit immobilisiertem CagL Protein

Eine Alternative für die Immobilisierung des CagL Proteins stellt die *capture method* dar. Rekombinant hergestelltes CagL Protein ist mit einem Polyhistidinepitop markiert und wird in diesem Experiment über einen His<sub>6</sub>-Tag Antikörper am CM<sub>5</sub> Chip immobilisiert.

#### 5.7.5.1 Immobilisierung des CagL Proteins über Antikörper

Im ersten Schritt wird der His<sub>6</sub>-Tag Antikörper (Maus anti C-Terminal His-Epitope) auf der Oberfläche des CM<sub>5</sub> Chips immobilisiert. Als Laufpuffer bei der Immobilisierung des Antikörpers wird HBS-N Puffer verwendet. Die Immobilisierung wird bei einer Flussgeschwindigkeit von  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Zuerst wird die Chipoberfläche in Referenz- und Messzelle mit EDC/NHS-Lösung aktiviert. Der His<sub>6</sub>-Tag Antikörper wird mit 10 mM Acetat-Puffer pH 4.5 verdünnt, so dass die Endkonzentration  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  beträgt und in die beiden Flusszellen 7 min injiziert. Danach erfolgt 7 min Deaktivierung mit Ethanolaminlösung. Anschließend wird das CagL Protein in CagL-Puffer ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) einmal 7 min und zweimal 1 min nur in die Messzelle injiziert. In diesem Schritt erfolgt die Bindung des Proteins an den Antikörper. Es wird mit Laufpuffer so lange gespült, bis sich die Basislinie stabilisiert und mit einem dreimaligen Puls von 10 mM Glycin pH 1.5 für jeweils 1 min gewaschen. Danach wird wiederum mit Laufpuffer äquilibriert.

#### 5.7.5.2 Bindung des Integrins $\alpha_v\beta_5$ an dem CagL Protein

Die Bindungsstudien werden in ME Puffer bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Das humane Integrin  $\alpha_v\beta_5$  wird mit ME Puffer verdünnt und in unterschiedlichen Konzentrationen in beide Messzellen in einem *kInject* Modus injiziert. Die Assoziations- und Dissoziationsphase dauern jeweils 3 min. Danach wird zweimal mit einem 1 min Puls von 10 mM Glycin (pH 1.5) regeneriert und mit Laufpuffer 4 min gewaschen.

### **5.7.6 Interaktion des CagL Proteins mit immobilisiertem Integrin $\alpha_v\beta_5$**

Die Immobilisierung des Integrins  $\alpha_v\beta_5$  und die Bindungsstudien mit den CagL Proteinen an dem Integrin verlaufen analog zu den in Kap. 5.7.4 beschriebenen Bindungsstudien mit dem Integrin  $\alpha_5\beta_1$ . Der einzige Unterschied besteht darin, dass während der Immobilisierung eine Integrinlösung mit Konzentration von  $22 \mu\text{g mL}^{-1}$  verwendet wird.

## 6 Ergebnisse und Diskussion

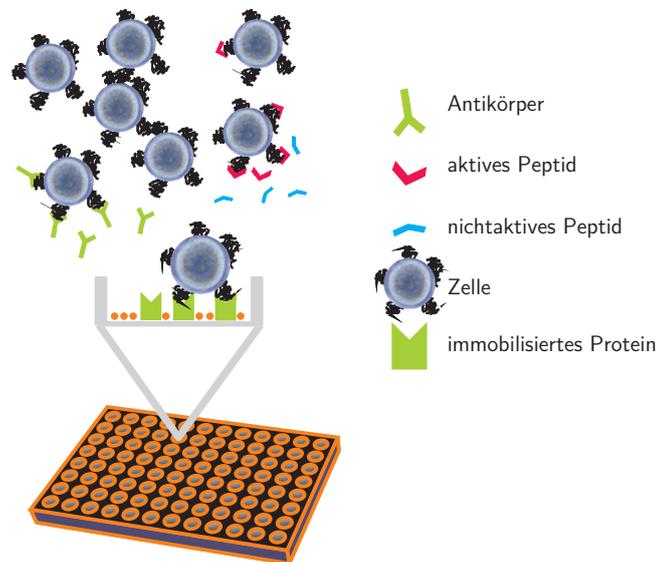
In dieser Arbeit wurden mehrere Forschungsprojekte bearbeitet. In Kapitel 6.1 werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wechselwirkung des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  mit VCAM-1 dargestellt. Diese umfassen die Charakterisierung der Ramos-Zellen, die als Modellzelllinie zur Untersuchung des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  ausgewählt wurde sowie Aufbau und die Ergebnisse der Zelladhäsionstests, in welchen die inhibitorischen Eigenschaften zyklischer Peptide untersucht wurden.

Kapitel 6.2 faßt die Resultate der Untersuchungen zu ADAM8 Protein als Integrinligand. Der erster Teil dieses Kapitel beschreibt die Expression sowie die Experimente zur Etablierung eines Bindungstests, in welchem eine homophile Interaktion des murinen ADAM8 Proteins analysiert werden sollte. Im zweiten Teil dieses Kapitels werden die Bindungsstudien des humanen ADAM8 an Integrine und Kompetitionsstudien mit zyklischen Peptiden dargestellt.

Die Kapitel 6.3 und 6.4 stellen die Ergebnisse der Studien zu RGD-abhängiger Bindung verschiedener Liganden an Integrine dar. Das Arg-Gly-Asp Tripeptidmotiv (RGD) gehört zu den wichtigsten Erkennungssequenzen der Integrine und kommt sowohl in Matrix- und Zelloberflächenproteinen des selben Organismus als auch in Proteinen anderer Organismen wie z. B. Bakterien vor. In Kapitel 6.3 wird der Einfluss neuer zyklischer RGD-Peptide auf die Wechselwirkung zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix diskutiert. Ein Hauptziel dieses Teilprojektes ist die Untersuchung des Einflusses eines neuen Peptidbausteins ( $\beta$ Acc) auf die inhibitorischen Eigenschaften und somit die biologische Aktivität und Selektivität zyklischer RGD-Peptide.

In Kapitel 6.4 wird die RGD-abhängige Bindung des bakteriellen Proteins CagL aus *Helicobacter pylori* an Integrine beschrieben. In diesem Fall wurde der Einfluss zyklischer RGD-Peptide und Punktmutationen des RGD-Motivs im CagL Protein auf diese Interaktionen untersucht. Zusätzlich wird die Interaktion zwischen dem CagL Protein und dem Matrixprotein Fibronectin diskutiert, die die multifunktionelle Rolle des bakteriellen CagL Proteins unterstreicht.

Die Realisierung der oben genannten Projekte erforderte die Entwicklung und Etablierung der entsprechenden Assaysysteme. Eine der verwendeten Methode zur Untersuchung



**Abbildung 6.1:** Schematische Darstellung eines Zelladhäsionstests.

der Protein-Protein und Protein-Peptid Wechselwirkungen ist der Zelladhäsionstest. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Verwendung von vitalen Zellen, welche einen der Bindungspartner (Protein) auf der Zelloberfläche präsentieren. Der zweite Bindungspartner (Ligand) wird auf Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Mit Hilfe der chemisch modifizierten Oberflächen der Mikrotiterplatten können Proteine und andere Makromoleküle immobilisiert werden. Die Immobilisierung von Proteinen, Glycoproteinen oder Glycolipiden involviert einen gemischten Bindungsmechanismus mit hydrophilen und hydrophoben Interaktionen. Lipoproteine und Lipide werden über hydrophobe Interaktionen, Polysaccharide demgegenüber durch hydrophile Interaktionen immobilisiert.

In dieser Arbeit wurden Protein-Protein und Protein-Peptid Wechselwirkungen untersucht. Das Prinzip eines Zelladhäsionstest ist in Abbildung 6.1 schematisch dargestellt. Zuerst wird ein Proteinpartner auf einer Immunoplatte immobilisiert. Die Zellen werden direkt aus der Zellkultur gewonnen und mit den zu analysierenden Substanzen inkubiert. In einem Zelladhäsionstest kann auch der Einfluss von fremden Substanzen wie Peptiden, anderen Proteinen bzw. Antikörpern auf die untersuchte Protein-Protein Interaktion bestimmt werden. Nach Inkubation mit den zu analysierenden Substanzen werden die Zellen mit dem immobilisierten Proteinliganden inkubiert. Anschließend werden die gebundenen Zellen mit Puffer gewaschen, gefärbt und spektrometrisch quantifiziert.

Der Zelladhäsionstest zeichnet sich durch breite Anwendungsmöglichkeiten und sehr

**Tabelle 6.1:** Zusammenstellung der mit Hilfe eines Zelladhäsionstests untersuchten Messsysteme. Die getesteten Peptide wurden im Rahmen der Dissertationen von Malešević, Strijowski und Yang synthetisiert. [139,140]

Zelllinie und Rezeptor	Proteinligand	Peptidligand
Ramos $\alpha_4\beta_1$	VCAM-1 (Kap. 6.1)	cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-Asp-) <b>1</b> cyclo(-Ser-Pro-Gln-Ile-Asp-) <b>3</b> cyclo(-Ser-(1S,2S)-Ache-Leu-Asn-Asp-) <b>5</b> cyclo(-Ser-(1R,2S)-Acpc-Gln-Ile-Asp-) <b>7</b> cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-) <b>9</b> cyclo(-Ser- $\beta^h$ Pro-Leu-Asn-Val-Asp-) <b>11</b> cyclo(-Ser-(1R,2S)-Ache-Leu-Asn-Ile-Asp-) <b>13</b> cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-(R)-Ambs-Asp-) <b>15</b> cyclo(-Ser-Pro-Thr-Gln-Ile-Asp-) <b>17</b> cyclo(-Ser- $\beta$ Pro-Thr-Gln-Ile-Asp-) <b>19</b> cyclo(- $\beta^h$ Ser-Pro-Asp- $\beta^h$ Gln-Ile-Asp-) <b>21</b> cyclo(-Ser-Pro-Leu- $\beta^h$ Asn-Asp-) <b>2</b> cyclo(-Ser-(1R,2S)-Ache-Leu-Asn-Asp-) <b>4</b> cyclo(-Ser-(1R,2S)-Acpc-Leu-Asn-Asp-) <b>6</b> cyclo(-Ser-(1R,2S)-Ache-Gln-Ile-Asp-) <b>8</b> cyclo(-Ser- $\beta^h$ Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-) <b>10</b> cyclo(- $\beta^h$ Ser-Pro-Leu- $\beta^h$ Asn-Ile-Asp-) <b>12</b> cyclo(-Ser-(1S,2S)-Ache-Leu-Asn-Ile-Asp-) <b>14</b> cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-(S)-Ambs-Asp-) <b>16</b> cyclo(-Ser-(1R,2S)-Ache-Thr-Gln-Ile-Asp-) <b>18</b> cyclo(-Ser-Pro-Thr-Gln-Val-Asp-) <b>20</b> cyclo(-Thr-Ala-Ile-Asp-Ala-Pro-Asn-Ala-) <b>22</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) <b>32</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $\beta$ Acc-Val-) <b>34</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) <b>32</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $\beta$ Acc-Val-) <b>34</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) <b>31</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) <b>37</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Leu-) <b>39</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) <b>31</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) <b>37</b> cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-Ser-) <b>23</b> cyclo(-Lys-Asp-Lys-D-Arg-Leu-Ser-) <b>25</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-Leu-) <b>38</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala-D-Leu-) <b>40</b> cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-D-Leu-Ser-) <b>24</b> cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-D-Ser-) <b>26</b>
WM115 $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$ , $\alpha_v\beta_1$ , $\alpha_3\beta_1$	Vitronectin (Kap. 6.3.2)	cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) <b>31</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp(+) $\beta$ Acc-Val-) <b>33</b> cyclo(-Arg-Gly- $\beta$ Glu-D-Phe-Val-) <b>35</b>
K562 $\alpha_5\beta_1$	Fibronectin (Kap. 6.3.3)	cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) <b>31</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp(+) $\beta$ Acc-Val-) <b>33</b> cyclo(-Arg-Gly- $\beta$ Glu-D-Phe-Val-) <b>35</b>
WM115 $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$ $\alpha_v\beta_1$ , $\alpha_3\beta_1$	Vitronectin Fibronectin CagL (Kap. 6.4)	cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) <b>31</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) <b>37</b> cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Leu-) <b>39</b>
N1321N1 mADAM8	mADAM8-Fr (Kap. 6.2.4)	cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-Ser-) <b>23</b> cyclo(-Lys-Asp-Lys-D-Arg-Leu-Ser-) <b>25</b>

hohe Reproduzierbarkeit aus. Die Auswahl der getesteten Zelllinie erfolgt aufgrund des Proteinexpressionsmusters der Oberflächenrezeptoren. Sowohl Zellsuspensionskulturen als auch Monolayer-Kulturen können verwendet werden.

Die Arbeit mit diesem semi-*in vivo* System ermöglicht die Forschung an Membranrezeptoren im nativen Zustand. Die Spezifität der Wechselwirkung der Zellen mit dem immobilisierten Protein wird mittels monoklonaler Antikörper bestimmt. Die Zellen werden mit entsprechenden Antikörpern inkubiert und anschließend wird ihre Adhäsion an die Proteinliganden bestimmt.

Der Zelladhäsionstest fungiert als Standardmethode in der Suche nach neuen biologisch aktiven Rezeptorliganden, die als effektive Inhibitoren der Protein-Protein Wechselwirkung eingesetzt werden können. Da die Protein-Protein Wechselwirkungen essentiell für die Zell-Extrazelluläre Matrix (ECM) bzw. Zell-Zell Wechselwirkung sind, können neue Rezeptorliganden zur Steuerung und Kontrolle wichtiger physiologischer bzw. pathologischer Prozesse eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Testsysteme zur Durchführung eines Zelladhäsionstests entwickelt. Die verwendeten Zelllinien mit Oberflächenrezeptoren und die Proteinbindungspartner bzw. Peptidliganden sind in der Tabelle 6.1 zusammengefasst. Die Ergebnisse der jeweiligen Tests werden in den entsprechenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

Neben dem Zelladhäsionstest wurden andere Methoden, wie Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*) und Durchflusszytometrie zur Untersuchung der Protein-Protein und Protein-Peptid Wechselwirkungen eingesetzt. Mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz wurden Protein-Ligand Wechselwirkungen auf molekularer Ebene untersucht. Es wurden die Interaktionen isolierter Proteine als auch Proteine in Proteingemischen analysiert. Durchflusszytometrie wurde in den Untersuchungen der hADAM8-Integrin Wechselwirkungen verwendet.

## 6.1 Wechselwirkung des Integrins $\alpha_4\beta_1$ mit VCAM-1

*Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) ist ein natürlicher Ligand des Integrins  $\alpha_4\beta_1$ . Diese Interaktion ist bei der Rekrutierung der Leukozyten in Infektions- oder Entzündungsstellen beteiligt.<sup>[72]</sup> Das vorgeschlagene Bindungsepitop des VCAM-1 TQIDSPLN 37-44 stellt eine Schleife (CD-*loop*) auf der Oberfläche des VCAM-1 dar und verbindet zwei  $\beta$ -Faltblätter in diesem Protein (Abb. 2.8, Seite 16).<sup>[206]</sup> Die Aminosäuren TQID befinden sich in einem  $\beta$ I-*turn*, während die Sequenz SPLN eine S-förmige Konformation einnimmt.<sup>[207]</sup> Quan *et al.* zeigten, dass zyklische Oktapeptide cyclo(-Thr-Ala-Ile-Asp-Ala-Pro-Asn-Ala-) und cyclo-

(-Val-Gln-Ile-Asp-Ala-Pro-Asn-Ala-), deren Aminosäuresequenzen von dem TQIDSPLN Motiv abgeleitet wurden, einen inhibitorischen Effekt auf die Interaktion des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  mit VCAM-1 ausüben. Für die aktivsten Inhibitoren dieser Wechselwirkung wurden  $IC_{50}$ -Werte im mikromolaren Bereich bestimmt. Allerdings konnte die Konformation dieser Peptide aufgrund großer Beweglichkeit des Peptidrückgrats nicht bestimmt werden.<sup>[66]</sup>

In Rahmen dieser Arbeit wurden zyklische Penta- und Hexapeptide untersucht, die als Mimetika des vermuteten Bindungseptops von VCAM-1 die Interaktion von Integrin  $\alpha_4\beta_1$  mit VCAM-1 beeinflussen sollten (Tab. 6.1). Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Integrin  $\alpha_4\beta_1$  mit VCAM-1 wurde ein Zelladhäsionstest etabliert (Kap. 6.1.2). Als Modellzelllinie wurden Ramos-Zellen verwendet, die Integrin  $\alpha_4\beta_1$  auf ihrer Oberfläche präsentieren. Vor der Durchführung der Konkurrenzexperimente mit zyklischen Peptiden wurde die Expression der Integrine durch diese Zellen geprüft (Kap. 6.1.1).

### 6.1.1 Analyse der Integrinexpression von Ramos-Zellen

Die Expression der Integrine durch die verwendeten Ramos-Zellen wurde sowohl auf mRNA-Niveau als auch auf Protein-Niveau analysiert.

#### 6.1.1.1 Untersuchung der mRNA Transkription in Ramos-Zellen

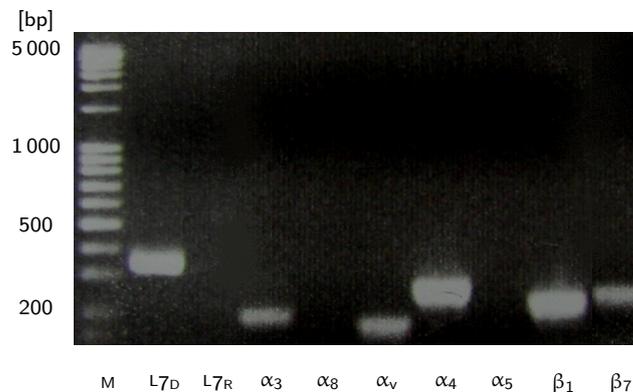
Die Gesamt-RNA wurde isoliert und spektrophotometrisch quantifiziert. Die Ausbeute der RNA Isolierung lag bei  $2.8 \mu\text{g}$  pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde in einer RT-PCR eingesetzt, um die mRNA Fragmente der Integrinuntereinheiten zu identifizieren.

Zunächst wurde mRNA mit Hilfe einer *reversen* Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann mit Hilfe von spezifischen Primern für bestimmte Integrinuntereinheiten in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Die Primer für die PCR wurden anhand der Nukleotidsequenzen der humanen Integrine mit dem Programm Primer3 ermittelt. Die Größe der zu synthetisierenden cDNA-Fragmente ist in Tabelle 6.2 aufgelistet. Die Ramos-Zellen präsentieren der Literatur zu Folge auf der Zelloberfläche endogen Integrin  $\alpha_4\beta_1$ .<sup>[208,209]</sup> Da Integrin  $\alpha_4\beta_1$  nicht die einzige Kombination der  $\alpha_4$  Integrinuntereinheit repräsentiert, wurde ebenfalls überprüft, ob

**Tabelle 6.2:** Größe der cDNA Fragmente der Integrinuntereinheiten.

	$\alpha_3$	$\alpha_4$	$\alpha_5$	$\alpha_8$	$\alpha_{IIb}$	$\alpha_v$	$\beta_1$	$\beta_3$	$\beta_5$	$\beta_6$	$\beta_7$	$\beta_8$
Größe [bp]	192	244	236	218	219	163	208	164	171	217	239	201



**Abbildung 6.2:** Analyse der mRNA in Ramos-Zellen. Die synthetisierten cDNA Fragmente nach einer RT-PCR wurden in einem 2% Agarosegel untersucht.  $L7_D$  und  $L7_R$  steht für die DNA und RNA Proben, die mit den Primer für das L7 Protein amplifiziert wurden.

diese Zellen eventuell auch die zweite mögliche Integrin-Heterodimereinheit  $\beta_7$ , exprimieren. Parallel wurde auch die Transkription zu mRNA der anderen Integrinuntereinheiten wie  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_8$  und  $\alpha_v$  getestet.

Die aus Ramos-Zellen isolierte RNA wurde in einer *two-step* RT-PCR analysiert (Kap. 5.5.3.1). In dieser Variante der RT-PCR verlaufen die *reverse* Transkription und PCR separat. Die *reverse* Transkription benötigt den Einsatz eines Oligo(dT)-Primers, der an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Terminus der eukaryontischen mRNA hybridisiert. Der in der *reversen* Transkription gewonnene cDNA-Erststrang wurde als Templat für die PCR eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden Primer für das L7 Protein verwendet, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt. Die Primer binden an die kodierende DNA Sequenz des L7 Proteins. Die in der PCR amplifizierten cDNA Fragmente wurden in einem Agarosegel untersucht (Abb. 6.2).

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ramos-Zellen auf mRNA-Niveau stark die Integrine  $\alpha_4$ ,  $\beta_1$  wie auch  $\beta_7$  exprimieren. Die Expression anderer Integrinuntereinheiten, wie  $\alpha_3$  und  $\alpha_v$ , durch diese Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen. Die Intensität dieser Banden ist jedoch schwächer im Vergleich zu den entsprechenden Banden der  $\alpha_4$  und  $\beta_1$  Untereinheiten. Die Größen der synthetisierten cDNA-Fragmente stimmen mit den erwarteten Werten überein (Tab. 6.2). Die Zellen exprimieren keine Integrine  $\alpha_5$  und  $\alpha_8$ . Die durchgeführten Kontrollen mit DNA und RNA für das L7 Protein bestätigen die erfolgreiche Aufreinigung der Gesamt-RNA (Bande  $L7_D$ ) und die vollständige Entfernung der DNA-Spuren aus isolierter RNA (keine Bande in  $L7_R$ ).

### 6.1.1.2 Gewinnung von Membranrezeptoren aus humanen Zellen

Eine Analyse der Expression der Integrine in Ramos-Zellen auf Proteinniveau wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_7$  Integrinuntereinheiten mit Membranextrakten aus diesen Zellen durchgeführt.

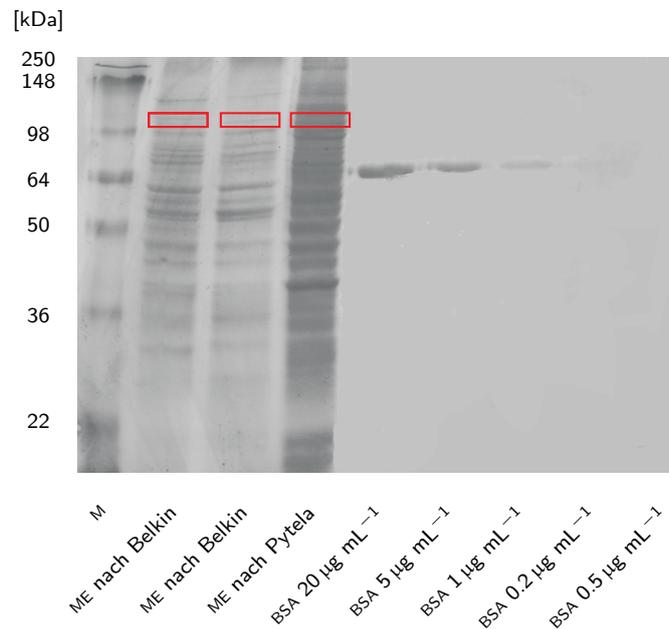
Zur Gewinnung der integrinhaltigen Membranextrakte (ME) aus humanen Zellen wurden in dieser Arbeit die Methoden von Belkin *et al.*<sup>[188]</sup> und Pytela *et al.*<sup>[189]</sup> verwendet. Die beiden Methoden beruhen auf einer Solubilisierung der Zellmembran mit einem Detergens. Die Methode von Belkin *et al.* benötigt den Einsatz von Triton X-100 zur Solubilisierung der Membranproteine. Im ersten Extraktionsschritt mit Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraethansäure (EGTA) werden zuerst periphere Proteine entfernt. Danach erfolgt die Solubilisierung mit Triton X-100. In der Methode von Pytela *et al.* wird Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid ( $\beta$ -OG) als Detergens verwendet. In beiden Methoden liegt die Konzentration des Detergens höher als die kritische Mizellenkonzentration (CMC), so dass die Bildung der Detergensemizellen und Solubilisierung der Zellmembran gewährleistet wird.

Beide Methoden eignen sich zur Herstellung der Membranextrakte. Die Methode von Belkin *et al.* enthält zwei Extraktionsschritte und liefert dadurch Membranextrakte, welche weniger Fremdproteine enthalten als Membranextrakte, die nach der Methode von Pytela *et al.* hergestellt wurden.

Die hergestellten Membranextrakte wurden mittels SDS-PAGE und Western Blotting untersucht, um die enthaltenen Integrine zu identifizieren. Die Aktivität der gewonnenen Integrine wurde in Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten (SPR) untersucht.

### 6.1.1.3 Bestimmung der Integrinkonzentration in Membranextrakten

Zur Bestimmung der Integrinkonzentration in den hergestellten Membranextrakten wurden diese in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Auf dem selben SDS-Polyacrylamidgel wurde BSA in bekannten Konzentrationen analysiert. Die Bestimmung der Integrinkonzentration erfolgte durch Vergleich der Bandenintensität der Integrine mit der Intensität der BSA Proben. Abbildung 6.3 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE für die Membranextrakte aus Ramos-Zellen. Ein Vergleich der Intensität der BSA Banden mit den Banden der Integrinuntereinheit  $\beta_1$  deutet darauf hin, dass die Integrinkonzentration in den Membranextrakten hergestellt nach der Methode von Belkin *et al.* zwischen  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  liegt. Die Membranextrakte, die nach der Methode von Pytela *et al.* hergestellt wurden, enthalten zwischen  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  Integrin.<sup>[188,189]</sup> Ein Versuch der Bestimmung der Integrinkonzentration in einem BCA-Test nach einer Elution aus dem Po-



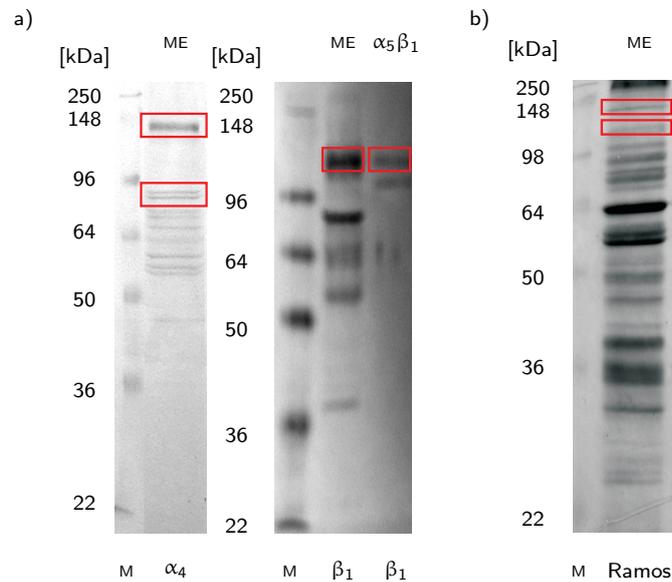
**Abbildung 6.3:** Die Bestimmung der Integrinkonzentration in Membranextrakten aus Ramos-Zellen (10% SDS-Polyacrylamidgel). Die Integrinuntereinheit  $\beta_1$  wurde durch Umrahmen markiert; M steht für Protein-Marker.

lyacrylamidgel war nicht erfolgreich. Die eluierte Menge des Proteins lag vermutlich unter der Detektionsgrenze. Die Nachweisgrenze liegt für BCA-Test bei  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 6.1.1.4 Untersuchung der Integrine auf der Oberfläche von Ramos-Zellen

Das Proteinexpressionsniveau entspricht nicht immer dem mRNA-Expressionsniveau. Die zahlreichen Studien in diesem Gebiet zeigen keine definierte Korrelation zwischen Protein- und mRNA Expression. Komplizierte und vielfältige post-transkriptionelle Mechanismen, die in die Proteintranslation involviert sind, sind bislang noch nicht ausreichend verstanden, um die Proteinkonzentration aufgrund der mRNA Expression zu berechnen. Die undefinierte Korrelation zwischen Protein-Abundanz und mRNA Expression kann auch durch unterschiedliche Halbwertszeiten (*half-live*) der mRNA und Proteine *in vivo* bedingt sein.<sup>[210]</sup>

Die Expression der in der mRNA Analyse nachgewiesenen Membranproteine wurde mit spezifischen polyklonalen Antikörpern verifiziert. In einem SDS-Polyacrylamidgel wurden zuerst Membranextrakte aufgetrennt und durch Western Blotting untersucht. Für diese Analyse wurden die Membranextrakte aus Zellen verwendet, die nach der Methode von Belkin *et al.* präpariert wurden.<sup>[188]</sup> Die Membranextrakte aus Ramos-Zellen wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse der durch RT-PCR nachgewiesenen Integrinuntereinheiten

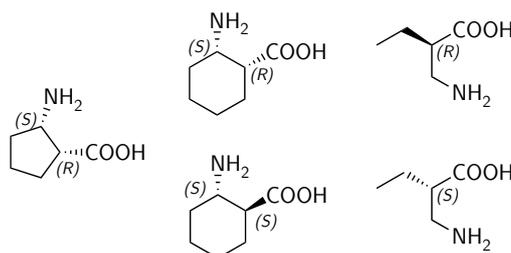


**Abbildung 6.4:** a) Immunchemische Analyse der Integrinexpression durch Ramos-Zellen. Isoliertes Integrin  $\alpha_5\beta_1$  wurde als Kontrolle für  $\beta_1$ -Untereinheit verwendet. b) SDS-PAGE der Membranextrakte aus Ramos-Zellen hergestellt nach der Methode von Belkin *et al.*. Die Integrinuntereinheiten sind durch Rahmen markiert.

analysiert. In diesem Fall wurden spezifische Antikörper gegen  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_7$  eingesetzt. Als Referenzen wurden Membranextrakte aus  $\kappa 562$  Zellen verwendet. Diese Zellen präsentieren endogen auf der Oberfläche das Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .<sup>[52]</sup> Die Abbildung 6.4 zeigt die Ergebnisse der Western Blotting Analyse. Die Ramos-Zellen exprimieren lediglich die Integrinuntereinheiten  $\alpha_4$  und  $\beta_1$ . Die entsprechenden Proteinbanden liegen bei 150 kDa für die  $\alpha_4$  und 130 kDa für die  $\beta_1$  Integrinuntereinheiten. Auch die Banden bei 70 kDa und 80 kDa, die auf die Spaltung der Disulfidbrücke in  $\alpha_4$  Kette zurückzuführen sind, sind zu erkennen. Die Größe der detektierten Proteinbanden stimmt mit Literaturdaten überein.<sup>[211]</sup> Die Expression der anderen Integrinuntereinheiten konnte nicht nachgewiesen werden, was ebenfalls in Übereinstimmung mit Literaturdaten bleibt.<sup>[208,209]</sup> Die Abbildung 6.4 zeigt die Resultate der untersuchten Membranextrakte von Ramos-Zellen. Die vorher durch Western Blotting analysierten Integrinuntereinheiten sind durch Rahmen markiert. Im Membranextrakt aus Ramos Zellen wurden die Banden der Integrinuntereinheiten  $\alpha_4$  und  $\beta_1$  identifiziert.

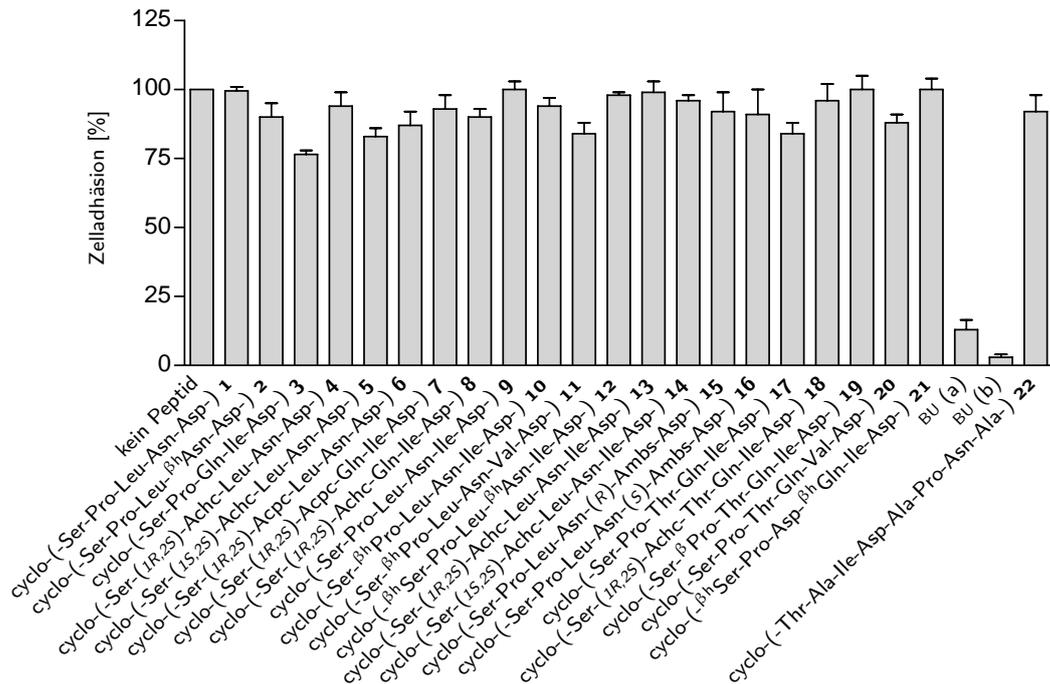
### 6.1.2 Einfluss zyklischer Peptide auf die Adhäsion von Ramos-Zellen an VCAM-1

In dieser Arbeit wurden die zyklischen Penta- und Hexapeptide **1** – **21**, die ein Fragment des vorgeschlagenen Erkennungsmotivs des VCAM-1 enthalten, in einem Zelladhäsionstest mit Ramos-Zellen untersucht (Tab. 6.1). Die Peptide wurden von Malešević bzw. Strijowski synthetisiert und zur Verfügung gestellt.<sup>[139;140]</sup> Um die Konformationen der Peptide zu variieren, wurden entsprechende  $\beta$ -Aminosäuren wie Achc (2-Aminocyclohexancarbonsäure), Acpc (2-Aminocyclopentancarbonsäure) oder Ambs (2-Aminomethylbutansäure) als neue Strukturelemente eingeführt (Abb. 6.5).<sup>[140]</sup> Die biologische Aktivität der Peptide **1** – **21** wurde bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Konzentrationsbereich von  $149 \mu\text{M}$  für cyclo(-Ser-(1*R*,2*S*)-Achc-Thr-Gln-Ile-Asp-) **18** bis  $190 \mu\text{M}$  für cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-Asp-) **1**) getestet. Als Positiv-Kontrolle wurde ein inhibierender Antikörper gegen humanes Integrin  $\alpha_4\beta_1$  (BU49) in einer Konzentration von  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $33.0 \text{ nM}$ ) bzw.  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $16.5 \text{ nM}$ ) verwendet. Die Resultate der Zelladhäsionstests sind in Abbildung 6.6 dargestellt.



**Abbildung 6.5:** Schematische Darstellung der Struktur der in die zyklischen Peptide eingeführten  $\beta$ -Aminosäuren: 2-Aminocyclopentancarbonsäure, 2-Aminocyclohexancarbonsäure, 2-Aminomethylbutansäure.

Keines der Peptide zeigte eine signifikante Inhibition der untersuchten Wechselwirkung. Im Fall der Peptide cyclo(-Ser-Pro-Gln-Ile-Asp-) **3**, cyclo(-Ser- $\beta^h$ Pro-Leu-Asn-Val-Asp-) **11** und cyclo(-Ser-Pro-Thr-Gln-Ile-Asp-) **17** wurde eine schwache Inhibition der Adhäsion der Ramos-Zellen an VCAM-1 detektiert, die für das Peptid cyclo(-Ser-Pro-Gln-Ile-Asp-) **3** bei der Konzentration von  $185 \mu\text{M}$  am stärksten war und 22% betrug. Neben den neu synthetisierten Peptiden **1** – **21** wurde ebenfalls ein Literaturpeptid cyclo(-Thr-Ala-Ile-Asp-Ala-Pro-Asn-Ala-) **22** getestet, das als ein aktiver Ligand von Integrin  $\alpha_4\beta_1$  mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $4.9 \mu\text{M}$  durch Quan *et al.* charakterisiert wurde.<sup>[66]</sup> Erstaunlicherweise konnte die inhibitorische Aktivität dieses Peptides nicht bestätigt werden. Das Peptid zeigte bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $132 \mu\text{M}$ ) nahezu keinen Einfluss auf die Bindung des Integrins  $\alpha_4\beta_1$  an VCAM-1. Die Ergebnisse der Zelladhäsionstests können jedoch nicht di-



**Abbildung 6.6:** Einfluss der zyklischen Peptide auf die Adhäsion der Ramos-Zellen an VCAM-1 bei einer Peptidkonzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . BU49 (a), BU49 (b): Inhibition der Adhäsion durch den Antikörper bei der Konzentration von  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  bzw.  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

rekt mit Literaturdaten verglichen werden, da die Tests von Quan *et al.* mit gereinigtem Integrin  $\alpha_4\beta_1$  durchgeführt wurden und die genauen Bedingungen des Tests nicht angegeben sind.<sup>[66]</sup> Die Adhäsion der Ramos-Zellen an VCAM-1 wurde lediglich durch den inhibierenden Antikörper anti-Integrin  $\alpha_4\beta_1$  gehemmt. Der Antikörper wurde in zwei Konzentrationen getestet und zeigte bei der höheren Konzentration (33 nM) beinahe vollständige Inhibition der untersuchten Interaktion. Die Einführung der neuen Strukturelemente in die Peptide cyclo(-Ser-(1R,2S)-Achc-Leu-Asn-Asp-) 4, cyclo(-Ser-(1S,2S)-Achc-Leu-Asn-Asp-) 5, cyclo(-Ser-(1R,2S)-Acpc-Leu-Asn-Asp-) 6, cyclo(-Ser-(1R,2S)-Acpc-Gln-Ile-Asp-) 7, cyclo(-Ser-(1R,2S)-Achc-Gln-Ile-Asp-) 8, cyclo(-Ser-(1R,2S)-Achc-Leu-Asn-Ile-Asp-) 13, cyclo(-Ser-(1S,2S)-Achc-Leu-Asn-Ile-Asp-) 14, cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-(R)-Ambs-Asp-) 15, cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-(S)-Ambs-Asp-) 16 brachte keine Erhöhung der Affinität zu Integrin  $\alpha_4\beta_1$ . Die dargestellten Studien zeigen, dass ebenfalls der Einbau von  $\beta$ -Homoamino-säuren in die zyklische Penta- und Hexapeptiden in keiner Erhöhung der biologischen Aktivität resultierte.

### 6.1.3 Resumé

Alle Daten zeigen, dass die zyklischen Peptide, die ausgehend von der Aminosäuresequenz TQIDSPLN konzipiert wurden und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, keine signifikante Affinität zu Integrin  $\alpha_4\beta_1$  besitzen. Möglicherweise ist die Aminosäuresequenz der getesteten Penta- bzw. Hexapeptide zu kurz, um eine natürliche Bindungsschleife des VCAM-1 nachzuahmen, was im Verlust der biologischen Aktivität deutlich wird.

In seiner Dissertation analysierte Strijowski die Konformationen der Peptide mit inkorporierten  $\beta$ -Aminosäuren (Acpc, Achc, Ambs). Er zeigte, dass sowohl Penta- als auch Hexapeptide keine zufriedenstellende strukturelle Übereinstimmung mit der Bindungsschleife von VCAM-1 aufweisen. Mit diesen konformationellen Abweichungen begründete er die nicht vorhandene biologische Aktivität der Peptide.<sup>[140]</sup>

Die Konformationsanalyse einiger der durch Malešević synthetisierten und hier untersuchten Peptide wurde von Guthöhrlein durchgeführt. Für das Peptid cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-Asp-) **1** erhielt Guthöhrlein die beste konformationelle Übereinstimmung mit der Struktur der Bindungssequenz von VCAM-1, während die Struktur des Peptides cyclo(-Ser- $\beta^h$ Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-) **10** nur eine relativ zufriedenstellende Annäherung zur Struktur der VCAM-1-Bindungsschleife zeigte.<sup>[212]</sup> Beide Peptide zeigten jedoch keine Aktivität in biologischen Tests. Diese Ergebnisse konnten anhand der vorhandenen Konformationsdaten nicht erklärt werden und eine plausible Erklärung dieser Diskrepanz erfordert weitere Untersuchungen.

## 6.2 ADAM8 Protein

ADAM Proteine (*a disintegrin and metalloproteases*) sind multifunktionelle Proteine und besitzen einen komplexen Aufbau. Sie sind in der Lage, mit Integrinen zu interagieren. Die Wechselwirkung dieser Proteine mit Integrinen wird über die Disintegrin-Domäne dieser Proteine vermittelt (Kap. 2.2.3).<sup>[83,97,213]</sup> ADAM15 ist das einzige ADAM Protein, das über Arg-Gly-Asp (RGD) Aminosäuresequenz an Integrine bindet: es erkennt die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$ .<sup>[93,94]</sup> Die Interaktion von ADAM15 kann durch RGD-Peptide inhibiert werden.<sup>[214]</sup> Eto *et al.* zeigten allerdings, dass auch andere Erkennungssequenzen in die Bindung der ADAM Proteine an die Integrine involviert werden. Diese Erkennungssequenzen, wie z. B. das Lys-Asp-Glu Motiv (KDE) in ADAM28, befinden sich ebenfalls innerhalb der Disintegrin-Schleife des ADAM Proteins.<sup>[95,97]</sup>

In der Literatur wurden ebenfalls Bindungsstudien zur Untersuchung der homophilen Interaktion des ADAM8 Proteins beschrieben.<sup>[98]</sup> Schlomann *et al.* zeigten, dass das murine

ADAM8 Protein zu homophiler Interaktion fähig ist. Diese Wechselwirkung kann durch Antikörper gegen die Disintegrin-Domäne gehemmt werden, was auf die Lokalisierung der Erkennungssequenz für diese Wechselwirkung innerhalb der Disintegrin-Domäne des ADAM8 Proteins hindeutet (Kap. 2.2.3).<sup>[98]</sup>

ADAM Proteine sind in viele pathologische Prozesse, wie z. B. neurodegenerative Krankheiten und Immunkrankheiten, involviert.<sup>[98,214]</sup> Die Interaktionen zwischen ADAM und Integrinen spielen dabei eine bedeutsame Rolle. Aus diesem Grund ist es wichtig, Integrinliganden zu entwickeln, die diese Wechselwirkungen hemmen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob zyklische Peptide die homophile Interaktionen des ADAM8 Proteins und die Interaktionen mit Integrinen inhibieren können. Die in diesem Kapitel dargestellten Experimente am ADAM8 Protein können in zwei Forschungsprojekte unterteilt werden:

- Einfluss zyklischer Peptide auf die Wechselwirkung des humanen ADAM8 Proteins mit Integrinen
- Einfluss zyklischer Peptide auf die homophile Wechselwirkung des murinen ADAM8 Proteins.

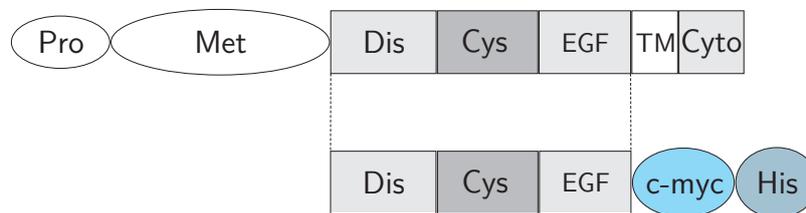
Die Aminosäuresequenzen der untersuchten zyklischen Hexapeptide wurden aufgrund der Disintegrin-Domäne des ADAM8 Proteins konzipiert. Zu diesem Zweck wurde eine Analyse der Sequenzhomologie innerhalb der ADAM Proteinfamilie durchgeführt. Für das murine und das humane ADAM8 Protein wurden die Sequenzen RLSKDK bzw. RPKKDM mit den mutmaßlichen Aminosäureerkennungsmotiven Lys-Asp-Lys (KDK) und Lys-Asp-Met (KDM) (Kap. 2.3, Seite 21) ausgewählt.

Zunächst wurde die homophile Interaktion des murinen ADAM8 Protein untersucht. Dazu wurde versucht, die durch Schlomann *et al.* dargestellten Ergebnisse zur rekombinanten Protein-Synthese von mADAM8 zu reproduzieren. Das Ziel war, damit die inhibitorische Aktivität der zyklischen Peptide cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-Ser-) **23**, cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-D-Leu-Ser-) **24**, cyclo(-Lys-Asp-Lys-D-Arg-Leu-Ser-) **25** und cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-D-Ser-) **26** zu testen, die die mutmaßliche Erkennungssequenz dieser Interaktion enthalten (Abb. 6.8). Die Autoren beschreiben die Synthese eines Fragments des murinen ADAM8 Proteins in einem bakteriellen System (*E. coli*) mit Verwendung des pTrcHis2-mADAM8-Fr Vektors. Die Fähigkeit des hergestellten mADAM8 Fragments zu homophiler Interaktion wurde in einem Zelladhäsionstest mit humanen Astrozyten N1321N1, die mit dem murinen ADAM8 transfiziert wurden, untersucht.<sup>[98]</sup> Das ADAM8 Fragment enthält drei nebeneinander liegende Domänen, eine Disintegrin-Domäne, eine cysteinreiche Domäne und eine EGF-ähnliche-Domäne.

Erste Experimente in dieser Arbeit wurden unter Verwendung des mADAM8 Proteins und der N1321N1 Zelllinien von Schlomann *et al.* durchgeführt. Die Resultate konnten nicht reproduziert werden. Die Aufreinigung des Proteins aus Bakterien BL21-pTrcHis2-mADAM8-Fr gelang nicht, da in *E. coli* nur niedrige Proteinexpression zu beobachten war. Darüber hinaus war das Protein in denaturierter Form in *inclusion bodies* vorhanden. Durch den von Schlomann *et al.* verwendeten bakteriellen Vektor pTrcHis2-mADAM8-Fr erfolgt die Synthese und Lokalisation eines Proteins in *E. coli* im Cytoplasma, wo native Disulfidbrücken nicht gebildet werden können. Dadurch werden Proteine mit vielen Disulfidbrücken nicht korrekt gefaltet. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das entsprechende Fragment (Abb. 6.7, 6.8) des murinen und auch des humanen ADAM8 Proteins mit Hilfe des pBADgIII Vektors in einem bakteriellen System hergestellt, welches ein Signalpeptid enthält (Kap. 6.2.1). Die Aufreinigung des Proteins sollte an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätssäule erfolgen (Kap. 6.2.3).

Im zweiten Teilprojekt wurden die Interaktionen des humanen ADAM8 Proteins mit Integrinen und der Einfluss zyklischer Peptide auf diese Interaktionen untersucht (Kap. 6.2.5-6.2.7). Diese Experimente wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie durchgeführt.

Als Modellzelllinie wurden CHO (*chinese hamster ovary*) Zellen verwendet, die mit unterschiedlichen Integrinuntereinheiten stabil transfiziert waren und zur Untersuchung entsprechender Integrine eingesetzt wurden. Das humane ADAM8 Protein wurde in einem Säugerzellsystem (HEK-EBNA 293 Zellen) synthetisiert und aufgereinigt. Sowohl die CHO Zelllinien als auch das hADAM8 Protein wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frey zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 6.7:** Schematische Darstellung des ADAM8 Proteins. Vollständiges Protein (oben) und das synthetisierte Konstrukt (unten); Pro, Met, Dis, Cys, EGF, TM und Cyto stehen für die Pro-, Metalloproteinase-, Disintegrin-, cysteinreiche, EGF-ähnliche, transmembrane und cytoplasmatische Domänen. c-myc und His bezeichnen die c-myc- und Hexahistidinepitope am C-Terminus des synthetisierten Konstruktes.

```

m 403 GPVCGNLFVE HGEQCDCGTP QDCQNPCCNA TTCQLVKGAE CASGTCHEC
h 408 GPVCGNLFVE RGEQCDCGPP EDCRNRCNS TTCQLAEGAQ CAHGTCQEC

m 453 KVKPAGEVCR LSKDKDLEE FCDGRKPTCP EDAFQQNGTP CPGGYCFDGS
h 458 KVKPAGELCR PKKDMCDLEE FCDGRHPECP EDAFQENGTP CSGGYCYNGA

m 503 CPTLAQQCRD LWGPGARVAA DSCYTFSIPP GCNGRMYSGR INRCGALYCE
h 508 CPTLAQQCQA FWGPGGQAAE ESCFSYDILP GCKASRYRAD MCGVLQCKGG

m 553 GGQKPLERSF CTFSSNHGVC HALGTGSNID TFELVLQGTK CEEGKVCMDG
h 558 QQPLGRAICI VDVCHALTTE DGTAYEPVPE GTRCGPEKVC WKGRCQDLHV

m 603 SCQDLRVYRS ENCSAKCNNH GVCNHNKRECH CHKGWAPPNC VQ
h 608 YRSSNCSAQC HNHGVCNHNKQ ECHCHAGWAP PHCAKLLTEV HAASGSLP

```

**Abbildung 6.8:** Aminosäuresequenzen der klonierten Fragmente der mADAM8 und hADAM8 Proteine. Die Aminosäuresequenzen enthalten die Disintegrin-Domäne, cysteinreiche Domäne und EGF-ähnliche Domäne der ADAM8 Proteine. Die rotmarkierte Sequenz entspricht dem vorgeschlagenen Erkennungsmotiv.

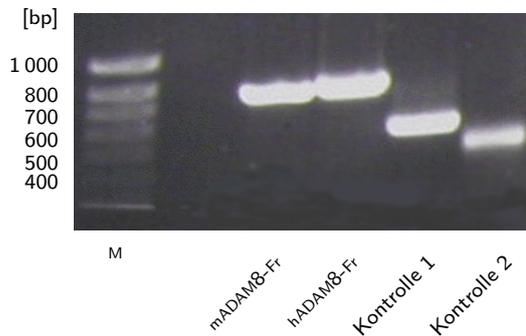
### 6.2.1 Klonierung des ADAM8 Proteins

Der für die Herstellung des mADAM8 durch Schlomann *et al.* verwendete pTrcHis2 Vektor ermöglicht die Expression des Proteins und die Aufreinigung durch die Bindung des His<sub>6</sub>-tags an eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätssäule. Das ADAM8 Protein enthält Disulfidbrücken, die sich hauptsächlich in den Disintegrin-, cysteinreichen und EGF-ähnlichen Domänen befinden. Für die Bildung der nativen Disulfidbrücken ist es essentiell, dass die Sekretion des synthetisierten Proteins in das Periplasma gewährleistet ist, da diese nur unten oxidierenden Bedingungen gebildet werden können. Dies ist in diesem Fall nicht gewährleistet, da der verwendete Vektor kein entsprechendes Signalpeptid enthält.

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pBADgIII kodiert ein bakterielles Signalpeptid, so dass das Protein nach der Expression aus dem Periplasma aufgereinigt werden kann.

#### 6.2.1.1 Amplifikation der mADAM8 und hADAM8 Fragmente

Die DNA Template der beiden Fragmente mADAM8-Fr und hADAM8-Fr wurden durch PCR mit Hilfe des *ThermalAce*<sup>TM</sup> *DNA Polymerase Kit* von Invitrogen und spezifischen Primer amplifiziert. Das Design der Primer erfolgte aufgrund der Nukleotidsequenz der ADAM8 Proteine (Datenbank: NCBI; mADAM8 – NM\_007403, hADAM8 – D26579).<sup>[215]</sup> Die Primer für die Synthese der mADAM8-Fr und hADAM8-Fr enthalten an den Enden zusätzliche



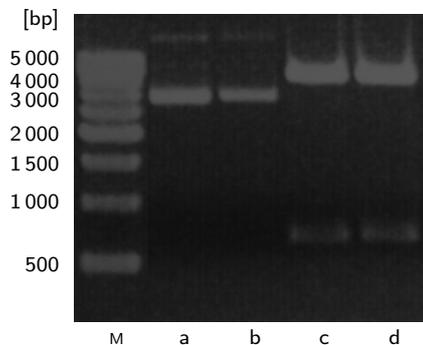
**Abbildung 6.9:** Analyse der in PCR synthetisierten ADAM8 Fragmente. Kontrolle 1 und 2 – 540 bp bzw. 500 bp (1% Agarosegel).

Parallel zu den cDNA Fragmenten des ADAM8 Proteins, wurden als Kontrolle die cDNA der Glyceraldehyd-3'-phosphatdehydrogenase und ein gc-reiches cDNA-Fragment amplifiziert. Die benötigten Primer waren Bestandteil des Kits, die amplifizierten Fragmente entsprechen den erwarteten Größen (Abb. 6.9).

Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI und XhoI bzw. XbaI und BglII. Die synthetisierten DNA Fragmente wurden nach PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 6.9). Die mADAM8-Fr und hADAM8-Fr Konstrukte haben eine Länge von 726 bp bzw. 744 bp und stimmen mit den Banden des Gels überein.

Parallel zu den cDNA Fragmenten des ADAM8 Proteins, wurden als Kontrolle die cDNA der Glyceraldehyd-3'-phosphatdehydrogenase und ein gc-reiches cDNA-Fragment amplifiziert. Die benötigten Primer waren Bestandteil des Kits, die amplifizierten Fragmente entsprechen den erwarteten Größen (Abb. 6.9).

### 6.2.1.2 Restriktionsverdau, Ligation und Transformation der Plasmide in *E. coli*



**Abbildung 6.10:** Restriktionsanalyse der pBAD-mADAM-Fr und pBAD-hADAM-Fr Plasmide (1% Agarosegel). Plasmide pBAD-mADAM-Fr und pBAD-hADAM-Fr wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI bzw. XbaI und BglII verdaut; M – DNA-Marker; a,b – nicht geschnittene Plasmide pBAD-mADAM-Fr und pBAD-hADAM-Fr; c,d – pBAD-mADAM-Fr und pBAD-hADAM-Fr Plasmide nach dem Restriktionsverdau.

Die Plasmide pBADgIIIa und pBADgIIb und die in der PCR synthetisierten cDNA-Fragmente mADAM8-Fr und hADAM8-Fr wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und mit Hilfe von T<sub>4</sub> DNA Ligase ligiert. Die Plasmide pBADgIIIa und pBADgIIIb unterscheiden sich voneinander lediglich in den vorhandenen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme innerhalb der multiplen Klonierungsstelle. Anschließend wurden die ligierten Plasmide mit Hilfe eines Hitzeschocks in die kompetenten DH5 $\alpha$  *E. coli* Bakterien transformiert (Kap. 5.5.8). Die transformierten Bakterienkolonien wurden auf Agar-Platten mit Ampicillin selektiert und der Erfolg der Klonierung wurde in einer Restriktionsanalyse überprüft.

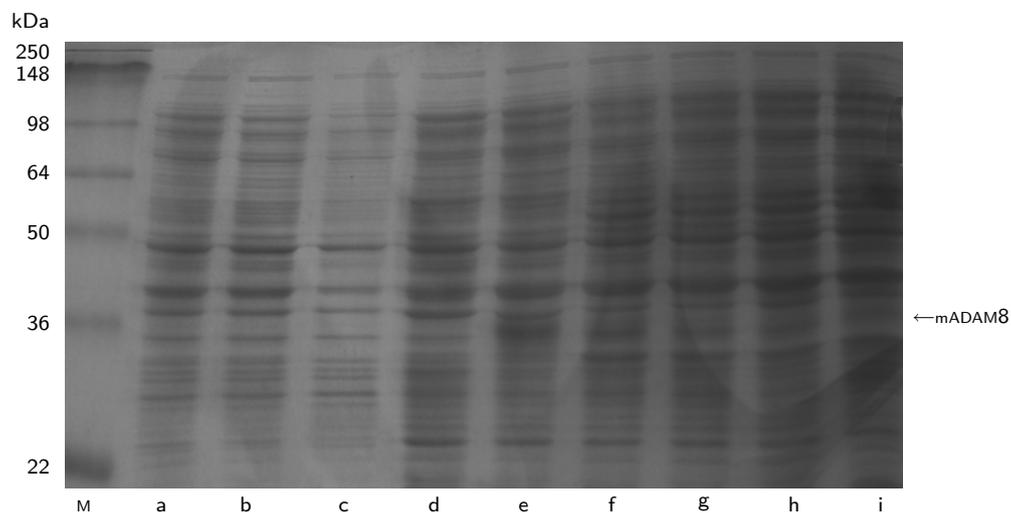
Die intakten Vektoren zeigen wie erwartet drei Banden, die aufgrund unterschiedlicher Konformationen der Vektoren zu erklären sind (Abb. 6.10 (a,b)). Nach der Restriktion der Vektoren sind zwei Bande bei ca. 4000 bp und 700 bp zu erkennen. Die obere Bande entspricht dem geschnittenen Vektor und das 700 bp Fragment entspricht dem ADAM8 Fragment. Die Sequenzierung beider Konstrukte bestätigte die erfolgreiche Klonierung.

### 6.2.2 Expression des ADAM8 Proteins in *E. coli*

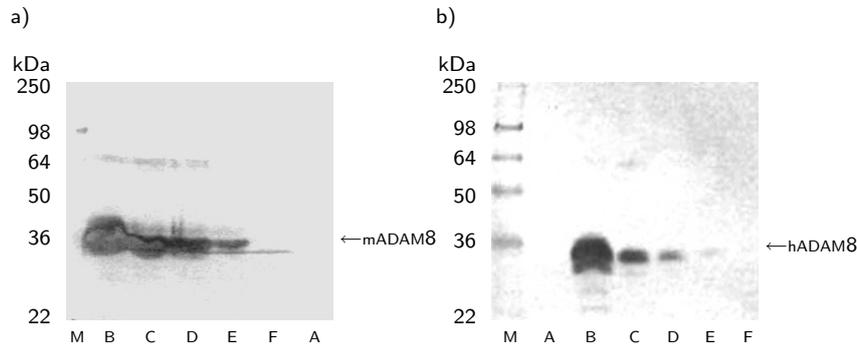
Zur Expression von mADAM8-Fr und hADAM8-Fr wurden die Vektoren pBAD-mADAM-Fr und pBAD-hADAM-Fr in den *E. coli* Bakterienstamm BL21 transformiert.

Die Expression von mADAM8-Fr und hADAM8-Fr wurde durch Zugabe von Arabinose induziert. Arabinose bindet an das Arabinose-bindende Protein AraC, welches die Transkription des *araBAD*-Operons aktiviert und die Expression des ADAM8 induziert. Zur Bestimmung der optimalen Arabinosekonzentration wurden jeweils 50 mL LB Medium angeimpft und mit Arabinose in Konzentrationen von 0.2% bis 0.02‰ 4 h induziert. Die Ergebnisse der Proteinexpression sind für mADAM8-Fr in Abbildung 6.11 dargestellt. Die Identifizierung der rekombinanten Proteine wurden im Western Blotting mit Antikörper gegen das His<sub>6</sub>-Epitop bzw. gegen das c-myc-Tag durchgeführt (Abb. 6.12).

Die Ergebnisse der Expressionstudien von mADAM8-Fr und hADAM8-Fr bei 37°C zeigen, dass die Expression der beiden Proteine durch Arabinose induziert wird und wie erwar-



**Abbildung 6.11:** Expression des mADAM8-Fr Proteins in mit pBAD-mADAM-Fr transformierten BL21 Bakterien; M – Marker, a-b – nicht induzierte transformierte Bakterien, c – nicht transformierte Bakterien, d – nicht transformierte Bakterien mit Zusatz von Arabinose (0.2%), e-i – transformierte Bakterien induziert mit Arabinose. Arabinose-Konzentration: e – 0.200%, f – 0.020%, g – 0.002%, h – 0.20‰, i – 0.02‰.



**Abbildung 6.12:** Western Blotting mit anti-His<sub>6</sub>-Tag Antikörper. Identifizierung der Proteine mADAM8-Fr (a) und hADAM8-Fr (b) in Komplettlysaten aus transformierten BL21 Bakterien nach Induktion mit Arabinose; A – Bakterien vor Induktion, B-F – Induktion mit Arabinose. Arabinose-Konzentration: B – 0.200%, C – 0.020%, D – 0.002%, E – 0.20 %, F – 0.02 %.

tet von der Arabinosekonzentration abhängig ist. Die Molekularmasse der rekombinanten Proteine beträgt ca. 33 kDa für beide Proteine.<sup>[216]</sup> Die beobachteten Banden liegen bei ca. 36 kDa, was die Synthese bestätigt.

In weiteren Expressionstudien wurde die Lokalisation und Sekretion des rekombinanten Proteins in das Periplasma untersucht und die optimale Temperatur und Kultivierungsdauer bestimmt. Die Bakterienkulturen BL21-pBAD-mADAM-Fr und BL21-pBAD-hADAM-Fr (50 mL) wurden in LB Medium bei 23 °C und 30 °C, 6 h bzw. 3 h kultiviert und mit Arabinose in Konzentration von 0.2%, 0.1% und 0.05% bei einer OD<sub>600</sub> von 0.5 induziert. Nach beendeter Induktion wurden die Bakterien geerntet und einem Kompartimentstest unterzogen. Zu diesem Zweck wurde die periplasmatische und die cytoplasmatische Fraktion, als auch potentiell *inclusion bodies*-enthaltender Bakterienrückstand isoliert.

Zur Gewinnung der periplasmatischen Fraktion wurden die Bakterien nach Beendigung der Expression zentrifugiert und einem osmotischen Schock unterzogen, in dem sie zuerst mit einem 20% Saccharose-haltigem Puffer (Puffer D) behandelt wurden und nach Zentrifugation in einer eiskalten 20 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert wurden. Danach wurden sie wiederum zentrifugiert und der Überstand (periplasmatische Fraktion) wurde für die Aufreinigung verwendet.

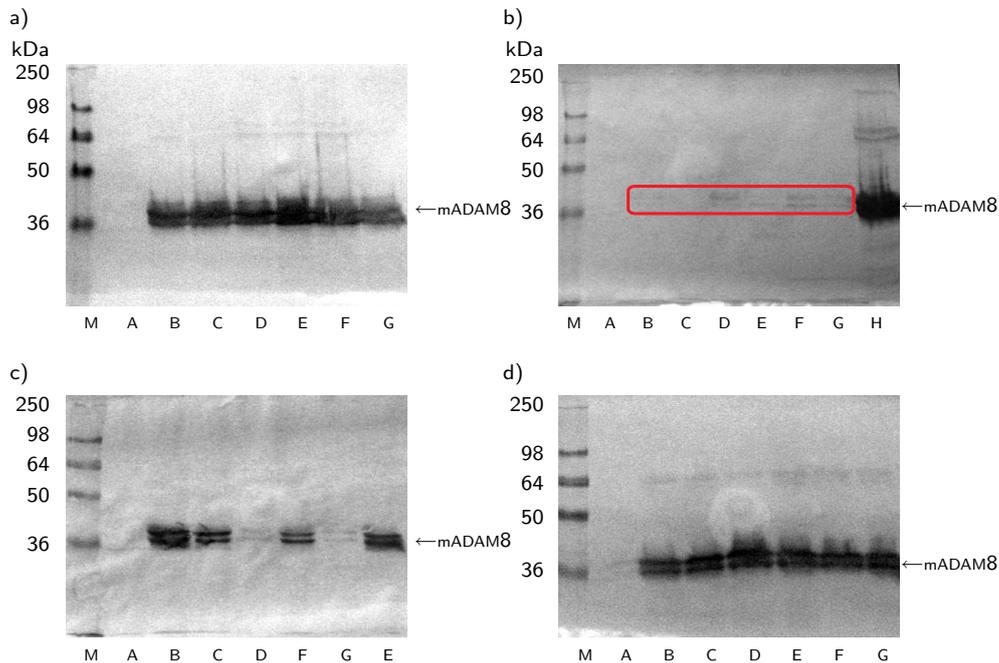
Die cytoplasmatische Fraktion kann entweder aus dem restlichen Pellet nach der Präparation des Periplasma oder direkt aus der Bakterienkultur gewonnen werden. Bei letzterer Vorgehensweise wurden die pelletierten Bakterien mit Tris-Puffer (Puffer E) resuspendiert und mit Lysozym und DNase I inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf Eis gekühlt und im Ultraschallbad behandelt. Die lysierten Bakterien wurden anschließend zentrifugiert und der Überstand (cytoplasmatische Fraktion) für die weitere Aufreinigung eingesetzt.

In allen isolierten Fraktionen wurde das Expressionsniveau des rekombinanten Proteins mit Hilfe eines Immunnachweis mit dem anti-c-myc-Tag Antikörper analysiert. Die höchste Sekretion des rekombinanten mADAM8-Fr Protein wurde bei Kultivierungstemperatur von 30°C und einer Arabinosekonzentration von 0.1% beobachtet (Abb. 6.13 (b) Spur F). Diese optimierten Bedingungen wurden bei der Proteingewinnung verwendet.

Die Ergebnisse in Abbildung 6.13 zeigen, dass das rekombinante Protein mADAM8-Fr in den Bakterien hauptsächlich in der cytoplasmatischen Fraktion und als unlösliche Form (*inclusion bodies*) vorliegt. Das Protein wurde auch in der periplasmatischen Fraktion detektiert, seine Konzentration ist in dieser Fraktion jedoch gering. Die Daten zeigen, dass die Veränderungen der Parameter wie Reduzierung der Temperatur und Induktorkonzentration, die zu einer geringeren Proteinexpression führen sollten und dadurch die Löslichkeit des Proteins erhöhen sollten, keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die erhöhte Sekretion des Proteins in das Periplasma hatten. Das rekombinante Protein mADAM8-Fr wurde als eine doppelte Bande identifiziert. Die untere Bande bei ca. 36 kDa entspricht dem mADAM8-Fr Protein ohne Signalpeptid, die obere Bande bei ca. 38 kDa entspricht dem kompletten Konstrukt. Im Western Blotting des Komplettlysats wurde eine zusätzliche schwache Bande bei ca. 64 kDa detektiert, die einem Dimer des synthetisierten Proteins zuzuordnen ist (Abb. 6.13 (a,d)).

Im Fall von hADAM8-Fr wurden analoge Studien der Proteinlokalisierung in Bakterien durchgeführt. Diese zeigten ähnliche Ergebnisse, wobei in diesem Fall der Anteil des rekombinanten Proteins in der periplasmatischen und cytoplasmatischen Fraktion geringer war als im Fall von mADAM8-Fr Protein. In beiden Fraktionen konnte hADAM8-Fr nur schwach detektiert werden. Das hADAM8-Fr wurde hauptsächlich in unlöslicher Form in den Bakterien akkumuliert. Die Veränderungen der Kultivierungs- und Induktionsbedingungen resultierten ebenfalls in keiner signifikanten Erhöhung der Proteinlöslichkeit und seiner Sekretion in das Periplasma.

Bei Expression von Säugerproteinen in einem bakteriellen System treten häufig Probleme auf, welche eine falsche Faltung des synthetisierten Proteins und die Bildung der unlöslichen Formen des Proteins (*inclusion bodies*) zur Folge haben. Für die Bildung der unlöslichen Formen der Proteine sind mehrere Faktoren mitverantwortlich. *In vivo* wird in dem Säugersystem die falsche Faltung eines Proteins durch zwei verschiedene Klasse von Enzymen, Foldasen und Chaperone, vermindert. Obwohl Bakterien auch Chaperone und Foldasen enthalten, führt die Synthese der heterologen Proteine in Bakterien selten zu einer nativen Form. Die Bildung der nativen Disulfidbrücken in dem zu synthetisierten Protein ist in *E. coli* lediglich in der oxidativen Umgebung der Periplasma möglich. Bei der Bildung der richtigen Disulfidbrückenmuster in Eukaryonten spielen Isomerasen und



**Abbildung 6.13:** Immunochemische Analyse der Distribution des rekombinanten mADAM8-Fr Proteins in BL21-pBAD-mADAM-Fr Bakterien nach der Induktion mit Arabinose; a) Komplettlysat, b) periplasmatische Fraktion, c) cytoplasmatische Fraktion, d) *inclusion bodies*. M – Marker, A-H – bezeichnen unterschiedliche Kultivierungs- und Induktionsbedingungen; A – Bakterien vor der Induktion, 37°C, B – 23°C, 0.2% Arabinose, C – 23°C, 0.1% Arabinose, D – 23°C, 0.05% Arabinose, E – 30°C, 0.2% Arabinose, F – 30°C, 0.1% Arabinose, G – 30°C, 0.05% Arabinose, H – Komplettlysat, 30°C, 0.2% Arabinose.

Oxidoreduktasen, wie z. B. Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPI), Disulfidoxidoreduktase (DsbA), Disulfid-Isomerase (DsbC) und Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), essentiellen Funktionen. Die Chaperone unterstützen die korrekte Isomerisierung, indem sie mit dem Intermediär-Produkt wechselwirken und das Risiko der falschen Proteinfaltung vermindern. Zu den am besten charakterisierten *E. coli* Chaperon-Systemen gehören Gro-ES-Gro-EL und DnaK-DnaJ-Grp-E.<sup>[217]</sup> Die Koexpression einer der oben genannten Proteine könnte die Löslichkeit des heterologen Proteins erhöhen und zu seiner erhöhten Sekretion in das Periplasma führen.

Die Löslichkeit der heterolog synthetisierten Proteine im bakteriellen System sollte durch die Verringerung der Proteinexpression theoretisch erhöht werden. Die hier durchgeführten Versuche zur Erhöhung der Proteinlöslichkeit brachten aber keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Alle Daten zeigen, dass die Expression der ADAM8 Proteine in der nativen Form in einem bakteriellen System aufgrund der komplexen Proteinnatur und Anwesenheit der Disulfidbrücken schwierig ist. Außerdem schließt die Expression der ADAM8 Proteine in

einem bakteriellen System alle post-translationellen Modifizierungen des Proteins wie z. B. Glycosylierung aus, die für die biologische Aktivität des Proteins von der großen Bedeutung sein können. Die Herstellung des nativen ADAM8 Proteins erfordert den Einsatz eines höheren Expressionssystems wie z. B. Insektenzellen oder Säugetierzellen.

### 6.2.3 Aufreinigung des rekombinanten ADAM8 Proteins

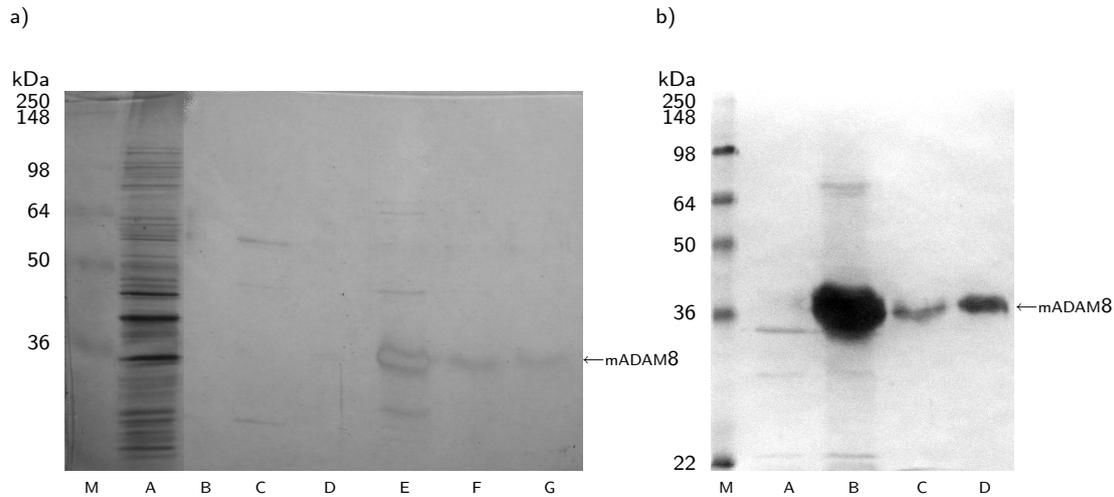
Trotz der geringen Sekretion des ADAM8 Proteins in das Periplasma wurde versucht, mADAM8-Fr Protein aus dieser Fraktion aufzureinigen. Im Fall von hADAM8-Fr wurde sowohl die periplasmatische als auch die cytoplasmatische Fraktion einbezogen.

Für die Aufreinigung der Proteine wurde jeweils 1 L der entsprechenden Bakterienkultur im LB Medium kultiviert. Als optimale Expressionsbedingungen wurde eine Temperatur von 30 °C und eine Arabinosekonzentration von 0.1% ausgewählt (Kap. 6.2.2).

Die Aufreinigung der Proteine wurde mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an einem Ni<sup>2+</sup>-NTA Harz im *batch* Verfahren durchgeführt. Das Ni<sup>2+</sup>-NTA Harz wurde zuerst mit Wasser gewaschen und mit Bindungspuffer äquilibriert. Die periplasmatische bzw. cytoplasmatische Fraktionen wurden mit Hilfe von Konzentrationseinheiten aufkonzentriert und mit dem Harz in Bindungspuffer inkubiert. Nach der Bindung des Proteins an das Harz wurde dieses zentrifugiert und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde das gebundene Protein mit Hilfe eines Imidazolgradienten eluiert.

Die Ergebnisse der Aufreinigung der mADAM8-Fr aus der periplasmatischen Fraktion sind in Abbildung 6.14 dargestellt. Nach der Entfernung der Verunreinigung mit Waschpuffer (SDS-PAGE Spur B) wurden zuerst Elutionen mit geringerer Imidazolkonzentration (15 mM und 50 mM) durchgeführt, die in Entfernung der restlichen Verunreinigungen resultierten (SDS-PAGE Spuren C und D). Das mADAM8-Fr Protein wurde mit 500 mM Imidazol von dem Ni<sup>2+</sup>-NTA Harz eluiert und erschien als einzelne Bande bei einer Größe von ca. 36 kDa. Das gereinigte Protein wurde ebenfalls in Western Blotting mit spezifischem anti-His<sub>6</sub>-Tag Antikörpern identifiziert. Die Abbildung 6.14 zeigt die detektierte Bande des mADAM8-Fr Proteins nach der Aufreinigung aus der periplasmatischen Fraktion. Zur Entfernung des Imidazols wurde das Protein in Phosphat-Puffer umgepuffert. Danach wurde es bei unterschiedlichen Temperaturen (−80 °C, −20 °C und 4 °C) gelagert.

Im Fall von hADAM8-Fr wurde versucht, das Protein sowohl aus dem Periplasma wie auch aus dem Cytoplasma der Bakterien BL21-pBAD-hADAM-Fr aufzureinigen. Beide Versuche führten aber zu keinem positiven Ergebnis. In beiden Fällen wurde kein Protein in den eluierten Fraktionen gefunden. Mögliche Erklärungen sind die schlechte Löslichkeit dieses Proteins und seine sehr schwache Sekretion in das Periplasma. Die falsche Faltung des Pro-



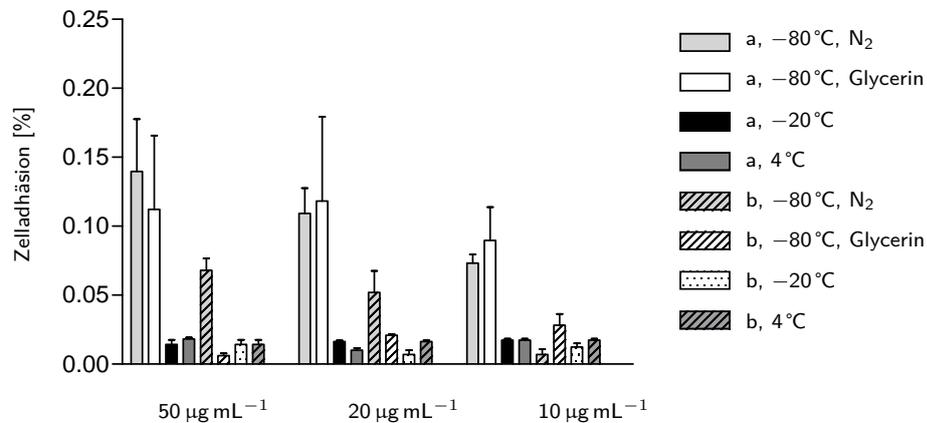
**Abbildung 6.14:** Aufreinigung des mADAM8 Proteins aus Periplasma mit Hilfe der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Affinitätschromatographie. a) SDS-PAGE Silberfärbung; A – periplasmatische Fraktion, B – letzter Waschschrift, C – 15 mM Imidazolelution, D – 50 mM Imidazolelution, E, F, G – Elution des mADAM8-Fr mit 500 mM Imidazol. 10%. b) Western Blotting mit anti-His<sub>6</sub>-Tag Antikörpern; A – vor Induktion, B – nach Induktion, C – periplasmatische Fraktion, D – gereinigtes mADAM8-Fr Protein. M steht für Proteinmarker.

teins kann zu einer Unzugänglichkeit des Polyhistidinpeptides infolge einer Lokalisation in das Innere des Proteins führen, welche die nicht erfolgreiche Aufreinigung dieses Proteins erklären könnte. Die Studien der biologischen Aktivität des hADAM8 wurden mit dem in einem Säugerzellsystem hergestellten, extrazellulären Teil des hADAM8 durchgeführt und sind in Kapitel 6.2.6 beschrieben. Das Protein wurde von Prof. Dr. Frey zur Verfügung gestellt und ist dabei ebenfalls mit Hilfe eines Polyhistidinaffinitätschromatographie aufgereinigt worden.

#### 6.2.4 Untersuchung der homophilen Interaktion von ADAM8

Die Fähigkeit von mADAM8 zu einer homophilen Interaktion wurde in einem Zelladhäsionstest unter Anwendung der humanen Astrozyten N1321N1 untersucht, die mit dem murinen ADAM8 stabil transfiziert waren und durch PD Dr. Bartsch zur Verfügung gestellt wurden. Wildtyp N1321N1 Zellen dienen als Referenz. Mit Hilfe dieser Zelllinie waren durch Schlomann *et al.* die ersten Beweise der homophilen Interaktion des mADAM8 Proteins in einem Zelladhäsionstest untersucht worden (Kap. 6.2).<sup>[98]</sup>

Als Proteinligand in dieser Arbeit diente das rekombinant hergestellte mADAM8-Fr (Kap. 6.2.1). mADAM8-Fr wurde auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Als Interaktionspartner dienten aus der Zellkultur gewonnene N1321N1 (Wildtyp) und N1321N1-



**Abbildung 6.15:** Adhäsion der N1321N1-mADAM8 (a) und Wildtyp N1321N1 (b) an das mADAM8-Fr Protein (Immobilisierung bei der Konzentration von 50 µg mL<sup>-1</sup>, 20 µg mL<sup>-1</sup> und 10 µg mL<sup>-1</sup>). Das immobilisierte Protein wurde bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert; -80°C schockgefroren mit dem flüssigen Stickstoff (N<sub>2</sub>), -80°C mit Zusatz von 25% Glycerin, -20°C und 4°C.

mADAM8 Zellen. Im ersten Experiment wurde untersucht, welche Lagerungsbedingungen für das in *E. coli* rekombinant hergestellte mADAM8-Fr Protein optimal sind. Die Ergebnisse des ersten Zelladhäsionstests in diesem System sind in Abbildung 6.15 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass im Fall der Lagerungsbedingungen des mADAM8-Fr Proteins bei -80°C eine erhöhte Zelladhäsion der N1321N1-mADAM8 Zellen im Vergleich zu den Wildtyp N1321N1 Zellen detektiert wurde. Für die Lagerungsbedingungen bei -20°C und 4°C wurde keine Adhäsion der N1321N1-mADAM8 an das mADAM8-Fr Protein beobachtet, die auf homophile Interaktion des mADAM8 Proteins hindeuten könnten. Die Bestimmung der Adhäsion ist jedoch mit einer großen Abweichung der gemessenen Werte behaftet. Es wurde mehrfach versucht, diese Ergebnisse zu reproduzieren und den Messfehler zu reduzieren. Erneute Versuche waren jedoch nicht erfolgreich. In den neuen Versuchen wurde keine Adhäsion der N1321N1-mADAM8 Zellen an das mADAM8-Fr detektiert. Wiederholte Aufreinigung des mADAM8-Fr Proteins brachte ebenfalls keine Verbesserung.

Die Probleme bei der Etablierung eines Zelladhäsionstests in diesem Messsystem können mit der Auswahl eines schlechten Expressionssystems für mADAM8 assoziiert werden. Es ist fraglich, ob die Expression der ADAM Proteine in einem bakteriellen System grundsätzlich sinnvoll ist und zur Herstellung eines nativen Proteins führen kann. Gut charakterisierte Proteine dieser Familie wie z. B. ADAM17 wurden hinsichtlich der biologischen Aktivität mit Schwerpunkt auf Disintegrin- und cysteinreiche Domäne untersucht und in höheren Expressionssystem wie Säugerzellen hergestellt.<sup>[213]</sup>

Die Probleme, die während der Etablierung eines Zelladhäsionstests zur Untersuchung der homophilen Interaktion des mADAM8 Proteins aufgetreten sind, zeigen, dass die durch

Schlomann *et al.* dargestellten Studien nicht reproduzierbar sind und die durchgeführten Experimente mit mADAM8-Fr fraglich sind. Für künftige Arbeiten auf diesem Gebiet ist eine erneute Klonierung des mADAM8-Fr Proteins in einem höheren Expressionssystem, z. B. Insektenzellsystem oder Säugerzellsystem, notwendig, da so eine native Form dieses Proteins synthetisiert werden kann.

### 6.2.5 Nachweis der Integrinlokalisierung auf Oberfläche der CHO Zellen

Die Modellzellen CHO exprimieren endogen Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$ .<sup>[218,219]</sup> Die hier verwendeten CHO Zelllinien wurden mit unterschiedlichen humanen Integrinuntereinheiten ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_3$ ,  $\alpha_L\beta_2$ ) transfiziert. Bei den getesteten Zelllinien kommen theoretisch alle mögliche Kombinationen der Integrine  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_7$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  in Frage.<sup>[55]</sup>

CHO Zellen und im weiteren verwendetes humanes ADAM8 wurden von Prof. Dr. Frey zur Verfügung gestellt. Alle CHO Zelllinien wurden ursprünglich von Takada modifiziert und die Transfektion aller der untersuchten CHO Zelllinien ist in der Literatur beschrieben.<sup>[27,94,220–224]</sup> Humanes ADAM8 wurde durch Al-Riyami aufgereinigt.<sup>[225]</sup> Die Experimente zur Untersuchung der Interaktion von ADAM8 mit Integrinen und des Einflusses zyklischer KDM-Peptide auf diese Interaktion wurden im Rahmen der Kooperation mit Prof. Dr. Frey und Dr. Al-Riyami durchgeführt.<sup>[225]</sup>

Die Zelllinien CHO-Integrin  $\alpha_2$ , CHO-Integrin  $\alpha_3$ , CHO-Integrin  $\alpha_4$  und CHO-Integrin  $\alpha_6$  exprimieren Hybride der entsprechenden humanen Integrinuntereinheiten  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  bzw.  $\alpha_6$  und der endogen exprimierten Hamster Integrinuntereinheit  $\beta_1$ . Die Zelllinie CHO-Integrin  $\beta_3$  exprimiert ein Hybrid der humanen Integrinuntereinheit  $\beta_3$  und der endogen exprimierten Hamster Integrinuntereinheit  $\alpha_v$ . Im Fall der Zelllinie CHO-Integrin  $\alpha_L\beta_2$  wurden beide humanen Integrinuntereinheiten exprimiert.<sup>[27,94,220–224]</sup> Zur Untersuchung der Stabilität der Integrinexpression in den transfizierten CHO Zellen wurden die Integrine mit durch Fluoreszeinisothiocyanat markierten (FITC) Antikörpern, die gegen bestimmte humane Integrinuntereinheiten gerichtet sind, detektiert.

Die Zellen wurden zu einer Konfluenz von 70% bei 37°C kultiviert und mit EDTA von dem Boden der Petrischalen abgelöst. Vor dem Experiment wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach mit BSA in PBS blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen eine bestimmte Integrinuntereinheit mit den durch Hersteller empfohlenen Konzentrationen inkubiert (Tab. 5.8, Seite 90). Jede Zelllinie wurde einzeln mit den folgenden Antikörpern versetzt: CD49b (anti- $\alpha_2$ ), CD49c (anti- $\alpha_3$ ), CD49d (anti- $\alpha_4$ ), CD49f (anti- $\alpha_6$ ), CD11a (anti- $\alpha_L$ ), CD17 (anti- $\beta_3$ ), CD18 (anti- $\beta_2$ ). Als Kontrolle dienten Wildtyp

**Tabelle 6.3:** Verschiebung des Fluoreszenzsignals zwischen nicht markierten und mit FITC-Antikörpern markierten CHO Zellen.

CHO Zelllinie	Wildtyp	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_4$	$\alpha_6$	$\beta_3$	$\alpha_L$	$\beta_2$
Fluoreszenzverschiebung geometrisches Mittel	<1.2	18.5	303.9	25.7	172.8	6.8	29.2	45.8

CHO Zellen (WT), die mit dem jeweiligen verwendeten Antikörper versetzt wurden. Um einen Überschuss der Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mittels Durchflusscytometrie vermessen.

Humane Zellen besitzen Moleküle wie z. B. Porphyrine, Flavin- und Pyridinnukleotide, die eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Diese kann beispielsweise bei einer Anregung von 488 nm (Anregungswellenlänge für FITC) in einem Bereich von 500 nm bis 700 nm detektiert werden. [226,227]

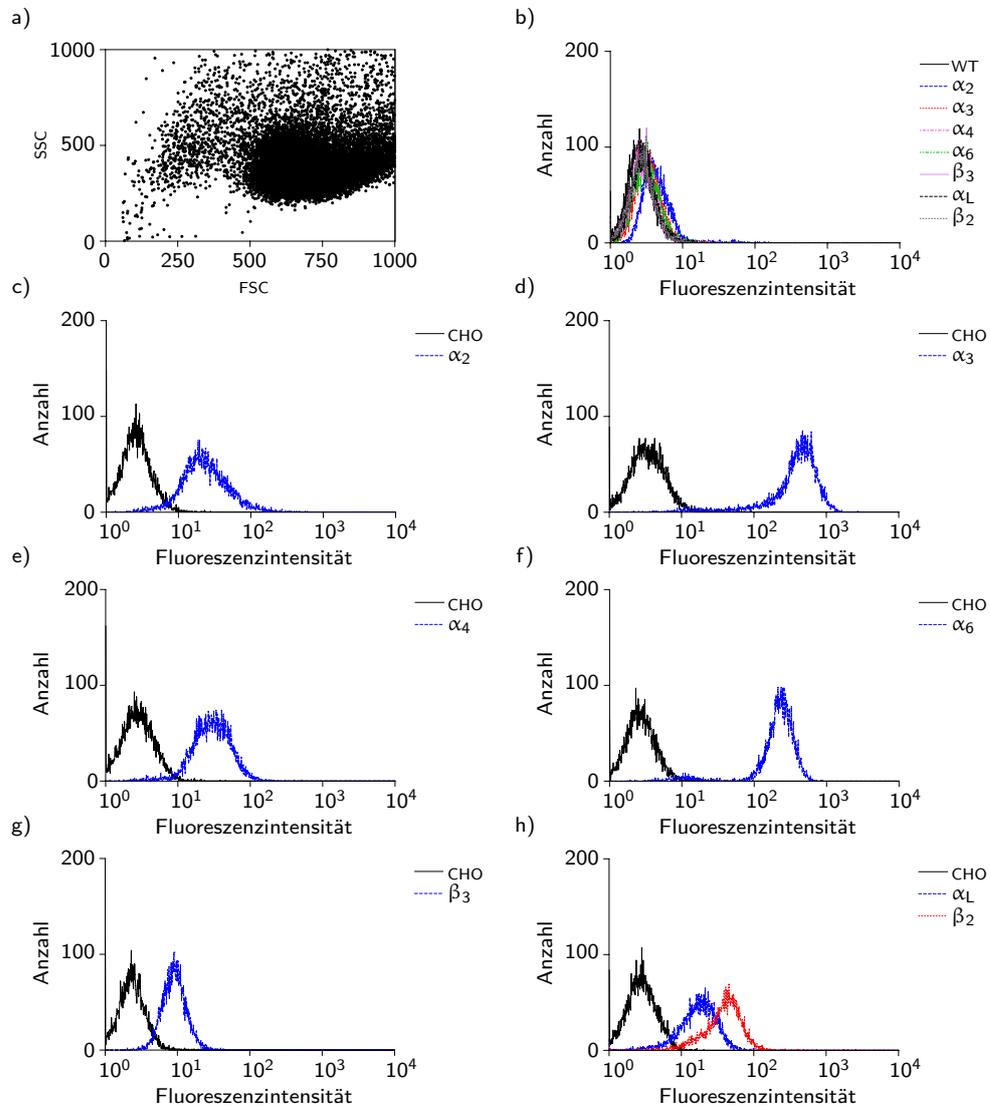
Die Ergebnisse der Durchflusscytometrie sind in der Abbildung 6.16 dargestellt und zeigen, dass die transfizierten CHO Zellen die entsprechende Integrinuntereinheiten exprimieren. Die durchgeführte Kontrolle mit Wildtyp-CHO Zellen zeigt, dass die verwendeten Antikörper keine unspezifischen Kreuzreaktionen mit Oberflächenrezeptoren der CHO Zellen eingehen (Abb. 6.16 (b)) und spezifisch an die überexprimierten Integrinuntereinheiten binden.

Um ausschließlich das Fluoreszenzsignal der lebenden Zellen zu betrachten, wurde jeweils die bestimmte Region (*gate*) ausgewählt und die Fluoreszenzintensität nur aus dieser Region quantifiziert. Für jede Zelllinie wurde jeweils eine neue Region ausgewählt.

Die statistische Analyse der Ergebnisse liefert unter anderem das geometrische Mittel (*geo mean*), das eine quantitative Auskunft über die relative Fluoreszenz und in diesem Fall die Expression der Integrinuntereinheiten durch die untersuchten CHO Zelllinien gibt. Das geometrische Mittel bezeichnet die durchschnittliche Anzahl des Antigens pro Zelle. Die Formel 6.1 definiert das geometrische Mittel, wobei sich F auf die Fluoreszenz einer Zelle und n auf die Anzahl aller Zellen bezieht.

$$\text{geometrisches Mittel} = [F(1) \cdot F(2) \cdot \dots \cdot F(n)]^{\frac{1}{n}} \quad (6.1)$$

Für die Fluoreszenz der Wildtyp-CHO Zellen liegen die Werte des geometrischen Mittels für alle untersuchte Wildtyp-Proben unter 4.0 (Abb. 6.16 (b)). Die Werte des geometrischen Mittels der transfizierten CHO Zellen, die mit entsprechendem Antikörper markiert wurden, liegen zwischen 9 für die  $\beta_3$ -CHO Zelllinie (Abb. 6.16 (g), Tab. 6.3), und 307 für die  $\alpha_3$ -CHO Zelllinie (Abb. 6.16 (d)). Der detektierte Anstieg der Fluoreszenzintensität bei



**Abbildung 6.16:** Nachweis der Integrinexpression in transfizierten CHO Zellen: a) *Dot-Plot* von Wildtyp-CHO Zellen, b) Fluoreszenz-Histogramm der Wildtyp CHO Zellen, c) - h) Fluoreszenz-Histogramme für die transfizierten CHO Zelllinien; c) CHO-Integrin  $\alpha_2$ , d) CHO-Integrin  $\alpha_3$ , e) CHO-Integrin  $\alpha_4$ , f) CHO-Integrin  $\alpha_6$ , g) CHO-Integrin  $\beta_3$ , h) CHO-Integrin  $\alpha_L\beta_2$ . CHO bezeichnet die Probe ohne Antikörper, WT bezeichnet die nicht markierten WT-CHO Zellen,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_3$ ,  $\alpha_L$ ,  $\beta_2$  bezeichnen die Proben, die mit entsprechenden Antikörpern markiert wurden.

den transfizierten CHO Zellen spiegelt die Expression der entsprechenden Integrinuntereinheiten wider.

Die Analyse der Integrinexpression in allen CHO Zelllinien wurde regelmäßig wiederholt und bestätigt die Stabilität der Integrinexpression in diesem Messsystem.

### 6.2.6 Bindung des humanen ADAM8 Proteins an Integrine

In Bindungsexperimenten wurden die Wechselwirkungen von hADAM8 mit den Integrinen, welche auf der Zelloberfläche der mit den folgenden Integrinuntereinheiten,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\beta_3$ ,  $\alpha_L\beta_3$ , transfizierten CHO Zelllinie, präsent sind, untersucht.

Am Tag des Experiments wurden die CHO Zellen von dem Boden der Petrischale mit EDTA in PBS abgelöst und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit BSA in PBS blockiert, mit Puck's Salzlösung, welche 2 mM  $Mg^{2+}$  und 2 mM  $Mn^{2+}$  Kationen enthielt, gewaschen, resuspendiert und mit humanem ADAM8 versetzt. Die Anwesenheit der zweiwertigen Kationen in Puck's Salzlösung gewährleistet die Aktivität der Integrine. Anschließend wurden die Zellen mit Puck's Salzlösung gewaschen und den Proben wurde der murine Antikörper gegen humanes ADAM8 zugegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und den Proben wurde der sekundäre Cy3 fluoreszenzmarkierte Antikörper (Ziege gegen Maus) zugegeben und inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Durchflusszytometrie vermessen.

Zuerst wurden die Messparameter so eingestellt, dass sich die lebenden Zellen im oberen rechten Quadrant des Messbereichs befanden. Es wurde jeweils das Fluoreszenzsignal aus der ausgewählten Region (*gate*) gemessen, in welcher 10 000 Ereignisse quantifiziert wurden. Für jede Zelllinie wurde jeweils eine neue Region bestimmt.

Um eine Detektion unspezifischer Fluoreszenz auszuschließen, wurden für jede CHO Zelllinie drei entsprechende Kontrolle vorbereitet und vermessen. In der ersten Kontrolle wurden nicht markierte Zellen untersucht (Daten nicht gezeigt). Als zweite Kontrollen wurden die Zellen untersucht, die lediglich mit dem sekundären Antikörper (Cy3) inkubiert wurden. In der dritten Kontrolle (AKK) wurden die Zellen mit dem primären (gegen ADAM8) und sekundären Antikörper (Cy3) inkubiert und untersucht. Detektierte Fluoreszenz der dritten Kontrolle diente als Vergleichsignal (Basisfluoreszenz) für die Probe, in welcher die Bindung des humanen ADAM8 an Integrin untersucht wurde (ADAM8). Die berechnete Verschiebung der Fluoreszenz, welche durch die Bindung des ADAM8 an Integrine verursacht wurde, bezieht sich auf Fluoreszenzsignal der dritten Kontrolle.

**Tabelle 6.4:** Verschiebung des Fluoreszenzsignals zwischen Kontrollprobe (AKK) und Messprobe (ADAM8) bei der Bindungsstudien von humanem ADAM8 an Integrine.

CHO Zelllinie	Wildtyp	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_4$	$\alpha_6$	$\beta_3$	$\alpha_L\beta_2$
Fluoreszenzverschiebung geometrisches Mittel	3.2	7.6	11.3	4.4	12.9	8.9	28.8

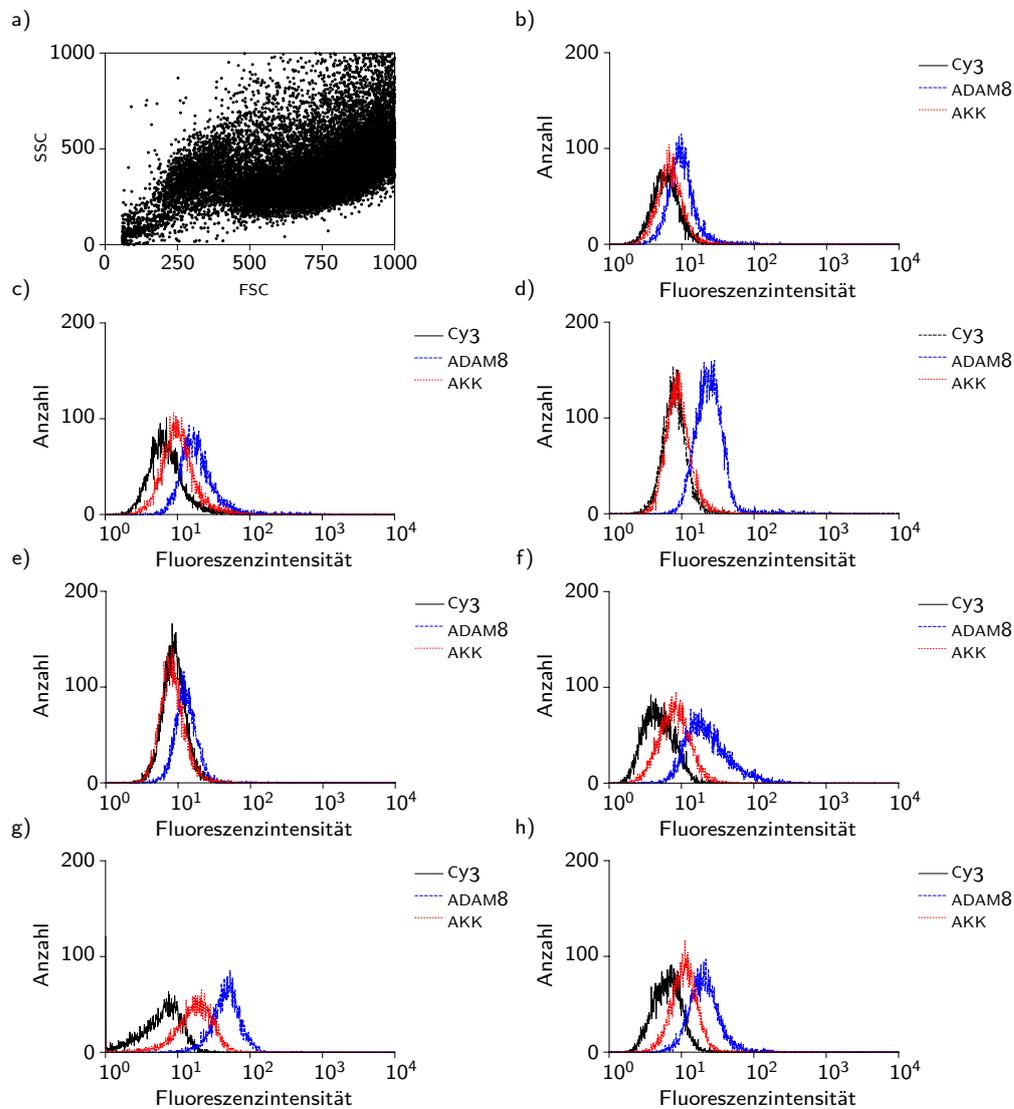
Um eine unspezifische Bindung des humanen ADAM8 an Oberflächenrezeptoren der CHO Zellen auszuschließen, wurde die WT-CHO Zelllinie untersucht. In diesem Fall wurden ebenfalls alle Kontrollproben vorbereitet und vermessen.

Ausgewählte Ergebnisse der Bindungsstudien wurden in Abbildung 6.17 dargestellt. Sie zeigen, dass im Fall der Wildtyp CHO Zelllinie, die als Kontrolle verwendete wurde, keine Bindung des humanen ADAM8 Proteins an Oberflächenrezeptoren der CHO Zellen detektiert wurde (Abb. 6.17 (b)). Der detektierte Anstieg der Fluoreszenzintensität (*fluorescence shift*) zwischen Kontrollprobe AKK und Messprobe ausgedrückt als geometrisches Mittel betrug lediglich 3.2, was auf sehr schwache unspezifische Wechselwirkung des ADAM8 Proteins mit Oberflächenrezeptoren der CHO Zellen zurückzuführen ist.

Die Unterschiede des Fluoreszenzsignals zwischen Messprobe (ADAM8) und negativer Kontrollprobe (AKK) für die transfizierten CHO Zelllinien sind in der Tabelle 6.4 zusammengefasst.

Die durchgeführten Bindungsstudien zeigen, dass für alle transfizierten CHO Zelllinien, außer Zelllinie CHO-Integrin  $\alpha_4$ , ein Anstieg der Fluoreszenzintensität detektiert wurde, welcher auf die Bindung des ADAM8 Proteins an das entsprechende Integrin hinweist. Der stärkste Anstieg der Fluoreszenzintensität (Anstieg von geometrischem Mittel um 28.8) wurde für die CHO-Integrin  $\alpha_L\beta_2$  Zelllinie ermittelt. Im Fall von anderen CHO Zelllinien, die Hybrid-Integrine exprimieren, wurden kleinere Unterschiede der Fluoreszenzintensität zwischen Referenz- und Messprobe detektiert. Die Zelllinie CHO-Integrin  $\alpha_4$  hat beinahe keine Bindung des ADAM8 Proteins an überexprimiertes Integrin  $\alpha_4\beta_1$  erwiesen. Die minimale Veränderung des Fluoreszenzsignals (Anstieg von *geo mean* um 4.4) ist mit der detektierten Änderung des Fluoreszenzintensität des Wildtyp CHO Zelllinie vergleichbar (Anstieg von *geo mean* um 3.3). Diese schwache Änderungen der Fluoreszenzintensität deutet darauf hin, dass in diesem Fall das Integrin  $\alpha_4\beta_1$  nicht als Ligand des ADAM8 Proteins fungiert.

Alle Daten der Bindungsstudien zeigen, dass das humane ADAM8 Protein ein Ligand für die getesteten Integrine (außer  $\alpha_4\beta_1$ ) darstellt, wobei die relevanteste Bindung für das Integrin  $\alpha_L\beta_2$  detektiert wurde.



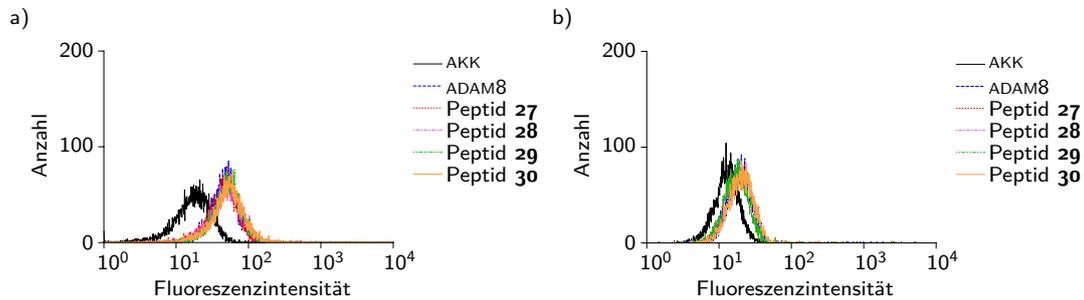
**Abbildung 6.17:** Durchflusscytometrie-Studien der Wechselwirkung des humanen ADAM8 Proteins mit Integrinen. Cy3 steht für die Kontrollprobe mit sekundärem, Cy3 markiertem Antikörper. AKK bezeichnet die Kontrollprobe mit primärem und sekundärem Antikörper ohne ADAM8. ADAM8 steht für die Probe in welcher die Bindung des ADAM8 an Integrine untersucht wurde; a) *Dot Plot* einer der transfizierten CHO Zelllinie, b) Fluoreszenz-Histogramm der Wildtyp CHO Zelllinie, c) - h) Fluoreszenz-Histogramme der mit Integrinen transfizierten CHO Zelllinien; c)  $\alpha_2$ , d)  $\alpha_3$ , e)  $\alpha_4$ , f)  $\alpha_6$ , g)  $\alpha_L\beta_2$ , h)  $\beta_3$ .

### 6.2.7 Konkurrenzexperimente mit zyklischen Peptiden

Die in der Literatur verfügbaren Informationen über die Wechselwirkungen der ADAM Proteine mit den Integrinen zeigen, dass sich die Erkennungssequenz der ADAM Proteine für Integrine innerhalb der Disintegrin-Domäne befindet.<sup>[83,228]</sup> Die Sequenzanalyse der ADAM Proteine zeigt, dass die Aminosäuresequenz in der Disintegrin-Schleife (*disintegrin loop*) innerhalb dieser Proteinfamilie nicht konserviert ist. In der Regel wechselwirken Disintegrine mit Integrinen über die Disintegrin-Schleife, die die Erkennungssequenz RGD enthält. Allerdings ist das RGD Motiv lediglich im ADAM15 Protein zu finden.<sup>[96,229]</sup> Im Fall von humanem ADAM8 Protein wird die Aminosäuresequenz Lys-Asp-Met für die Bindung dieses Proteins an Integrine vorgeschlagen (siehe Kap. 2.2.3, Tab. 2.3). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Inhibitionsexperimente mit zyklischen Peptiden durchgeführt, die die in humanem ADAM8 auftretende Aminosäuresequenz Lys-**Lys-Asp-Met**-Arg-Pro enthalten. Sie wurden von Yang synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Um das vermutliche Erkennungsmotiv Lys-Asp-Met in verschiedenen räumlichen Konformationen zu fixieren, wurden neben dem Hexapeptid cyclo(-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-Pro) **27**, das alle Aminosäuren in L-Konfiguration enthält, ebenfalls die Peptide cyclo(-Lys-Lys-Asp-Met-D-Arg-Pro) **28**, cyclo(-D-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-Pro) **29** und cyclo(-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-D-Pro) **30** synthetisiert, in welchen jeweils eine Aminosäure außerhalb der Erkennungssequenz Lys-Asp-Met in D-Konfiguration vorliegt. Anschließend wurden die synthetisierten Peptide **27**, **28**, **29** und **30** in Konkurrenzexperimenten mit den schon vorher verwendeten CHO Zellen eingesetzt.

Die Konkurrenzexperimenten wurden vergleichbar zu den Bindungsstudien durchgeführt. Es wurde lediglich eine zusätzliche Inkubation mit Peptiden eingeführt, die direkt vor der Inkubation mit dem ADAM8 Protein erfolgte. Vor der Zugabe des ADAM8 Proteins zu den CHO Zellen wurden diese nicht gewaschen, so dass während der Inkubation Peptid und Protein um die Bindungsstellen der Integrine konkurrierten. Danach wurde genau so fortgefahren, wie während eines Bindungsexperiments. Analog den Bindungsexperimenten wurden ebenfalls in diesem Fall Wildtyp CHO Zelllinie und entsprechende Referenzproben untersucht.

In Konkurrenzexperimente wurden die Zelllinien CHO-Integrin  $\alpha_L\beta_2$ , CHO-Integrin  $\alpha_6$  und CHO-Integrin  $\beta_3$  eingesetzt. Abbildung 6.18 zeigt ausgewählte Ergebnisse der Konkurrenzstudien. Sie zeigen, dass der Einsatz der Peptide **27**, **28**, **29**, **30** zu keiner signifikanter Minderung der Fluoreszenzsignals geführt hat. Das bedeutet, dass die getesteten Peptide keinen inhibitorischen Einfluss auf die untersuchte Interaktion besitzen. Während der Konkurrenzexperimente wurde ein 440-facher Überschuss (Peptid : Protein – 132  $\mu\text{M}$  : 0.3  $\mu\text{M}$ )



**Abbildung 6.18:** Durchflusszytometrie-Kompetitionsstudien: Einfluss der zyklischen Peptide **27**, **28**, **29**, **30** auf die Interaktion des humanen ADAM8 Proteins mit Integrinen. a) Fluoreszenz-Histogramm der Zelllinie CHO-Integrin  $\alpha_L\beta_2$ , b) Fluoreszenz-Histogramm der Zelllinie CHO-Integrin  $\beta_3$ .

der zyklischen Peptide verwendet, was einen Konzentrationsfehler ausschließen lässt.

Die Daten deuten darauf hin, dass an der Interaktion des ADAM8 Proteins mit den untersuchten Integrinen wahrscheinlich andere Erkennungssequenzen als das KDM Motiv beteiligt sind oder ein längeres Aminosäuremotiv in die Erkennung der Integrine involviert ist. Alternativ wurde in keinem der getesteten Peptide eine biologisch aktive Konformation des KDM Motivs durch die Zyklisierung bzw. Zyklisierung und Einführung der D-Aminosäuren erzeugt.

Eine korrekte räumliche Konformation der Erkennungssequenz ist eine Voraussetzung für eine biologisch aktive Struktur. Möglich ist, dass die hier verwendeten zyklischen Peptide eine zu kurze Peptidkette besitzen und in Folge der Zyklisierung die Erkennungssequenz in einer zu stark geknickten Konformation fixiert wurde. Dies würde im Verlust der biologischen Aktivität resultieren. Leider gibt es in der Literatur keine Information über die dreidimensionale Struktur des ADAM8 Proteins oder der vermuteten Erkennungssequenzen und ein gezieltes Design der Peptidliganden für diese Interaktionen ist nicht möglich.

In seiner Dissertation untersuchte Al-Riyami den Einfluss des zyklischen Peptides ( $\text{NH}_2\text{-AGELC}^{\text{S-S}}\text{RPKKDMC}^{\text{S-S}}\text{DLEE-OH}$ ) auf die Interaktion des humanen ADAM8 Proteins mit Integrinen. Das Peptid umfasst die Aminosäuresequenz der Disintegrin-Schleife des hADAM8 Proteins und ist über eine das Hexapeptid flankierende Cystinbrücke zyklisiert. In Konkurrenzexperimenten zeigte dieses Peptid bei den getesteten Konzentrationen zwischen  $100\ \mu\text{M}$  und  $500\ \mu\text{M}$  einen schwachen Einfluss auf die untersuchte Interaktion.<sup>[225]</sup> Diese Daten korrelieren mit in dieser Arbeit in Konkurrenzstudien gewonnenen Ergebnissen und deuten darauf hin, dass die Erkennungssequenz der Interaktion des hADAM8 Proteins mit Integrinen wahrscheinlich außerhalb der mutmaßlichen Erkennungssequenz lokalisiert ist.

Weitere Mutagenesestudien der Aminosäuresequenz in der Disintegrin-Schleife innerhalb des ADAM8 Proteins könnten den Einblick über die Beteiligung der entsprechenden Aminosäuren an der Erkennung der Integrine vertiefen. Zusätzlich sollten neue Peptide, die überlappende Aminosäuresequenzen der Disintegrin-Domäne enthalten synthetisiert und ihre Aktivität untersucht werden. Dies würde Informationen über die Lokalisation der Erkennungssequenz liefern.

### 6.2.8 Resumé

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die von Schlomann *et al.* veröffentlichten Studien zur Expression und homophilen Interaktion des murinen ADAM8 Proteins zu reproduzieren. Das Hauptziel war, die inhibitorischen Eigenschaften der zyklischen Peptide cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-Ser-) **23**, cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-D-Leu-Ser-) **24**, cyclo(-Lys-Asp-Lys-D-Arg-Leu-Ser-) **25** und cyclo(-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-D-Ser-) **26** auf diese Interaktion zu testen. Die mutmaßliche Erkennungssequenz KDK befindet sich in der Disintegrin-Schleife des mADAM8 Proteins. Die Bindungsstudien waren von Schlomann *et al.* mit Hilfe eines Zelladhäsionstests durchgeführt, in welchem die Adhäsion von mit mADAM8 transfizierten Astrozyten an immobilisiertes mADAM8-Fr (Fragment des ADAM8) bestimmt wurde. Das von Schlomann *et al.* beschriebene Messsystem konnte nicht reproduziert werden. Das rekombinante mADAM8-Fr konnte aufgrund schwacher Expression durch *E. coli* und niedriger Löslichkeit des Proteins nicht zufriedenstellend aufgereinigt werden.

Grundsätzlich führt die Expression von Säugerproteine in einem bakteriellen System selten zu einer nativen Form. Das bakterielle System gewährleistet keine post-translationellen Modifizierungen, die für die biologische Aktivität eines Proteins von großer Bedeutung sein können. Aus diesem Grund stellt die Expression von ADAM8 in *E. coli* ein konzeptionelles Problem dar.

In dieser Arbeit wurde eine erneute Klonierung des mADAM8-Fr Proteins durchgeführt. ADAM8 enthält viele Disulfidbrücken. Obwohl nicht zu erwarten war, dass die murinen bzw. humanen Proteine in *E. coli* korrekt gefaltet werden, wurde dennoch vor dem Hintergrund der Publikation von Schlomann *et al.* ein bakterieller Vektor ausgewählt, der eine Synthese gefolgt von Sekretion des rekombinanten Proteins in das Periplasma ermöglichen sollte. Dort sollte die Bildung nativer Disulfidbrücken in ADAM8 theoretisch möglich sein. Auch in diesem Fall wurde beobachtet, dass das rekombinante Protein zum größten Teil in unlöslicher Form (*inclusion bodies*) produziert wird. Die Verwendung des neu hergestellten, aus dem Periplasma aufgereinigten mADAM8-Fr im Zelladhäsionstest mit Astrozyten lieferte keine reproduzierbare Ergebnisse, die die homophile Interaktion dieses Proteins be-

stätigen würden. Diese Daten sind auf die nicht vorhandene biologisch aktive Faltung des mADAM8-Fr Proteins zurückzuführen. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass das bakterielle Expressionssystem eine ungeeignete Wahl war, um ein natives ADAM8 Protein zu synthetisieren und einen reproduzierbaren Bindungstest der homophiler Interaktion des mADAM8 zu etablieren. Die durch Schlomann *et al.* präsentierten Daten sind nicht reproduzierbar. Aus diesem Grund konnten die inhibitorischen Eigenschaften der Peptide **23**, **24**, **25** und **26** nicht bestimmt werden.

Die Bindungsstudien des humanen ADAM8 Proteins mit Integrinen wurden mit extrazellulärem Teil des hADAM8 Proteins untersucht. Das Protein wurde mit Hilfe eines Säugerzellsystems hergestellt und zeigte biologische Aktivität in Bindungsstudien an Integrine. Diese Studien wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die höchste Bindung wurde im Fall von Integrin  $\alpha_L\beta_2$  beobachtet. Allerdings konnten die Bindungen des humanen ADAM8 Proteins an Integrine durch die zyklischen Peptide cyclo(-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-Pro-) **27**, cyclo(-Lys-Lys-Asp-Met-D-Arg-Pro-) **28**, cyclo(-D-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-Pro-) **29**, cyclo(-Lys-Lys-Asp-Met-Arg-D-Pro-) **30** nicht inhibiert werden.

Zwei mögliche Erklärungen der nicht vorhandenen inhibitorischen Aktivität der zyklischen Peptide sind plausibel. Möglich ist, dass in keinem der zyklischen Hexapeptide **27**, **28**, **29**, **30** eine biologisch aktive Konformation der vermutlichen Erkennungssequenz KDM vorhanden ist. Eine andere Möglichkeit ist das Vorliegen der Erkennungssequenz außerhalb der untersuchten Sequenz. Um diese Hypothesen zu verifizieren, sind weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet erforderlich.

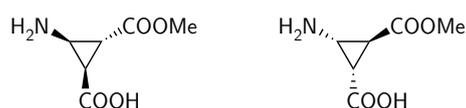
### 6.3 Einfluss von RGD-Peptiden auf die Zell-ECM-Wechselwirkung

Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix werden unter anderem über Integrine vermittelt. Das RGD-Tripeptidmotiv fungiert als eine der wichtigsten Erkennungssequenzen, welche Integrine zur Wechselwirkung mit den Liganden verwenden. Diese Interaktionen regulieren vielfältige physiologische und pathologische Prozesse. Die Entwicklung peptidischer Integrinliganden, deren Struktur von der Erkennungssequenz abgeleitet wird, führte zur Entdeckung biologisch aktiver Strukturen. Darauf basierende Substanzen ermöglichen ein Eingreifen in pathologische Prozesse und können als Therapeutika eingesetzt werden (Kap. 2.3).

Die dreidimensionale Struktur von pharmakophoren Erkennungssequenzen in einem Peptidliganden hat für die biologische Aktivität eine hohe Bedeutung. Eine Zyklisierung eines linearen Peptides kann zu einer aktiveren Struktur führen, da die Flexibilität des Peptidrückgrats eingeschränkt wird. Die Konformation einer Erkennungssequenz kann durch

bestimmte sekundärstrukturinduzierende Bausteine beeinflusst werden. Besonders erfolgreich ist die Verwendung von D- und  $\beta$ -Aminosäuren, die diskreten Konformationen wie  $\beta$ - und  $\gamma$ -turns in Peptiden stabilisieren (Kap. 2.3).

Bei der Suche nach neuen aktiven Peptidliganden für Integrine entwickelte die Arbeitsgruppe Kessler das zyklische Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) als einen effektiven Liganden für Integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Für diese Verbindung wurde in Zelladhäsionstest mit humanen Zellen ein  $IC_{50}$ -Wert im submikromolaren Bereich bestimmt; sie fungiert als Leitstruktur zur Entwicklung neuer RGD-Peptide. Die Methylierung des Stickstoffatoms der Peptidbindung zwischen D-Phe und Val in diesem Peptid führte zu dem neuen Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-<sup>N-Me</sup>Val-), das höhere Aktivität und Selektivität an Integrin  $\alpha_v\beta_3$  aufweist und zurzeit unter dem Name Cilengitide<sup>®</sup> als Therapeutikum gegen Leukämie, Hirntumor und Kaposi-Sarkom in klinischen Tests der Phase II untersucht wird.<sup>[20,123,135]</sup>



**Abbildung 6.19:** Schematische Darstellung der Struktur von (+)<sup>β</sup>Acc (links) und (-)<sup>β</sup>Acc (rechts).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit der Einbau der konformationell eingeschränkten  $\beta$ -Aminosäure <sup>β</sup>Acc in die Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+)<sup>β</sup>Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-)<sup>β</sup>Acc-Val-) **34** die Affinität und Selektivität dieser Peptide an Integrinen beeinflusst (Abb. 6.19).

<sup>β</sup>Acc mit einem rigiden Cyclopropanring war zuvor in Neuropeptid-Analoga zur Einschränkung der Flexibilität des Peptidrückgrats eingebaut worden und führte zur Erhöhung der Affinität zu dem Neurorezeptor-Subtyp  $\gamma_1$  (Kap. 2.3).<sup>[134]</sup>

Der Einfluss von zyklischen RGD-Peptiden auf die Adhäsion der Integrine präsentierenden Zellen an natürliche Liganden wurde in Zelladhäsionstests untersucht (Kap. 6.3.2 und Kap. 6.3.3). Zusätzlich wurden Kompetitionsexperimente mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz unter Anwendung von Membranextrakten aus WM115 Zellen und Vitronectin als Proteinligand durchgeführt (Kap. 6.3.4).

Für die Zelladhäsionstests wurden zwei humane Modellzelllinien WM115 und  $\kappa 562$  ausgewählt, die endogen Integrine auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die Analyse der Integrinexpression durch WM115 Zellen ist in Kapitel 6.3.1 dargestellt. Die Zelllinie  $\kappa 562$  präsentiert Integrin  $\alpha_5\beta_1$  und wurde als Referenz zur Bestimmung der Selektivität der untersuchten Peptide verwendet. Die Integrinexpression durch diese Zelllinie wurde in Rahmen der Dissertation von Zimmermann untersucht.<sup>[52]</sup> Integrin  $\alpha_5\beta_1$  spielt eine wichtige Rolle hauptsächlich bei Immunkrankheiten wie z. B. Asthma und rheumatische Arthritis.<sup>[53]</sup> Da jedes Integrin seine biologische Funktion durch spezifische Interaktionen mit seinen Liganden reguliert, stellt das Auffinden selektiver Integrinliganden, die die Kontrolle bestimmter

pathologischer Prozessen ermöglichen würden, eine große Herausforderung dar.

Parallel zu den Peptiden mit inkorporierter  $\beta$ Acc wurde das Hexapeptid cyclo(-Arg-Gly- $\beta$ Glu-D-Phe-Val-) **35** mit  $\beta$ Glu und D-Phenylalanin untersucht. Die Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $\beta$ Acc-Val-) **33**, cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $\beta$ Acc-Val-) **34** und cyclo(-Arg-Gly- $\beta$ Glu-D-Phe-Val-) **35** wurden im Zelladhäsionstest unter Anwendung der Zelllinien WM115 und  $\kappa$ 562 mit Vitronectin bzw. Fibronectin als Proteinligand untersucht (Tab. 6.1). Als Referenzen wurden die aus der Literatur bekannten Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) **32** verwendet. Das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** zeigt eine erhöhte Affinität zu Integrins  $\alpha_v\beta_3$  während das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) **32** weist eine erhöhte Affinität zu Integrins  $\alpha_5\beta_1$  auf. [52,53,137,230]

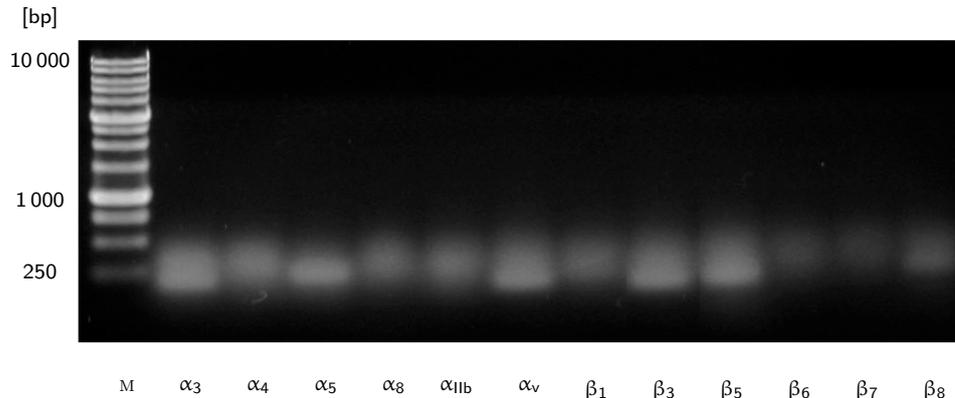
### 6.3.1 Analyse der Integrinexpression von WM115 Zellen

Die Analyse der Integrinexpression von WM115 Zellen wurde analog zu den Ramos-Zellen durchgeführt und das genaue Verfahren ist ausführlich in Kapitel 6.1.1 dargestellt. In Fall von WM115 Zellen wurde ebenfalls eine Expressionsanalyse sowohl auf mRNA-Niveau als auch auf Protein-Niveau durchgeführt.

#### 6.3.1.1 Untersuchung der mRNA Transkription in WM115 Zellen

Die Gesamt-RNA wurde wie im Fall der Ramos-Zellen unter Anwendung des Kits *NucleoSpin<sup>®</sup> RNAII* (Macherey-Nagel) isoliert und spektrophotometrisch quantifiziert. Die Ausbeute der RNA Isolierung für die WM115 Zellen lag bei 20.0  $\mu$ g pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen. Zur Analyse der Integrinexpression in WM115 Zellen wurde eine *one-step* RT-PCR durchgeführt, in welcher alle in Tabelle 6.2 (Seite 101) aufgelisteten Integrinuntereinheiten analysiert worden sind.

Nach der RT-PCR wurden die hergestellten cDNA Fragmente auf einem Agarosegel analysiert (Abb. 6.20). Die starke Transkription zu mRNA der Integrinuntereinheiten  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_5$  ist in der Abbildung 6.20 zu erkennen. Die Transkription zu mRNA der Integrine  $\alpha_8$ ,  $\alpha_{IIb}$  und  $\beta_1$  ist schwächer ausgeprägt. Die entsprechenden Banden für die Integrinuntereinheiten  $\beta_6$ ,  $\beta_7$  und  $\beta_8$  sind fast nicht zu erkennen. Alle Banden der cDNA Fragmente sind sehr unscharf, was die Analyse der Ergebnisse erschwert. Die detektierten cDNA Fragmente befinden sich jedoch im erwarteten Bereich. Mehrere Faktoren können zu unscharfen der cDNA-Banden in einem Agarosegel nach *one-step* RT-PCR führen. Unter anderem kommen zu hohe Konzentration der RNA, der Enzyme und der Primer, wie auch nicht optimale Bedingungen der PCR oder Degradation der Primer als Quelle des



**Abbildung 6.20:** Analyse der mRNA in WM115 Zellen. Die Elektrophorese der cDNA Fragmente in einem 2% Agarosegel nach einer RT-PCR.

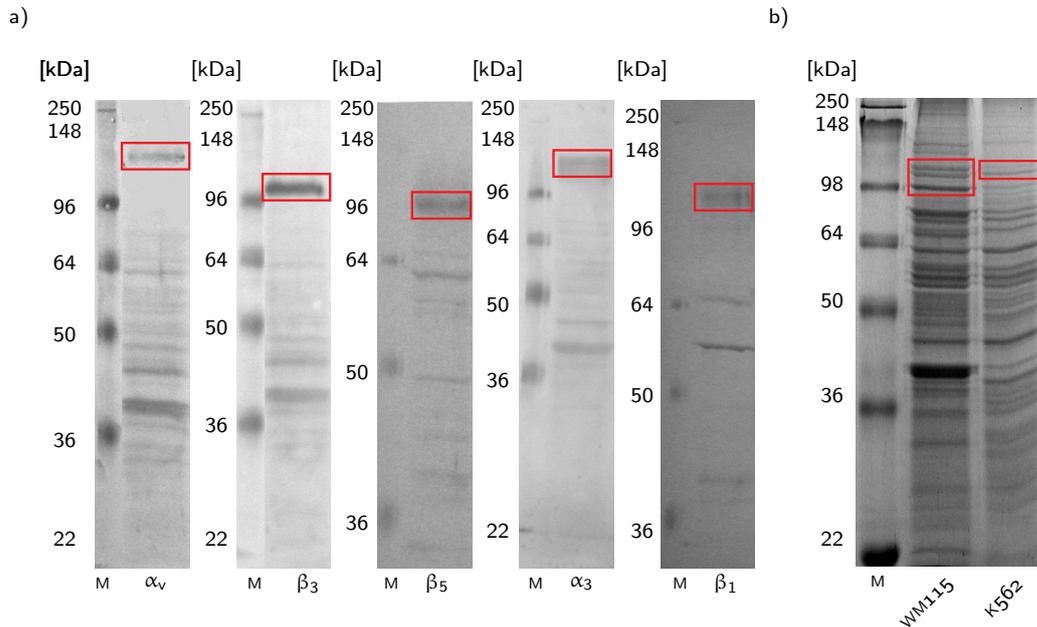
Schmierens in Frage. Einige Parameter (Temperatur der Primer-Hybridisierung an cDNA und die Konzentration der RNA) wurden variiert, führten aber zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Da sich die Interpretation der Ergebnisse der RNA Analyse als schwierig erwies, wurde die Expression der Integrinuntereinheiten auf Proteinniveau im Western Blotting getestet.

### 6.3.1.2 Untersuchung der Integrine auf der Oberfläche von WM115 Zellen

Die Untersuchung der Integrine auf der Zelloberfläche von WM115 Zellen wurde analog der Analyse der Ramos-Zellen durchgeführt (Kap. 6.1.1). Membranextrakte wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel zuerst aufgetrennt und danach durch Western Blotting untersucht. In diesem Fall wurden die Membranextrakte aus Zellen verwendet, die ebenfalls nach der Methode von Belkin *et al.* präpariert wurden.<sup>[188]</sup> Die Expressionskontrolle für die WM115 Zellen wurde im Western Blotting mit spezifischen Antikörpern gegen Integrine  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\alpha_{11b}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_5$  und  $\beta_7$  durchgeführt.

Die Expression der Integrinuntereinheiten  $\alpha_3$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_5$  wurde nachgewiesen. Die Abbildung 6.21 (a) zeigt die Ergebnisse der Western Blotting Analyse für die detektierten Integrinuntereinheiten. Die detektierten Banden zeigen die erwartete Größe für die jeweilige Integrinuntereinheit ( $\alpha_v$  – 130 kDa,  $\beta_3$  – 110 kDa,  $\beta_5$  – 100 kDa,  $\alpha_3$  – 130 kDa,  $\beta_1$  – 130 kDa).<sup>[208]</sup> Die anderen detektierten Banden stammen aus der unspezifischen Erkennung durch die verwendeten polyklonalen Antikörper. Die Kombination der detektierten Integrinuntereinheiten kann zu folgenden Oberflächenrezeptoren führen:  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ .

Die Abbildung 6.21 (b) zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der untersuchten Membranextrakte von WM115 und K562 Zellen. Die durch Western Blotting analysierten

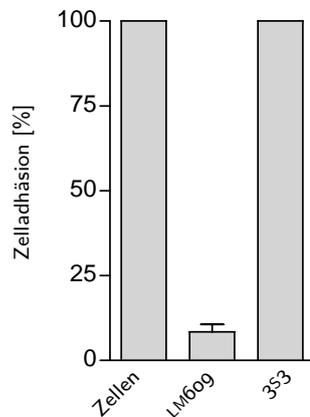


**Abbildung 6.21:** a) Immunchemische Analyse der Integrinexpression auf WM115 Zellen mit Antikörper: anti- $\alpha_3$ , anti- $\alpha_v$ , anti- $\beta_1$ , anti- $\beta_3$ , anti- $\beta_5$ . b) SDS-PAGE der Membranextrakte aus humanen Zelllinien hergestellt nach der Methode von Belkin *et al.*. Die detektierten Integrinuntereinheiten sind mit roten Rahmen markiert.

Integrinuntereinheiten wurden durch Rahmen markiert. In den Membranextrakten aus WM115 Zellen wurden Banden bei 130 kDa, 110 kDa und 100 kDa identifiziert, die den Integrinuntereinheiten  $\alpha_v$  bzw.  $\alpha_3$  oder  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_5$  zu zuordnen sind. Die Membranextrakte aus K562 Zellen wurden durch Zimmermann analysiert und enthalten Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .<sup>[52]</sup>

### 6.3.2 Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Adhäsion von WM115 Zellen an Vitronectin

Die Aktivität der Peptide wurde zuerst in einem Zelladhäsionstest mit WM115 Zellen und Vitronectin als Proteinligand bestimmt. Von den auf WM115 Zellen präsentierten Integrinen kommen die Integrine  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  als Vitronectinrezeptoren in Frage. Die Interaktion dieser Integrine mit Vitronectin erfolgt über RGD-Tripeptid, das auf Oberfläche des Vitronectins lokalisiert ist.<sup>[55,72,231]</sup>



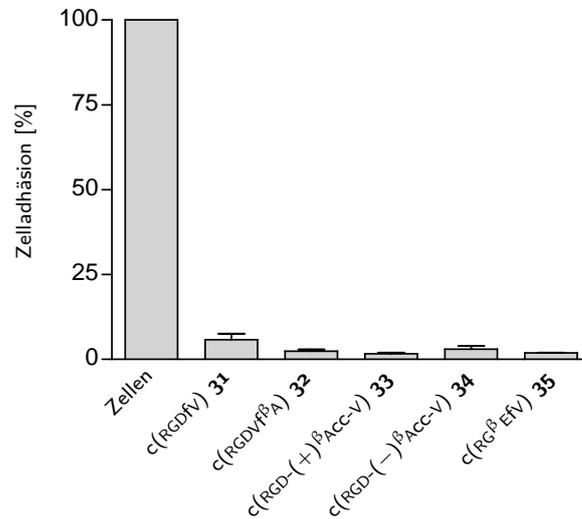
**Abbildung 6.22:** Einfluss der spezifischen Antikörper LM609 gegen Integrin  $\alpha_v\beta_3$  und 3S3 gegen Integrin  $\beta_1$  auf die Wechselwirkung der WM115 Zellen mit Vitronectin.

Zuerst wurde die optimale Konzentration des zu immobilisierenden Vitronectins bestimmt. Vitronectin wurde in Konzentrationen von  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und die Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin wurde bestimmt. Die Zellen zeigten sehr hohe, konzentrationsabhängige Affinität zu dem immobilisierten Vitronectin. Bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  war die Adhäsion der Zellen stark ausgeprägt, so dass diese Konzentration für weitere Tests verwendet wurde.

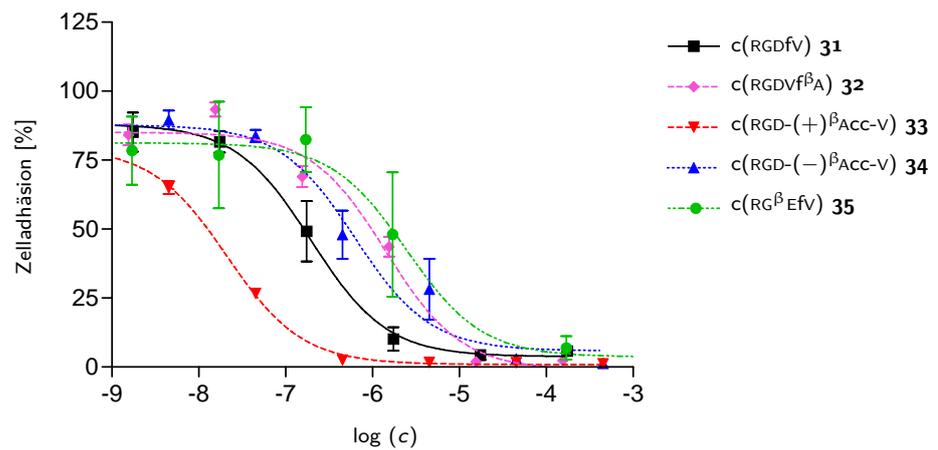
In einem Zelladhäsionstest mit Einsatz von spezifischen Antikörpern wurde in Konkurrenz gezeigt, dass die Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin hauptsächlich durch Integrin  $\alpha_v\beta_3$  vermittelt wird. Der monoklonale Antikörper LM609 gegen Integrin  $\alpha_v\beta_3$  inhibierte die Adhäsion der WM115 Zellen zu

92%. Der Antikörper 3S3 gegen Integrine  $\beta_1$  zeigte keinen Effekt (Abb. 6.22).

Um die inhibitorischen Eigenschaften der Peptide zu bestimmen, wurden die WM115 Zellen mit Peptidlösungen (Peptide **31-35**) einer Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $155 \mu\text{M}$  für cyclo(-Arg-Gly- $\beta$ Glu-D-Phe-Val-) **35** bis  $180 \mu\text{M}$  für cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $\beta$ Acc-Val-) **33**) inkubiert. Anschließend wurde der Test wie vorher beschrieben durchgeführt. Abbildung 6.23 zeigt den Einfluss der Peptide bei der Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Alle Peptide inhibieren bei dieser Konzentration die Interaktion der Integrine mit Vitronectin beinahe zu 100%. Als Referenzprobe (100%) wurde die Adhäsion der Zellen an Vitronectin ohne Anwesenheit der Peptide bestimmt. Um die biologische Aktivität der Peptide zu evaluieren, wurden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Peptide bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Peptide **31-35** in einer Konzentrationsreihe in einen Zelladhäsionstest eingesetzt. Die Resultate der Tests sind in Abbildung 6.24 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Tests sind ausführlich im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Zelladhäsionstests mit K562 Zellen diskutiert (Kap. 6.3.3).



**Abbildung 6.23:** Einfluss der zyklischen RGD-Peptide auf die Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin bei einer Peptidkonzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $155 \mu\text{M}$  für  $c(\text{RG}^{\beta}\text{Efv})$  **35** bis  $180 \mu\text{M}$  für  $c(\text{RGD-(+)}^{\beta}\text{Acc-V})$  **33**).

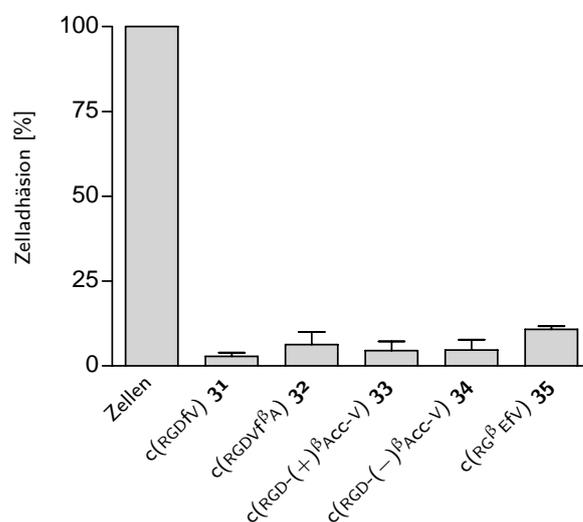


**Abbildung 6.24:** Einfluss der zyklischen RGD-Peptide auf die Bindung der WM115 Zellen an Vitronectin.

### 6.3.3 Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Adhäsion von $\kappa 562$ Zellen an Fibronectin

Die inhibitorischen Eigenschaften der Peptide **33**, **34**, **35** wurden in einem Zelladhäsions-test mit  $\kappa 562$  Zellen und Fibronectin als Proteinligand bestimmt. Als Referenzen dienten wieder die Peptide **31** und **32**. Fibronectin ist ein klassischer Ligand für Integrin  $\alpha_5\beta_1$ , welches auf der Zelloberfläche der  $\kappa 562$  Zellen exprimiert wird.<sup>[53]</sup>

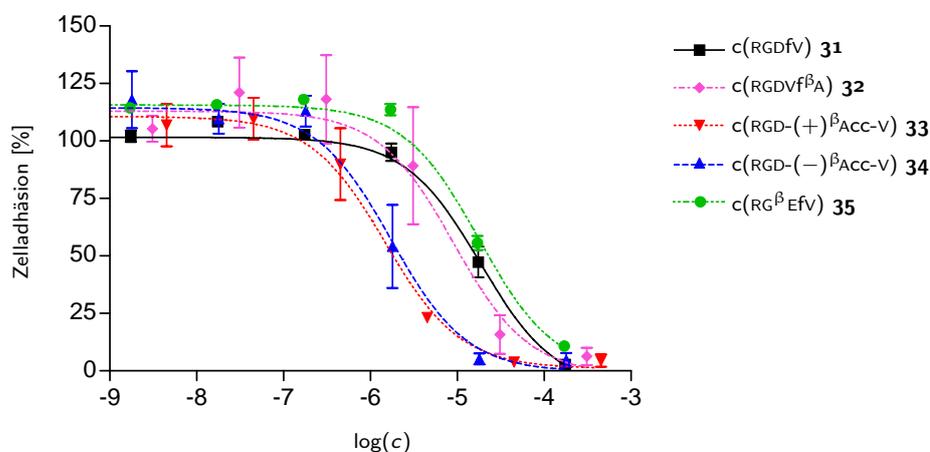
Die Peptide wurden in einer Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $155 \mu\text{M}$  für cyclo(-Arg-Gly- $\beta$ Glu-D-Phe-Val-) **35** bis  $180 \mu\text{M}$  für cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $\beta$ Acc-Val-) **33**) getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 6.25 dargestellt. Ebenfalls wurde die  $\text{IC}_{50}$ -



**Abbildung 6.25:** Einfluss der zyklischen RGD-Peptide auf die Adhäsion der  $\kappa 562$  Zellen an Fibronectin bei einer Peptidkonzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $155 \mu\text{M}$  für  $c(\text{RG}^\beta\text{Efv})$  **35** bis  $180 \mu\text{M}$  für  $c(\text{RGD}-(+)\beta\text{Acc-V})$  **33**).

Werte analog zu Tests mit WM115 Zellen und Vitronectin bestimmt. Die Resultate sind in Abbildung 6.26 gezeigt.

Die Zelladhäsionstests mit WM115 und  $\kappa 562$  zeigen, dass die Peptide **33**, **34** und **35** bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  die Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin und die Adhäsion der  $\kappa 562$  Zellen an Fibronectin inhibieren (Abb. 6.23 und 6.25). Die Referenzpeptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) **32** inhibieren ebenfalls bei dieser Konzentration die beiden Wechselwirkungen. Genauere Aussage über die biologische Aktivität der Peptide liefern  $\text{IC}_{50}$ -Werte (Tab. 6.5). Das Literaturpeptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** inhibiert die durch Integrin  $\alpha_v\beta_3$  vermittelte Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0.20 \mu\text{M}$ . Dies bestä-



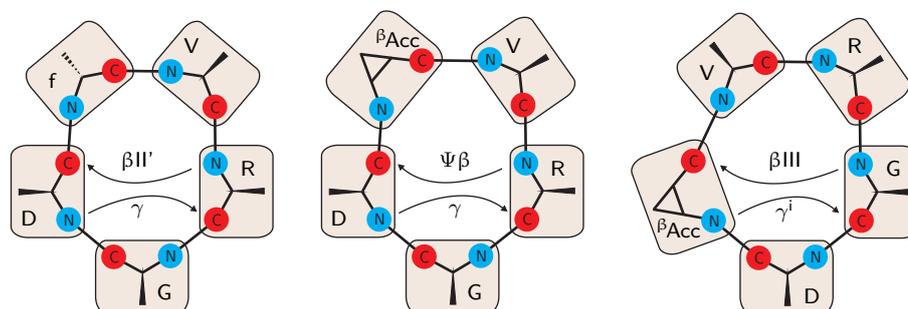
**Abbildung 6.26:** Einfluss der zyklischen RGD-Peptide auf die Bindung der K562 Zellen an Fibronectin.

**Tabelle 6.5:**  $IC_{50}$ -Werte der zyklischen Peptide bestimmt im Zelladhäsionstest mit WM115 und K562 Zellen.

Peptid	WM115, $\alpha_v\beta_3$ $IC_{50} (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]	K562, $\alpha_5\beta_1$ $IC_{50} (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]
cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) <b>31</b>	0.20 (0.06)	18.50 (6.40)
cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $^{\beta}$ Ala-) <b>32</b>	1.42 (0.40)	9.09 (5.30)
cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) <b>33</b>	0.02 (0.002)	1.48 (0.50)
cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $^{\beta}$ Acc-Val-) <b>34</b>	0.63 (0.23)	1.74 (0.70)
cyclo(-Arg-Gly- $^{\beta}$ Glu-D-Phe-Val-) <b>35</b>	2.56 (0.33)	17.8 (0.40)

tigt die aus der Literatur bekannte Inhibierungseigenschaften dieses Peptides, die in Zelladhäsionstests mit anderen Zelllinien, die das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  präsentieren, bestimmt wurden ( $IC_{50}$ -Werte von 0.1  $\mu\text{M}$  und 0.2  $\mu\text{M}$ ).<sup>[120]</sup> Das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) **33** zeigt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0.02  $\mu\text{M}$  eine zehnfach höhere Affinität zu dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  im Vergleich zu cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** ( $IC_{50}$ -Wert von 0.20  $\mu\text{M}$ ). Das zweite Diastereomer cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $^{\beta}$ Acc-Val-) **34** ist mit  $IC_{50}$ -Wert von 0.63  $\mu\text{M}$  dreifach weniger aktiv als das Referenzpeptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31**. Die Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $^{\beta}$ Ala-) **32** und cyclo(-Arg-Gly- $^{\beta}$ Glu-D-Phe-Val-) **35** weisen mit  $IC_{50}$ -Werten von 1.42 bzw. 2.56  $\mu\text{M}$  eher einen moderaten Einfluss auf diese Wechselwirkung auf.

Die durch Integrin  $\alpha_5\beta_1$  vermittelte Adhäsion der K562 Zellen an Fibronectin wurde durch die Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $^{\beta}$ Acc-



**Abbildung 6.27:** Schematische Darstellung der Strukturen der Peptide c(RGDfv) **31** (links), c(RGD-(+) $\beta$ Acc-V) **33** (mittig), c(RGD-(-) $\beta$ Acc-V) **34** (rechts).

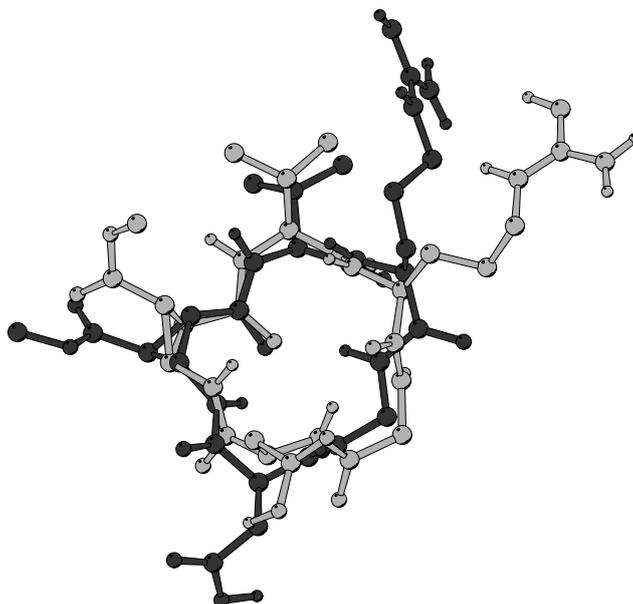
Val-) **34** annähernd identisch mit  $IC_{50}$ -Werten von  $1.48 \mu M$  bzw.  $1.74 \mu M$  inhibiert. Das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) **32** zeigt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $9.09 \mu M$  eine vierfach schwächere Affinität zu dem untersuchten Ligand als die Peptide **33** und **34**. Das Referenzpeptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** ist weniger affin als Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ Ala-) **32**. Diese Tendenz stimmt mit Literaturdaten überein.<sup>[52,53]</sup>

Die Einführung von  $\beta$ Acc ((+/-) $\beta$ -Aminocyclopropan- $\alpha,\gamma$ -dicarboxy- $\gamma$ -monomethylester) in die zyklischen Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $\beta$ Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-(-) $\beta$ Acc-Val-) **34** führte zur signifikanten Erhöhung der Affinität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , nicht aber zu Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .

Die hohe Affinität des Peptides cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $\beta$ Acc-Val-) **33** und die Unterschiede in der Affinität des zweiten Diastereomers cyclo(-Arg-Gly-Asp-(-) $\beta$ Acc-Val-) **34** können aufgrund der Peptidstruktur diskutiert werden.

Der aus der Literatur bekannte Inhibitor des Integrins  $\alpha_v\beta_3$ , Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** besitzt in seiner Struktur einen  $\beta_{II}'$ -turn mit D-Phe in  $i+1$  Position und einen  $\gamma$ -turn mit zentral positioniertem Gly.<sup>[20,120]</sup> Die durch Gauss durchgeführte Strukturanalyse der Peptide **33** und **34** hat gezeigt, dass in der Struktur von cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $\beta$ Acc-Val-) **33** ein  $\Psi\beta$ -turn zwischen Asp und Arg mit (+)- $\beta$ Acc in  $i+1$  Position, und ein  $\gamma$ -turn mit Gly in zentraler Position zu finden ist (Abb. 6.27).<sup>[232]</sup> Damit zeigt das Peptid **33** eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31**.

Die Tripeptidsequenz RGD in den  $\alpha_v\beta_3$  selektiven Strukturen ist sehr stark geknickt und der Abstand zwischen  $C^\alpha$ -Atomen und  $C^\beta$ -Atomen von Arg und Asp ist besonders klein. Für das Referenzpeptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** ist der Abstand zwischen den



**Abbildung 6.28:** Überlagerung der Strukturen der Peptide  $c(\text{RGD-(+)}^\beta\text{Acc-V})$  **33** (grau) und  $c(\text{RGD-(-)}^\beta\text{Acc-V})$  **34** (schwarz).<sup>[232]</sup>

$\text{C}^\beta$ -Atomen von 668 pm.<sup>[20]</sup> Im Peptid  $\text{cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+)}^\beta\text{Acc-Val-)}$  **33** beträgt der Abstand zwischen den  $\text{C}^\beta$ -Atomen von Asp und Arg 706 pm.<sup>[232]</sup>

Im Peptid  $\text{cyclo(-Arg-Gly-Asp-(-)}^\beta\text{Acc-Val-)}$  **34** ist ein  $\beta\text{III-turn}$  mit Val in der  $i+1$  Position und ein  $\gamma^i\text{-turn}$  mit zentral positioniertem Asp zu finden (Abb. 6.27). Der Abstand zwischen  $\text{C}^\beta$ -Atomen von Asp und Arg beträgt 826 pm (Abb. 6.28). Damit befindet sich die RGD Sequenz in eher gestreckten Konformation, was zu einer Minderung der Affinität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  führt. Im Vergleich zu Peptid **34** kann das in der Literatur beschriebene Peptid  $\text{cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-)}$  erwähnt werden, das eine ähnliche Struktur besitzt und ebenfalls eine niedrigere biologische Aktivität als Peptid  $\text{cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)}$  aufweist. In Peptid  $\text{cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-)}$  befindet sich Asp in  $i+1$  Position eines  $\gamma\text{-turns}$  und D-Val in  $i+1$  Position eines  $\beta\text{II'-turns}$ . Der Abstand zwischen den  $\text{C}^\beta$ -Atomen von Asp und Arg in diesem Peptid beträgt 905 pm und RGD Motiv ist somit in gestreckter Konformation.<sup>[124]</sup> Dies erklärt warum Peptid  $\text{cyclo(-Arg-Gly-Asp-(-)}^\beta\text{Acc-Val-)}$  **34** eine niedrigere Affinität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  aufweist.<sup>[20]</sup>

Alle Daten zeigen, dass das Peptid  $\text{cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+)}^\beta\text{Acc-Val-)}$  **33** ein neuer selektiver Inhibitor des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  ist und mit  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0.02 \mu\text{M}$  eine höhere Aktivität als bislang bekannter Peptidligand  $\text{cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)}$  **31** aufweist.

### 6.3.4 SPR-Experimente

Um die inhibitorischen Eigenschaften der zyklischen RGD-Peptiden in Konkurrenzexperimenten mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz zu bestätigen, wurden zuerst Bindungsstudien der Wechselwirkung humaner Integrine mit Vitronectin etabliert. Zuerst wurde versucht die Bindungsstudien mit lebenden WM115 Zellen durchzuführen (Kap. 6.3.4.1). Da es sich als schwierig erwies, wurden im weiteren Bindungsstudien mit Membranextrakten aus diesen Zellen etabliert (Kap. 6.3.4.2). Anschließend wurden Konkurrenzexperimente mit zyklischen RGD-Peptiden durchgeführt, die in Kapitel 6.3.4.3 dargestellt sind.

#### 6.3.4.1 Experimente mit lebenden WM115 Zellen

Mit Hilfe der SPR Technologie können Viren, Bakterien und eukaryontische Zellen über entsprechende Proteine an die Chipoberfläche binden. Eine Begrenzung ist aber der maximale Messbereich von 0.3  $\mu\text{m}$ . Jenseits von 0.3  $\mu\text{m}$  hat die Anlagerung von Molekülen keinen Einfluss mehr auf das Signal. Eukaryontische Zellen haben einen Durchmesser von 10-100  $\mu\text{m}$ , Bakterien von 1-10  $\mu\text{m}$ , Lysosomen von 0.2-2  $\mu\text{m}$ . Bei runden Lysosomen und Zellen kommt noch dazu, dass sie nur einen kleinen Teil der Sensoroberfläche bedecken, was das Signal weiter verringert.<sup>[233]</sup>

Die andere Begrenzung ist der Querschnitt der Messzelle, der lediglich 0.015  $\text{mm}^2$  beträgt.<sup>[234]</sup> Verwendung der Zellen mit größerem Querschnitt führt zur unerwarteten Effekten und macht die Messung mit lebenden Zellen unmöglich.

In Experimenten mit lebenden WM115 Zellen wurde versucht, Bindungsstudien der Interaktion des immobilisierten Vitronectins mit Integrinen, die auf der Zelloberfläche der WM115 Zellen vorkommen, zu etablieren. Das Ziel war, die inhibitorischen Eigenschaften der Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) <sup>$\beta$</sup> Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) <sup>$\beta$</sup> Acc-Val-) **34** zu bestätigen. Die biologische Aktivität der Peptide **33** und **34** wurde zuvor in Zelladhäsionstests mit WM115 Zellen und Vitronectin nachgewiesen.

#### Immobilisierung des Vitronectins

Das humane Vitronectin wurde über eine Aminokupplung auf der Oberfläche eines CM5 Chips immobilisiert. Um optimale Bedingungen für die Immobilisierung des Vitronectins zu finden, wurde zuerst ein pH-*scouting* durchgeführt. In diesem Experiment wird der pH Wert des Puffer ausgewählt, bei welchem die elektrostatische Attraktion des zu immobilisierenden Proteins an die negativ geladene Oberfläche des Sensorchips erfolgt. Die Protein-Lösung wird ohne vorherige Aktivierung der Carboxylgruppen des CM5-Chips über die Chipoberfläche eines CM5-Chip geleitet. Wird ein Anstieg des Resonanzsignals beob-

achtet, so sind die Bedingungen für die Immobilisierung passend ausgewählt.

Der theoretisch berechnete pI Wert des humanen Vitronectins beträgt 5.47 (Protein-datenbank: SWISS-PROT). Das Vitronectin wurde in unterschiedlichen Puffern (10 mM Acetat-Puffer pH 4.5, 5.0, 5.5, 5 mM Maleat-Puffer pH 5.0, 10 mM Phosphat-Puffer pH 7.4) injiziert. Als Laufpuffer diente HBS-N Puffer. Ein Anstieg der Kurve wurde im Fall von Acetat-Puffer (pH 5.0, 5.5) und Maleat-Puffer (pH 5.0) beobachtet. Die besten Ergebnisse wurden mit Maleat-Puffer (pH 5.0) erhalten. Die relativ kleinen Anstiege der Kurven (bis zu 200 RU) während des pH-*scouting* sind auf die niedrige Vitronectinkonzentration in der Lösung ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) zurückzuführen.

Die Immobilisierung wurde mit NHS/EDC Strategie bei einer Flussgeschwindigkeit von  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  mit HBS-N als Laufpuffer durchgeführt. Vitronectin wurde auf der Messzelle immobilisiert, die Referenzzelle wurde demgegenüber nur aktiviert und deaktiviert. Es wurde ein Immobilisierungsniveau von 280 RU erreicht.

### Bindungsstudien mit WM115 Zellen

Die aus der Zellkultur gewonnenen Zellen wurden in Puck's Salzlösung bzw. HBS-N resuspendiert. Beiden Lösungen wurde zusätzlich 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM  $\text{MnCl}_2$  zugefügt. Die Anwesenheit der  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ -Kationen gewährleistet biologische Aktivität der Integrine.<sup>[30,235]</sup> Nach der Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension bei RT äquilibriert und in unterschiedlichen Verdünnungen mit Laufpuffer über die Sensoroberfläche geleitet. Während der Detektion der Bindung der Zellen an immobilisiertes Vitronectin wurden unerwartete sehr hohe Sprünge der Basislinie beobachtet. Das beobachtete Phänomen ist auf die Größe der Zellen zurückzuführen.

Aufgrund der Beobachtungen lässt sich sagen, dass die Größe der WM115 Zellen ein limitierender Faktor ist und Bindungsexperimente mit lebenden WM115 Zellen mit Hilfe der SPR Technologie nicht möglich sind. Im Weiteren wurden Experimente mit Membranextrakten aus WM115 Zellen etabliert, die zufriedenstellende Ergebnisse lieferten.

#### 6.3.4.2 Bindung des Membranextraktes aus WM115 Zellen an Vitronectin

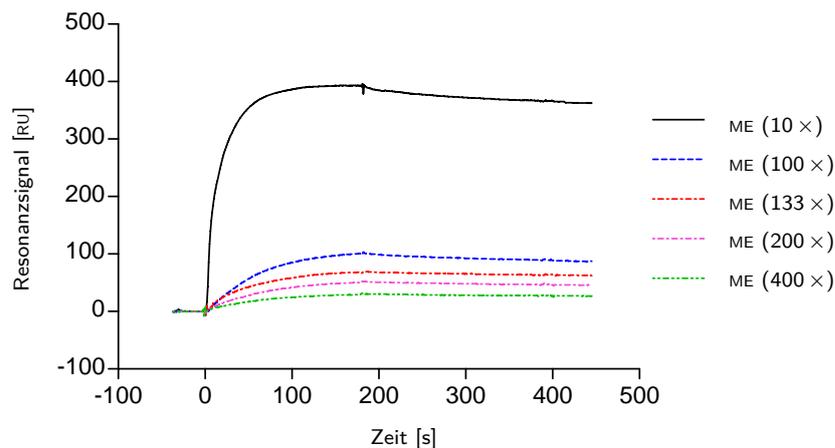
Die SPR Experimente ermöglichen eine Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Reaktionspartnern. Ein Reaktionspartner wird auf Oberfläche immobilisiert, das zweite befindet sich im Puffer, wobei es sich dabei auch um ein Proteingemisch handeln kann. Die Interaktion der im Proteingemisch vorhandenen Integrine mit dem immobilisierten Vitronectin wurde in diesem Experiment untersucht. Als Quelle der Integrine dienten hier Membranextrakte (ME) aus WM115 Zellen. Die Membranextrakte wurden nach den Methoden von

Belkin *et al.* oder Pytela *et al.* hergestellt und hinsichtlich der Anwesenheit der Integrine immunchemisch untersucht (Kap. 6.1.1.2 und 6.3.1).<sup>[188,189]</sup>

Die Bindungsexperimente wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  in ME Puffer durchgeführt. Der ME Puffer besitzt eine ähnliche Zusammensetzung wie Puffer B, der zur Herstellung der Membranextrakte nach der Methode von Belkin *et al.* verwendet wurde.<sup>[188]</sup> Der Unterschied besteht nur in der Detergentskonzentration (0.125% (*v/v*) anstatt 0.5% (*v/v*) Triton X-100). Diese wurde reduziert, um potentielle unspezifische Bindungen des Detergens an Sensoroberfläche (Dextran) zu reduzieren. Beide Puffer enthalten 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM  $\text{MnCl}_2$ .

Der bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrte Membranextrakt aus WM115 Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit ME Puffer verdünnt, auf Raumtemperatur äquilibriert und untersucht. Nach der Assoziations- und der Dissoziationsphase wurde die Chipoberfläche mit Ethanolaminlösung (pH 8.5) und 5%  $\beta$ -OG-Lösung regeneriert.

Abbildung 6.29 zeigt die Ergebnisse der Bindung des ME nach Belkin *et al.* an das immobilisierte Vitronectin. Bei der höchsten Konzentration des ME wird ein Gleichgewichtszu-



**Abbildung 6.29:** Bindung des Membranextrakts (Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -haltig) aus WM115 Zellen an humanes Vitronectin. Unterschiedliche Verdünnungen des Membranextraktes hergestellt nach der Methode von Belkin *et al.* wurden untersucht.<sup>[188]</sup> Der Verdünnungsfaktor ist in der Abbildung gezeigt. Die Gesamt-Proteinkonzentration in dem Membranextrakt, ermittelt mit Hilfe eines BCA Tests, betrug  $876 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

stand beobachtet und der maximale Resonanz-Wert beträgt 390 RU. Die gemessenen Werte sind im Bereich der höheren Verdünnungen konzentrationsabhängig. Die Bindungskurven zeichnen sich durch eine sehr langsame Dissoziation aus. Dies deutet auf die Bildung eines sehr starken Integrin-Vitronectin-Komplexes hin. Die früher erhaltenen Ergebnisse der Inhibition der Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin durch spezifische Antikörper zeig-

ten, dass in die hier untersuchte Wechselwirkung hauptsächlich Integrin  $\alpha_v\beta_3$  involviert ist (Kap. 6.3.2).

Ein Versuch der Detektion der Bindung der Integrine an Vitronectin unter Verwendung von ME aus WM115 Zellen, hergestellt nach der Methode von Pytela *et al.*, war nicht erfolgreich. Starke unspezifische Bindungen wurden in der Referenzzelle beobachtet. Wahrscheinlich wurden diese durch eine Wechselwirkung des Detergens ( $\beta$ -OG) mit der Sensor-Matrix verursacht. Eine Detektion der Integrin-Vitronectin-Bindung in diesem System war nicht möglich. Abschließend lässt sich sagen, dass die Verwendung der Membranextrakte zur Untersuchung der Protein-Protein Wechselwirkung nützlich ist und dass Triton X-100 als Detergens in dem eingesetzten SPR-Messsystem mit dem CM5-Chip kompatibel ist.

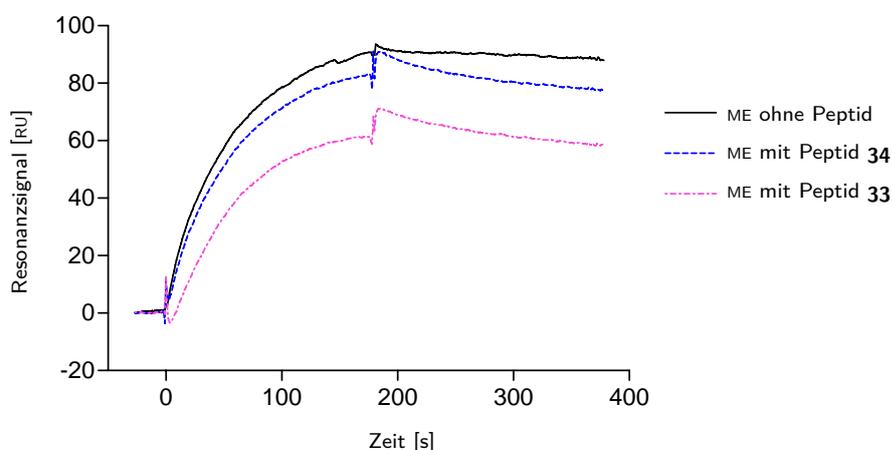
#### 6.3.4.3 Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Bindung der Integrine an Vitronectin

In Konkurrenzexperimenten wurden die inhibitorischen Eigenschaften der zyklischen Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $^{\beta}$ Acc-Val-) **34** auf die Interaktion von Vitronectin mit den Integrinen untersucht. Nach erfolgreicher Detektion der Bindung der Integrine aus Membranextrakten an Vitronectin (Kap. 6.3.4.2) wurden die Membranextrakte aus WM115 Zellen in Konkurrenzexperimenten mit Integrinen und RGD-Peptiden eingesetzt.

Die aufgetauten Membranextrakte wurden mit dem Bindungspuffer verdünnt (Gesamt-Proteinkonzentration in ME betrug  $0.87 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und mit den Peptid-Lösungen versetzt. Die Peptid-Endkonzentration betrug  $360 \mu\text{M}$ . Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden 20 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, auf RT äquilibriert und untersucht. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 6.30 dargestellt.

Die Inkubierung der Membranextrakte mit den Peptiden cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $^{\beta}$ Acc-Val-) **34** resultierte in einer Minderung der Resonanz-Antwort. Das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) **33** zeigte höhere inhibitorische Aktivität als **34** cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $^{\beta}$ Acc-Val-). Dieses Ergebnis stimmt mit den entsprechenden Zelladhäsionstest überein (Kap. 6.3, Tab. 6.5). Die Dissoziationsphasen dieser Bindungskurven unterscheiden sich von der Dissoziationsphase der Bindungskurve ohne Peptid. Der Abfall der Kurve für Peptid **33** und **34** ist schneller als in der entsprechenden Bindungskurve für das Membranextrakt ohne Peptid.

Bei der Durchführung der SPR-Bindungsstudien mit einem Proteingemisch werden häufig neben spezifischen auch unspezifische Bindungen detektiert, die durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen aus dem Proteingemisch verursacht werden. Somit stellt die spezifische Bindung, in diesem Fall die Bindung der Integrine aus dem Membranextrakt an



**Abbildung 6.30:** Inhibition der Interaktion des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  aus WM115 Zellen mit humanem Vitronectin durch zyklische Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $^{\beta}$ Acc-Val-) **34**. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 360  $\mu$ M eingesetzt.

Vitronectin, nur eine Komponente der detektierten Gesamtbindung dar. In Kompetitionsversuchen wird die Interaktion zwischen den Integrinen und Vitronectin spezifisch durch die zyklischen Peptide **33** und **34** inhibiert. Die unspezifischen Bindungen werden durch diese Peptide nicht inhibiert. Daher erscheinen die Bindungskurven in Anwesenheit von Peptiden als das Ergebnis der Subtraktion der spezifischen Bindung von der Gesamtbindung und aus diesem Grund unterscheidet sich der Verlauf dieser Bindungskurven von dem Verlauf der Bindungskurven ohne Peptid.

### 6.3.5 Resumé

In Kapitel 6.3 wurden Studien der biologischen Aktivität der zyklischen RGD-Peptide mit der inkorporierten  $\beta$ -Aminosäure  $^{\beta}$ Acc dargestellt.  $^{\beta}$ Acc weist aufgrund des Cyclopropanrings eine hohe konformationelle Einschränkung auf und führt zur Rigidisierung des Peptidrückgrats in Peptiden. Die beiden untersuchten Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) $^{\beta}$ Acc-Val-) **34** zeigten biologische Aktivität in der Hemmung der Integrinligand Wechselwirkungen.

Die Ergebnisse der Zelladhäsionstests mit WM115 Zellen zeigten, dass die Peptide **33** und **34** die Adhäsion dieser Zellen an Vitronectin mit  $IC_{50}$ -Werten von 0.02  $\mu$ M bzw. 0.63  $\mu$ M inhibieren. Diese Adhäsion wird hauptsächlich über das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  vermittelt. Somit erwies sich das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) $^{\beta}$ Acc-Val-) **33** als aktiver Ligand von Integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0.02  $\mu$ M war dieses Peptid an Integrin  $\alpha_v\beta_3$  zehnfach ak-

tiver als der bekannte Peptidligand cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31**. Die zusätzlichen biologischen Tests mit  $\kappa 562$  Zellen zeigten, dass das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) <sup>$\beta$</sup> Acc-Val-) **33** relativ selektiv Affinität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , nicht aber zu Integrin  $\alpha_5\beta_1$  aufweist.

Die biologische Aktivität beider Peptide wurden in Konkurrenzexperimenten mit Hilfe von SPR-Technik bestätigt. Beide Peptide zeigten Aktivität in der Hemmung der Wechselwirkung zwischen den integrinhaltigen Membranextrakten aus WM115 Zellen und Vitronectin. In diesen Experimenten wies Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) <sup>$\beta$</sup> Acc-Val-) **33** ebenfalls eine höhere Aktivität als Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) <sup>$\beta$</sup> Acc-Val-) **34** auf.

Die hohe Aktivität der beiden Peptide und die Selektivität des Peptides cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) <sup>$\beta$</sup> Acc-Val-) **33** zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  konnten aufgrund der Struktur-Aktivität-Studien erklärt werden.

- Das pharmakophore RGD Motiv im Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+) <sup>$\beta$</sup> Acc-Val-) **33** befindet sich in einem  $\gamma$ -turn mit zentral positioniertem Glycin und nimmt somit eine geknickte Konformation ein. Diese Konformation ist für selektive Liganden des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  charakteristisch und kommt ebenfalls im bekannten Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** vor.<sup>[20]</sup>
- Im Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp(-) <sup>$\beta$</sup> Acc-Val-) **34** nimmt die pharmakophore Erkennungssequenz RGD im Vergleich zu Peptid **33** eine gestrecktere Konformation ein, die mit niedrigerer biologischer Aktivität korreliert.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Inkorporation des konformationell eingeschränkten Bausteins  <sup>$\beta$</sup> Acc in die zyklischen RGD-Peptide bei der Suche nach neuen biologisch aktiven Strukturen effektiv war und zur Entdeckung eines neuen selektiven Liganden des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  geführt hat.

## 6.4 Das Protein CagL als bakterieller Ligand humaner Integrine

Integrine als Oberflächenrezeptoren werden häufig durch Bakterien zum Anheften an die Wirtszelle verwendet. Zu den Mikroorganismen, die Integrine als Angriffspunkt benutzen, gehören *Pseudomonas aeruginosa*, *Coxiella burnetii*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*.<sup>[102–104]</sup> Die Bakterien präsentieren auf ihrer Oberfläche ein Protein, das über eine Erkennungssequenz an ein bestimmtes Integrin der Wirtszelle binden kann (Kap. 2.2.4). Das Bakterium *P. aeruginosa* erkennt das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  auf der Oberfläche bronchialer und nasaler Epithelzellen und verursacht schwere entzündliche Atemwegserkrankungen.<sup>[236]</sup> *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* sind Erreger

```
MKTLVKNTIS SFLLSVLMA EDITSGLKQL DSTYQETNQQ VLKNLDEIFS
TTSPSANNEI GQEDALNIKK AAIALRGDLA LLKANFEANE LFFISEDVIF
KTYMSSPELL LTYMKINPLD QNTAEQQCGI SDKVLVLYCE GKLKIEQEKQ
NIRERLETSL KAYQSNIGGT ASLITASQTL VESLKNKNFI KGIRKLMLAQ
NKVFLNYLEE LDALERSLEQ SKRQYLQERQ SSKIIVK
```

**Abbildung 6.31:** Aminosäuresequenz des bakteriellen CagL Proteins. Die Sequenz RGD ist rot markiert.

einer fieberhaften Darmentzündung, die als Folge einer Nahrungsmittelvergiftung verursacht wird. Als Folgeerkrankung nach Infektion mit *Y. pseudotuberculosis* kann eine Gelenkentzündung im Rahmen einer Autoimmunerkrankung entstehen. Die Erkennung einer Wirtszelle durch Bakterien der Gattung *Yersinia* wird über verschiedene  $\beta_1$  Integrine vermittelt.<sup>[103]</sup> Infektion mit intrazellulär lebendem gramnegativem Bakterium *Coxiella burnetii* führt zu Q-Fieber. In die Erkennung einer Wirtszelle durch *C. burnetii* wird das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  involviert.<sup>[104]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des bakteriellen Proteins CagL als potenzieller Integrinligand untersucht. Das CagL Protein wird durch das Bakterium *Helicobacter pylori* produziert, welches die Epithelzellen der Magenschleimhaut des Menschen infiziert (Kap. 2.2.4.1).<sup>[105]</sup> Infektionen mit *H. pylori* verursachen unterschiedliche Magen-Darm-Krankheiten und können zu Magenkrebs führen.<sup>[106,107]</sup> In die Erkennung einer Wirtszelle durch *H. pylori* ist das Sekretionssystem des Typs IV (TFSS, *type four secretion system*) involviert.<sup>[109–111]</sup> Das komplexe TFSS besteht aus einem Sekretionskanal in der Bakterienmembran und einem extrazellulären Pilus. Das bakterielle CagL Protein stellt eine Komponente dieses Systems dar. Dieses Protein ist das erste bekannte Beispiel eines bakteriellen Proteins, das das RGD-Motiv enthält, welches zur Erkennung durch Integrine verwendet wird (Abb. 6.31).<sup>[48]</sup>

Die Hypothese dieses Forschungsprojektes kann folgendermaßen formuliert werden:

- Die Bindung des CagL Proteins an Integrine erfolgt über RGD-Erkennungssequenz
- RGD-Peptide können die Bindung des CagL Proteins an Integrine inhibieren.

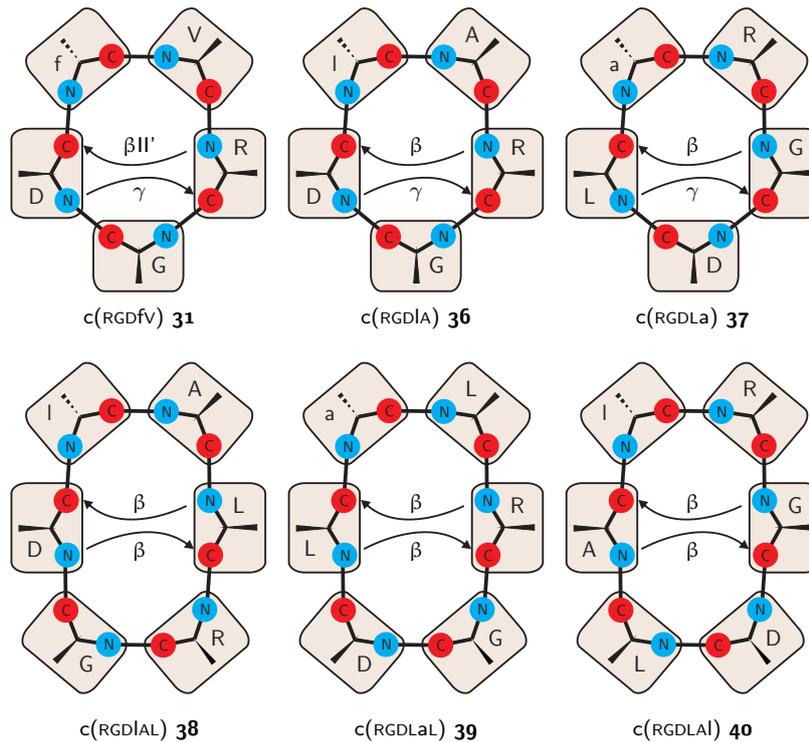
Um die Hypothese zu verifizieren, wurden entsprechende Bindungsstudien und Konkurrenzexperimente durchgeführt.

Dieses Projekt wurde im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Backert und Dr. Kwok (Universität Magdeburg) durchgeführt. Das rekombinant hergestellte CagL Protein und die Mutanten CagL-RGA und CagL-RAD wurden von Dr. Backert und Dr. Kwok zur Verfügung gestellt. In diesen Mutanten des CagL Proteins, CagL-RAD und CagL-RGA wurde im RGD Motiv Glycin bzw. Aspartat durch Alanin ersetzt. Die Fähigkeit des bakteriellen

Proteins CagL und seiner Mutanten zur Bindung an humane Integrine wurde in Zelladhäsionstest mit WM115 Zellen (Kap. 6.4.1) und Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten (Kap. 6.4.4.2, 6.4.4.3, 6.4.4.4) untersucht.

Für die biologische Aktivität der Peptide ist die dreidimensionale Struktur der pharmakophoren Aminosäuresequenz von einer großen Bedeutung. Bei dem Design der Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) **36**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) **37**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Leu-) **39** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala-D-Leu-) **40** wurde der bislang bekannte Einfluss der Sekundärstrukturbildner beachtet.

Die Einführung einer D-Aminosäure in zyklische Peptide resultiert in der Fixierung der dreidimensionalen Peptidstruktur, wobei D-Aminosäuren bevorzugt die  $i+1$  Position eines  $\beta$ II'-turns einnehmen.<sup>[20,128]</sup> Im Fall von Referenzpeptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** ist D-Phe in  $i+1$  Position eines  $\beta$ II'-turns und Gly zentral in einem  $\gamma$ -turn positioniert (Abb. 6.32).<sup>[20,120]</sup> Die Strukturen der hier untersuchten Penta- und Hexapeptide können auf dieser Grundlage vorhergesagt werden. In den Pentapeptiden cyclo(-Arg-Gly-Asp-



**Abbildung 6.32:** Schematische Darstellung der theoretisch zu erwartenden Strukturen der Peptide **36-39** und des Peptides **31**.

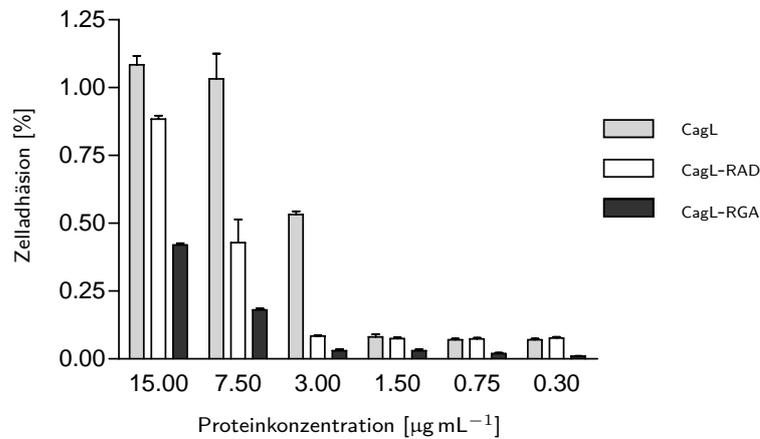
D-Leu-Ala-) **36** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) **37** sind  $\gamma$ -turns zwischen Arg und Asp bzw. Gly und Leu zu erwarten, während sich die D-Aminosäure in  $i+1$  Position eines  $\beta$ -turns befinden sollten. In Hexapeptiden sollte man zwei  $\beta$ -turns erwarten, wobei sich die Konformation des RGD Motivs jeweils unterscheidet (Abb. 6.32). Es ist bekannt, dass das RGD Motiv in Liganden des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  eine geknickte Konformation einnimmt. Der Abstand zwischen den C $^\beta$  Atomen von Arg und Asp beträgt im Fall des Peptides cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** 668 pm und charakterisiert die dreidimensionale Struktur der Erkennungssequenz. Strukturen, in denen das RGD Motiv in einer gestreckten Konformation vorliegt, zeichnen sich durch geringere Affinität zu dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  aus.

Der Einfluss der zyklischen Penta- und Hexapeptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) **36**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) **37**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-Leu-) **38**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Leu-) **39** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala-D-Leu-) **40** auf die Wechselwirkung des CagL Proteins mit Integrinen wurde im Zelladhäsionstest mit WM115 Zellen getestet (Kap. 6.4.2). Die WM115 Zellen präsentieren auf der Oberfläche unter anderem Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ . Die Bindung dieser Integrine an natürliche Liganden erfolgt über ein RGD-Tripeptid. Auf diese Weise eignen sich diese Zellen zur Untersuchung der RGD-abhängigen Bindung des CagL Proteins an Integrine und zur Untersuchung des Einflusses der RGD-Peptide auf diese Interaktionen. Die Spezifität der Peptide **36-40** wurde im Zelladhäsionstest mit WM115 Zellen und natürlichen Proteinliganden (Vitronectin, Fibronectin) untersucht (Kap. 6.4.3). Die Analyse der Integrinexpression durch die Modellzelllinie WM115 Zellen ist in Kapitel 6.3.1 beschrieben. Kapitel 6.4.4.5 fasst die Bindungsstudien des CagL Proteins an das Matrixprotein Fibronectin zusammen. In diesen Studien wurde ebenfalls die Rolle des RGD Motivs in der Erkennung beider Proteine untersucht.

#### 6.4.1 Adhäsion der WM115 Zellen an CagL Proteine

In diesen Experimenten wurde die Fähigkeit des CagL Proteins zur Bindung an, auf Oberfläche der WM115 Zellen präsentierten, Integrine bestimmt. Darüber hinaus wurde die Auswirkung der Mutationen des RGD-Motivs im CagL auf die Bindung an Integrine untersucht.

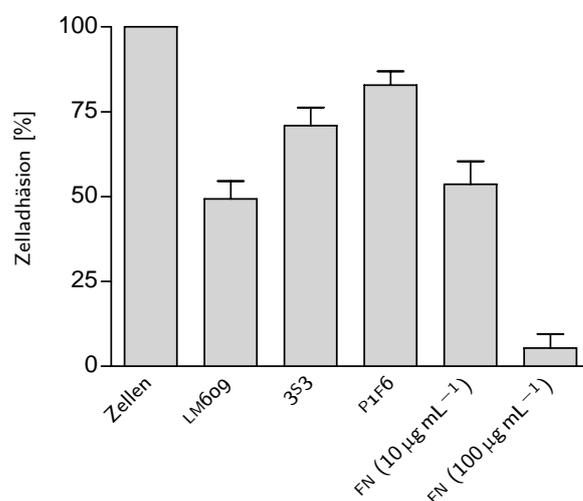
Die Relevanz der einzelnen Aminosäuren im RGD-Motiv wurde durch mehrere Forschungsgruppen in Mutagenesestudien bzw. mit zyklischen RGD Peptiden untersucht. Sie zeigten, dass das Aspartat im RGD-Motiv für die biologische Aktivität die größte Bedeutung hat, während Arginin und Glycin eine nicht so bedeutsame Rolle spielen.<sup>[237-239]</sup> Basierend auf diesen Daten sollte die Substitution des Aspartats mit Alanin zu einer signifikanten Minderung der Bindung von CagL an Integrine führen. Im Gegensatz dazu soll die



**Abbildung 6.33:** Adhäsion der WM115 Zellen an das CagL Protein und die Mutanten.

Mutation von Glycin einen schwächeren Einfluss auf die Bindung von CagL an Integrine ausüben.

Zuerst wurden die Bedingungen der Adhäsion der WM115 Zellen an CagL optimiert. Zu diesem Zweck wurden sowohl das CagL Protein als auch die Mutanten in einer Konzentrationsreihe von  $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  (12 nM) bis  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  (600 nM) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Der Zelladhäsionstest ist, wie in Kapitel 5.3 beschrieben, durchgeführt worden. In Abbildung 6.33 ist die Bindung der WM115 Zellen gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Das Wildtyp-CagL Protein besitzt im Vergleich zu den mutierten CagL-RAD und CagL-RGA Proteinen eine höhere Affinität zu WM115 Zellen. Die geringste Affinität zu WM115 Zellen erwies das CagL-RGA Protein, was die signifikante Rolle des Aspartats innerhalb des RGD-Motivs bestätigt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutationen des RGD Motivs die Affinität des CagL Proteins zu WM115 Zellen vermindert haben und dass das RGD Motiv eine entscheidende Rolle bei der Erkennung der Oberflächenrezeptore der WM115 Zellen spielt. In Konkurrenzexperimenten mit den spezifischen Antikörpern gegen Integrine  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_5$  (Antikörper LM609, 3S3 und P1F6) wurde die Spezifität der Adhäsion der WM115 Zellen an CagL Protein untersucht (Abb. 6.34). Der monoklonale Antikörper LM609 gegen Integrin  $\alpha_v\beta_3$  inhibiert diese Adhäsion zu 50%. Der Antikörper 3S3 gegen Integrin  $\beta_1$  beeinflusst diese Interaktion zu 35%. Der Einfluss des Antikörpers P1F6 gegen Integrin  $\alpha_v\beta_5$  ist nicht signifikant. Diese Ergebnisse deuten auf einen komplexen Charakter der Wechselwirkung des CagL Proteins mit den Oberflächenrezeptoren der WM115 Zellen hin, wobei Integrin  $\alpha_v\beta_3$  einen entscheidenden Beitrag leistet. Die Inkubation der WM115 Zellen mit humanem Fibronectin in einer Konzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0.4 \mu\text{M}$ ) bzw.  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0.04 \mu\text{M}$ ) führte zur Minderung der Adhäsion der Zellen an das CagL Protein

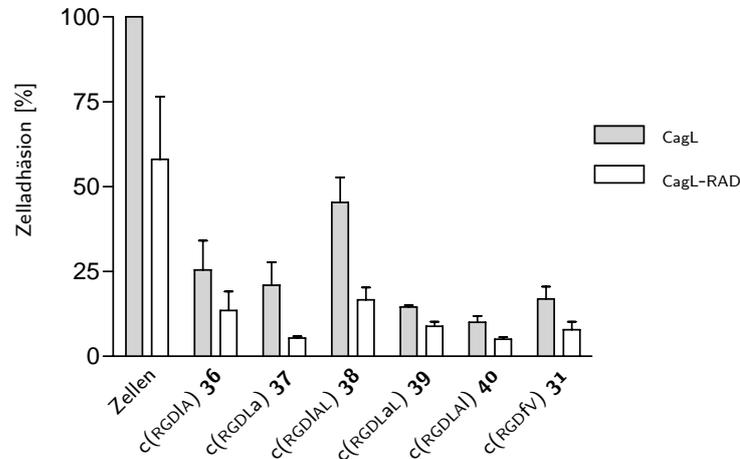


**Abbildung 6.34:** Einfluss der spezifischen Antikörper LM609, 3S3, P1F6 und von humanem Fibronectin (FN) auf die Adhäsion von WM115 Zellen an CagL Protein.

(Abb. 6.34). Dies deutet darauf hin, dass das Fibronectin mit CagL Protein in der Bindung der Oberflächenrezeptoren der WM115 Zellen konkurriert.

#### 6.4.2 Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Adhäsion von WM115 Zellen an CagL Proteine

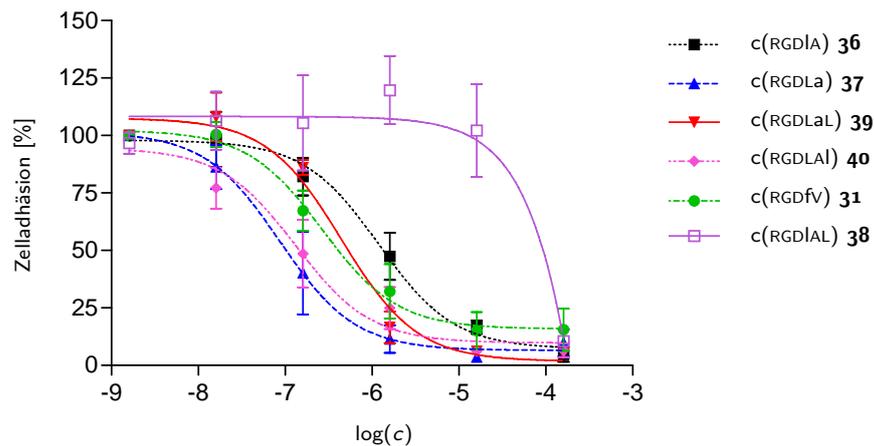
Um genauere Informationen über die Erkennungssequenz, welche in die Interaktion der Integrine auf der WM115 Zelloberfläche mit CagL Protein involviert ist, zu erhalten, wurden die zyklischen Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) **36**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) **37**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-Leu-) **38**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Leu-) **39**, cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala-D-Leu-) **40** und das Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** in Zelladhäsionstests eingesetzt. Die Tests wurden mit CagL und CagL-RAD durchgeführt. Die Peptide wurden zuerst in einer Konzentration von 160 µM untersucht (Abb. 6.35). Alle Peptide zeigten bei dieser Konzentration einen inhibitorischen Effekt auf die Zelladhäsion zwischen 55% und 95%. Anschließend wurden die Peptide in Konzentrationen von 160 µM bis 16 pM getestet und die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Abbildung 6.36 zeigt die Kurven für alle getesteten Peptide (**31,36-40**). Die IC<sub>50</sub>-Werte für die Peptide sind in der Tabelle 6.6 zusammengefasst. Dies bestätigt, dass die Adhäsion der WM115 Zellen an CagL Protein über die RGD Erkennungssequenz vermittelt wird und mit spezifischen RGD-Peptiden gehemmt wird. Die Adhäsion der WM115 Zellen an CagL-RAD konnte ebenfalls mit diesen Peptiden inhibiert werden (Abb. 6.35). Es stellt sich die interessante Frage, ob



**Abbildung 6.35:** Inhibition der Adhäsion der WM115 Zellen an CagL und CagL-RAD Proteine mit zyklischen Peptiden bei einer Peptidkonzentration von 160  $\mu\text{M}$ .

diese Adhäsion mit zyklischen RAD-Peptiden inhibiert werden könnte.

Außer dem Peptid **38** zeigten alle getestete Peptide **36-40** hohe Affinität zu den Integrinen, die von WM115 Zellen präsentiert werden, mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten im mikromolaren Bereich. Die höchste Aktivität mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0.09  $\mu\text{M}$  besitzt Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) **37** und ist damit dreifach affiner als das literaturbekannte Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** ( $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0.27  $\mu\text{M}$ ). Unerwarteterweise zeigt Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) **36** einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 1.30  $\mu\text{M}$ , was im Vergleich zu



**Abbildung 6.36:** Einfluss der zyklischen Peptide auf die Adhäsion der WM115 Zellen an das CagL Protein.

**Tabelle 6.6:** Einfluss der Peptide **31** und **36-40** auf die Zelladhäsion von WM115 Zellen an CagL Protein.

Peptid	IC <sub>50</sub> ( $\pm \sigma$ ) [ $\mu\text{M}$ ]
cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) <b>31</b>	0.27 (0.11)
cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) <b>36</b>	1.20 (0.40)
cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) <b>37</b>	0.09 (0.03)
cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-Leu-) <b>38</b>	>2 000.00
cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Leu-) <b>39</b>	0.45 (0.15)
cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala-D-Leu-) <b>40</b>	0.13 (0.06)

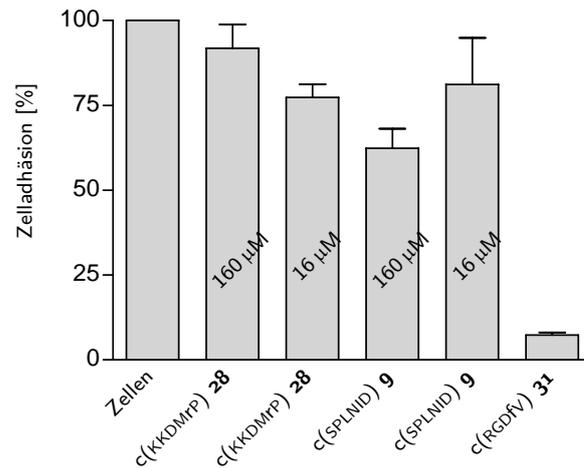
dem IC<sub>50</sub>-Wert von Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** (0.27  $\mu\text{M}$ ) etwa um Faktor 5 höher liegt (Tab. 6.6). Die Hexapeptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-Leu-) **39** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala-D-Leu-) **40** zeichnen sich ebenfalls durch hohe Affinität zu den untersuchten Integrinen aus. Die IC<sub>50</sub>-Werte liegen im mikromolaren Bereich (0.45  $\mu\text{M}$  bzw. 0.13  $\mu\text{M}$ ) und sind vergleichbar mit dem IC<sub>50</sub>-Wert des Literaturpeptides cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31**. Der IC<sub>50</sub>-Wert für Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-Leu-) **38** liegt im millimolaren Bereich (IC<sub>50</sub>-Wert größer als 2 000.00  $\mu\text{M}$ ) und zeigt, dass das Peptid **38** praktisch kein Inhibitor der Wechselwirkung des CagL Proteins mit den untersuchten Integrine ist. In die Bindung von WM115 Zellen an CagL sind mehrere Integrine involviert. Dazu zählen sowohl die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  als auch  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$ . Die Peptide mit biologischer Aktivität stellen Liganden dieser Integrine dar.

Die durch Strijowski durchgeführte Strukturanalyse des Peptides cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) **36** hat gezeigt, dass sich D-Leucin erwartungsgemäß in der  $i+1$  Position eines  $\beta$ -turns befindet. Die Werte der Torsionswinkel  $\psi$  von D-Leucin ( $i+1$ ) und  $\phi$  von Alanin ( $i+2$ ) weichen von den charakteristischen Werten der Torsionswinkel eines  $\beta\text{II}'$ -turns ab, welcher theoretisch in Pentapeptiden mit einer D-Aminosäure zu erwarten ist. Das Glycin befindet sich in diesem Peptid in zentraler Position eines  $\gamma$ -turns.<sup>[240]</sup> Diese Ergebnisse zeigen, dass die  $\beta$ - und  $\gamma$ -turns in den beiden Peptiden cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) **36** identisch positioniert sind, was eine ähnliche Präsentation des RGD-Motivs der beiden Peptide gewährleistet. Diese Daten erklären die vergleichbare Aktivität der Peptide **31** und **36**.

**36-40** befindet sich Glycin, das oft ähnliches sekundärstrukturinduzierendes Potenzial wie D-Aminosäure hat. Dies kann zu unerwarteten Konformationsänderungen der in Abbildung 6.32 vorgeschlagenen Strukturen führen. Aus diesem Grund kann eine endgültige Aussage über die Struktur-Aktivität-Beziehungen der getesteten Peptide lediglich anhand vollständiger Struktur-Analyse-Daten getroffen werden.

Die als negative Kontrolle untersuchte Peptide cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-) **9** und

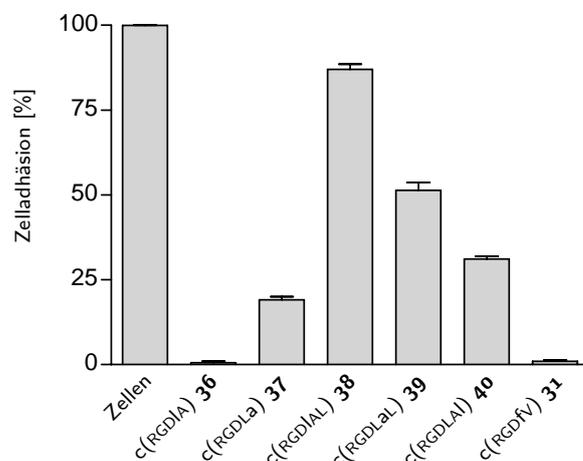
cyclo(-Lys-Lys-Asp-Met-D-Arg-Pro-) **28** zeigen bei den getesteten Konzentrationen (160  $\mu\text{M}$  und 16  $\mu\text{M}$ ) keinen signifikanten Effekt (Abb. 6.37).



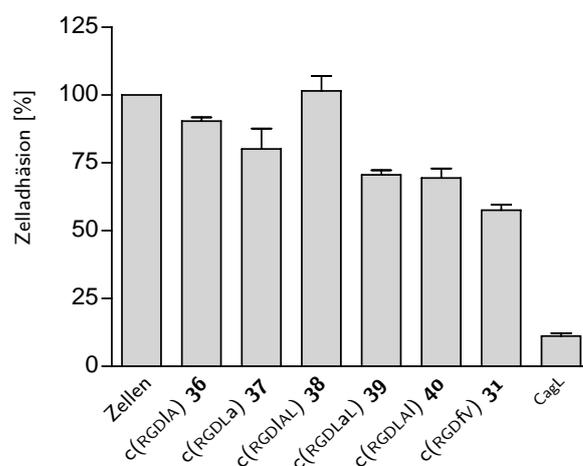
**Abbildung 6.37:** Einfluss der zyklischen Peptide c(SPLNID) **9** und c(KKDMrP) **28** bei einer Konzentration von 160  $\mu\text{M}$  und 16  $\mu\text{M}$  auf die Adhäsion der WM115 Zellen an das CagL Protein. Als Positiv-Kontrolle wurde das Peptid c(RGDFV) **31** bei einer Konzentration von 160  $\mu\text{M}$  verwendet.

### 6.4.3 Einfluss zyklischer RGD-Peptide auf die Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin und Fibronectin

Um die Spezifität der zyklischen Peptide **36-40** zu bestimmen, wurden diese in anderen Assays getestet. Zu diesem Zweck wurde ein Zelladhäsionstest mit WM115 Zellen und Vitronectin bzw. Fibronectin als Proteinliganden durchgeführt. Die Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin wird hauptsächlich über Integrin  $\alpha_v\beta_3$  vermittelt (Kap. 6.3, Abb. 6.22). Als Positiv-Kontrolle wurde in beiden Fällen cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** eingesetzt. Die Ergebnisse der durchgeführten Tests mit immobilisiertem Vitronectin bzw. Fibronectin sind in Abbildung 6.38 bzw. 6.39 dargestellt. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 160  $\mu\text{M}$  getestet. In den Experimenten mit Fibronectin wurde zusätzlich der Einfluss von CagL Protein in einer Konzentration von 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0.6  $\mu\text{M}$ ) untersucht.



**Abbildung 6.38:** Einfluss der zyklischen RGD-Peptide auf die Adhäsion der WM115 Zellen an humanes Vitronectin.



**Abbildung 6.39:** Einfluss der zyklischen RGD-Peptide und des CagL Proteins (0.6  $\mu$ M) auf die Adhäsion der WM115 Zellen an humanes Fibronectin.

Die Zelladhäsionstests mit WM115 Zellen und Vitronectin bzw. Fibronectin (Abb. 6.38 und 6.39) zeigten, dass lediglich Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) **36** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) **37** einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der WM115 Zellen an Vitronectin haben. Diese Adhäsion ist hauptsächlich über Integrin  $\alpha_v\beta_3$  vermittelt (Abb. 6.22, Seite 135), für welches Vitronectin ein natürlicher Ligand darstellt. Die Strukturähnlichkeit zwischen den Peptiden cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) **31** und cyclo-

(-Arg-Gly-Asp-D-Leu-Ala-) **36** erklärt die Aktivität des Peptids **36**, da das Peptid **31** ein bekannter Ligand des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  ist.<sup>[20]</sup> Im Fall der Adhäsion der WM115 Zellen an Fibronectin zeigten die Peptide **36-40** einen geringen Einfluss, was auf die Spezifität dieser Peptide auf die Wechselwirkung des CagL Proteins mit Integrinen hindeutet. Fibronectin ist ein Ligand vieler Integrine und erkennt u. a. die Integrine  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$  und  $\alpha_3\beta_1$ <sup>[55]</sup>. Diese Integrine werden auf der Oberfläche von WM115 Zellen präsentiert.

#### 6.4.4 SPR Experimente

Mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*) wurden die Interaktionen des CagL Proteins und der Mutanten mit den isolierten Integrinen  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_5$  untersucht (Kap. 6.4.4.2 und 6.4.4.4). In Kapitel 6.4.4.5 sind die Bindungsstudien des CagL Proteins an Matrixprotein Fibronectin zusammengefasst.

##### 6.4.4.1 Auswertung der SPR Daten

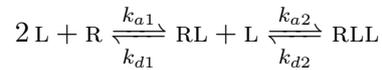
Die mit SPR-Technologie durchgeführten Bindungsstudien liefern kinetische und thermodynamische Daten, die eine Quantifizierung der detektierten Bindungen ermöglichen. Die Datenauswertung wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Biaevaluation *software* durchgeführt bzw. im *Scatchard plot* bestimmt.

Die Biaevaluation *software* ermöglicht eine globale Anpassung der Bindungskurven an unterschiedliche Bindungsmodelle, die jeweils mit entsprechenden Kinetikgleichungen beschrieben sind. Neben dem klassischen 1:1 Langmuir Bindungsmodell bietet die Biaevaluation *software* eine Möglichkeit der Anwendung anderer Modelle, wie z. B. eines Modells mit heterogenem Liganden (*heterologous ligand*) bzw. bivalentes Modell (*bivalent model*), die komplexere Kinetiken beschreiben. Es ist ebenfalls möglich, die Bindungskinetik in Fällen zu bestimmen, in denen eine Abweichung von dem Langmuir Bindungsmodell zu beobachten ist. Dazu zählen Modelle mit driftender Basislinie (*model with drifting baseline*) und das Modell mit Massentransfereffekt (*mass transfer effect*).

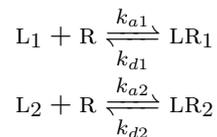
In dieser Arbeit werden insbesondere das bivalente Modell und Modell für heterogenen Ligand verwendet, da lediglich mit Hilfe dieser Modelle eine zufriedenstellende Datenauswertung möglich war. Wenn eine Anpassung der Bindungskurven an das Langmuir Bindungsmodell nicht möglich war, wurden diese mit Hilfe von *Scatchard plot* ausgewertet.

Das bivalente Modell beschreibt die Bindung eines Liganden (L) mit zwei Bindestellen (z. B. Antikörper) an den Rezeptor (R). Zuerst bindet eine Bindestelle des Liganden an den Rezeptor ( $K_{D1}$ ,  $k_{a1}$ ,  $k_{d1}$ ). Die zweite freie Bindestelle im Ligand wird durch ein anderes freies Rezeptormolekül besetzt ( $K_{D2}$ ,  $k_{a2}$ ,  $k_{d2}$ ). Diese Bindung verursacht keine Erhöhung

der beobachteten Antwort, sondern ist an der Verschiebung der Gleichgewichtskonstante beteiligt. Die Kinetik dieser Wechselwirkung wird durch die folgende Reaktionsgleichung beschrieben.<sup>[241]</sup>



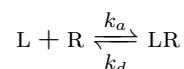
Das Bindungsmodell für heterogene Liganden wird verwendet, wenn der Ligand mehrere Bindestellen hat. Heterogenität des Liganden kann auch durch Aminokupplung oder ähnliche Immobilisierungsstrategien ausgelöst werden, da der Ligand in unterschiedlichen räumlichen Ausrichtungen immobilisiert wird. Dies kann in verschiedenen Subpopulationen des Liganden auf der Sensoroberfläche resultieren. Ein Ligand kann auch allein heterogener Natur sein. Im Fall von zwei unabhängigen Reaktionen erscheint die Bindungsphase als Summe zweier unabhängiger Ereignisse, welche mit zwei Reaktionen beschrieben werden.



Das Sensogramm spiegelt die Summe der beiden Reaktionen wider. Falls die Affinitäten sich wesentlich voneinander unterscheiden, werden im Fall von kleinen Analytkonzentrationen nur die Bindestellen mit höherer Affinität besetzt. So wird nur eine Exponentialkurve an die Daten angepasst. Bei höheren Analytkonzentrationen werden alle Bindestellen besetzt mit dem Resultat einer zweiphasigen Kinetik.<sup>[242]</sup>

Die Korrelation zwischen berechneten und gemessenen Bindungskurven wird unter anderem durch den  $\chi^2$  Faktor charakterisiert, der die relative Genauigkeit der Anpassung widerspiegelt. Der  $\chi^2$  Faktor ist eine statistische Größe, die das Maß der Kurvenanpassung wiedergibt. Je besser die Anpassung desto kleiner ist der  $\chi^2$  Faktor.

Eine Linearisierung von Bindungsdaten ist durch Anwendung des *Scatchard plots* möglich. In diesem Verfahren wird die Interaktion zwischen dem Rezeptor (R) und dem Ligand (L) (Modell 1:1) durch die Bestimmung der Bindungsparameter  $K_D$  und  $B_{\max}$  (hier weiter  $R_{\max}$ ) quantifiziert. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) stellt hierbei ein Maß für die Affinität der Bindungsstelle des Liganden zum betreffenden Rezeptor dar, während  $B_{\max}$  die maximale Bindungskapazität beschreibt. Die Messgröße [RL] wird bei konstanter Rezeptorkonzentration [R] als Funktion von [L] ermittelt. Die Interaktion eines Liganden mit einer Bindungsstelle wird durch folgende Reaktion beschrieben:



Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) ist nach dem Massenwirkungsgesetz folgendermaßen definiert:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (6.2)$$

Die totale Rezeptorkonzentration  $[R_t]$  ergibt sich hierbei aus der freien Rezeptorkonzentration und der Konzentration der im Komplex  $[RL]$  gebundenen Rezeptoren:

$$R_t = [R] + [RL] \quad (6.3)$$

Durch Kombination von Gleichungen 6.2 und 6.3 ergibt sich für  $[RL]$ :

$$[RL] = \frac{[R_t][L]}{K_D + [L]} \quad (6.4)$$

Die Dissoziationskonstante und  $[RL]$  Konzentration können aus der linearen Form dieser Gleichung bestimmt werden.

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{[R_t]}{K_D} - \frac{[RL]}{K_D} \quad (6.5)$$

Die Linearisierung der Bindungsdaten basiert auf Verfahren von Scatchard für die Interaktion von Proteinen mit kleinen Molekülen.<sup>[243]</sup>

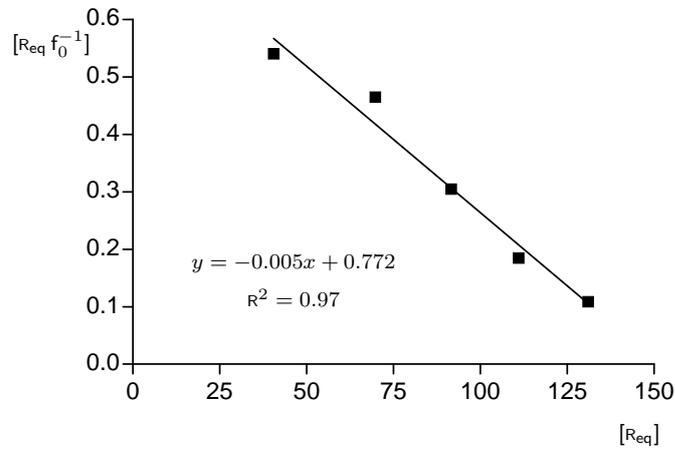
In Auswertung der Bindungsdaten aus den SPR Experimenten korreliert die Konzentration des gebundenen Liganden  $[RL]$  im Gleichgewichtszustand mit dem Resonanzsignal ( $RU$ ) und die Ligandenkonzentration ist konstant  $[L]=f_0$ .

$$\frac{[R_{eq}]}{[f_0]} = \frac{[R_{max}]}{K_D} - \frac{[R_{eq}]}{K_D} \quad (6.6)$$

Im *Scatchard plot* wird durch die Auftragung der Quotienten des Resonanzsignals im Gleichgewicht ( $R_{eq}$ ) und der Ausgangskonzentration des Proteins gegen das Resonanzsignals im Gleichgewicht ( $R_{eq}$ ) (Abb. 6.40) dargestellt. Aus der Gleichung 6.6 können die  $K_D$  und  $R_{max}$  Werte abgelesen werden. Die Qualität der Linearisierung der Bindungsdaten wird durch den Korrelationskoeffizient  $R^2$  bestimmt und liegt im Idealfall bei  $R^2 = 1$ .

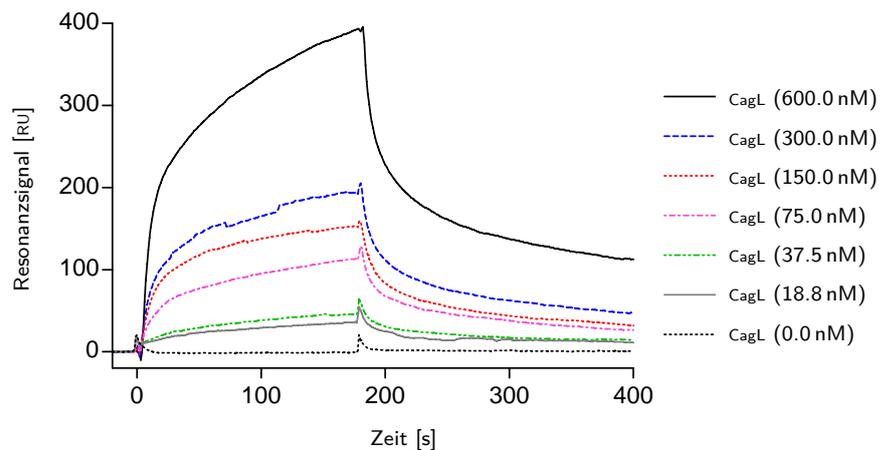
#### 6.4.4.2 Bindung des CagL Proteins an Integrin $\alpha_5\beta_1$

Die Untersuchung der Interaktion des CagL Proteins und der Mutanten CagL-RAD und CagL-RGA mit humanen Integrinen erfolgte mittels Oberflächenplasmonresonanz. Das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  wurde über Aminokupplung mit NHS/EDC auf der Oberfläche eines CM5 Chips immobilisiert. CagL und CagL-RAD wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$

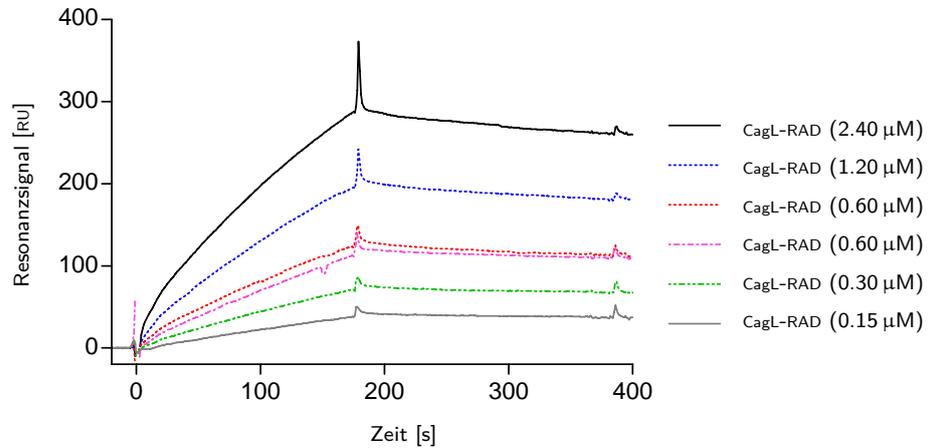


**Abbildung 6.40:** *Scatchard plot* der Bindungsdaten für die Interaktion des CagL Proteins mit immobilisiertem Integrin  $\alpha_v\beta_5$ . Die schwarze Linie spiegelt die Regressionsgerade der Konzentrationsreihe 75-1 200 nM wider. Das Ergebnis der linearen Regression wird durch Geradengleichung (y) und Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) bestimmt. Der  $K_D$ -Wert beträgt 0.20  $\mu$ M.

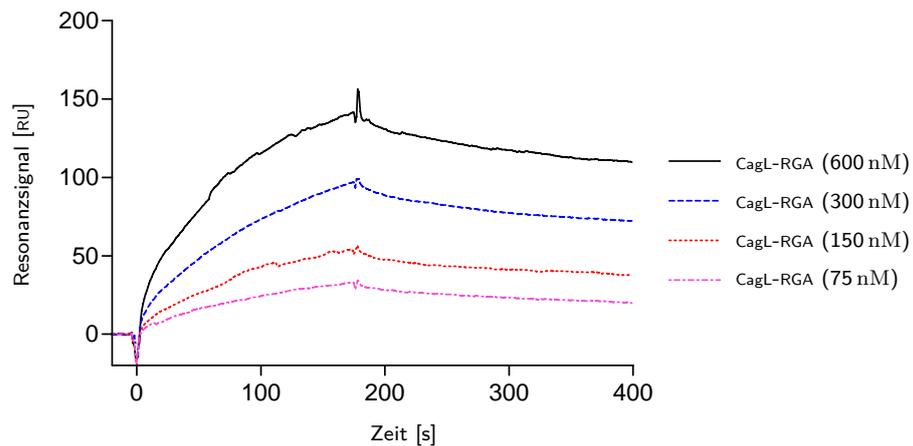
mit dem gleichen Chip, auf dem ein Immobilisierungsniveau von 4 000 RU erreicht wurde, vermessen. Die Bindungsstudien für CagL-RGA wurden bei einem Immobilisierungsniveau des Integrins von 1 700 RU durchgeführt.



**Abbildung 6.41:** Bindung des CagL Proteins an immobilisiertes Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .



**Abbildung 6.42:** Bindung des CagL-RAD Proteins an immobilisiertes Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .



**Abbildung 6.43:** Bindung des CagL-RGA Proteins an immobilisiertes Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .

Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in den Abbildungen 6.41, 6.42 und 6.43 dargestellt. Sowohl CagL als auch die Mutanten zeigten konzentrationsabhängige Bindung an das humane Integrin  $\alpha_5\beta_1$ . Die für jedes Protein erhaltenen Bindungskurven unterscheiden sich voneinander im Verlauf der Assoziations- wie auch der Dissoziationsphase. Im Fall von nativem CagL Protein beobachtet man einen starken Anstieg der Kurve in der Assoziationsphase und einen schnellen Abfall in Dissoziationsphase. Im Fall von CagL-RAD erfolgen die Assoziationsphase wie auch Dissoziationsphase viel langsamer im Vergleich zu Bindungskurven des CagL Proteins. Eine ähnliche Tendenz wird ebenfalls in Bindungskurven des CagL-RGA Proteins beobachtet (Abb. 6.43). Die Bindungsstudien für CagL und CagL-RAD Protein wurden bei einer Immobilisierung von 1 700 RU reproduziert. Die Bindungskurven

zeigten dabei einen gleichen Verlauf (Daten nicht gezeigt).

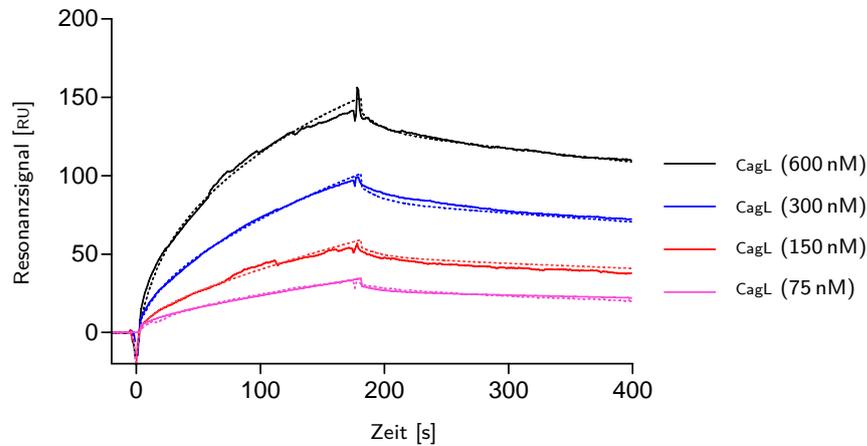
Um eine quantitative Information über die Bindung des CagL Proteins und der Mutanten an Integrin  $\alpha_5\beta_1$  zu gewinnen, wurden die erhaltenen Bindungskurven mit Hilfe der Biaevaluation *software* an ein Bindungsmodell angepasst. Die Analyse der Bindungskurven erwies sich als schwierig und gab keine eindeutige Auskunft über das Bindungsmodell und die Kinetik der Interaktion der CagL Proteine mit Integrin  $\alpha_5\beta_1$ . Die Bindungskurven aller drei Proteine zeigten die beste Anpassung bei Verwendung des bivalenten Bindungsmodells (*bivalent analyte*) bzw. des Bindungsmodells mit heterogenem Ligand (*heterologous ligand*) (Abb. 6.44).

Ein Versuch der Anpassung der Bindungskurven zu dem Langmuir Bindungsmodell (1:1) mit Hilfe von Biaevaluation *software* zeigte relativ große Fehler und starke Abweichungen der berechneten Kurven und war somit nicht optimal. Im Weiteren wurden die Kurven mit Hilfe des Biaevaluation *software* zu einem Gleichgewichtszustand extrapoliert und die  $K_D$ -Werte wurden mittels *Scatchard-plot* für das 1:1 Bindungsmodell berechnet. Die für unterschiedliche Bindungsmodelle erhaltenen  $K_D$ -Werte sind in der Tabelle 6.7 zusammengefasst.

**Tabelle 6.7:** Kinetik der Wechselwirkung des CagL Proteins und der Mutanten mit Integrin  $\alpha_5\beta_1$ .

	CagL	CagL-RGA	CagL-RAD
<i>Scatchard plot</i>			
$K_D (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]	0.09 (0.02)	0.38 (0.06)	0.56 (0.20)
$R^2$	0.85	0.71	0.95
<i>bivalent model</i>			
$K_{D1} (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]	0.95 (0.08)	8.60 (0.51)	0.44 (0.02)
$K_{D2} (\pm \sigma)$ [RU]	54.7 (4.4)	20.9 (1.0)	157.6 (1.7)
$\chi^2$	8.2	7.8	7.1
<i>heterologous ligand</i>			
$K_{D1} (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]	0.01 (0.001)	7.2 (0.31)	0.26 (0.02)
$K_{D2} (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]	0.05 (0.002)	0.25 (0.02)	0.06 (0.002)
$\chi^2$	12.4	3.2	7.6

Die durchgeführte Analyse der Bindungskurven deutet darauf hin, dass die untersuchten Wechselwirkungen der CagL Proteine mit Integrin  $\alpha_5\beta_1$  einen komplexen Charakter besitzen und eine eindeutige Interpretation anhand der vorhandenen Daten schwierig ist. Es ist wahrscheinlich, dass zusätzliche Effekte wie z. B. Konformationsänderungen des Liganden bzw. CagL Proteins den Bindungsmechanismus beeinflussen. Alle Daten zeigen, dass die Mutation des RGD Motivs in CagL Protein überraschenderweise zu keinem vollständigen Verlust der Aktivität des Proteins führt, sondern möglicherweise zu einem anderen Bin-



**Abbildung 6.44:** Anpassung der Bindungskurven (durchgezogen) des CagL-RGA Proteins für die Interaktion mit Integrin  $\alpha_5\beta_1$  an das Bindungsmodell für einen heterogenen Ligand (gestrichelt).

dungsmechanismus. Die relativ zufriedenstellende Anpassung der Bindungskurven an das bivalente Bindungsmodell zeigt, dass das CagL Protein wahrscheinlich zwei Bindestellen für das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  enthält, deren Affinität durch die Mutation des RGD Motivs verändert wird. Eine Anpassung der Bindungskurven mit Hilfe des Bindungsmodells für einen heterogenen Ligand suggeriert zwei Bindestellen in Integrin  $\alpha_5\beta_1$ , die entweder an der Oberfläche des Integrins vorkommen oder durch Immobilisierung des Liganden in unterschiedlichen räumlichen Konformationen auf der Sensoroberfläche verursacht werden.

#### 6.4.4.3 Bindung des CagL Proteins an Integrin $\alpha_v\beta_5$

Die Interaktion des CagL Proteins und der Mutanten mit Integrin  $\alpha_v\beta_5$  wurde in SPR Experimenten untersucht. Das humane Integrin  $\alpha_v\beta_5$  wurde zuerst auf der Oberfläche eines CM5 Chip mittels Aminokupplung immobilisiert. Die Bindung des CagL Proteins und der Mutanten an Integrin  $\alpha_v\beta_5$  wurden bei einer Beladung von 1320 RU und einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  im Phosphat-Puffer (CagL Puffer) untersucht. Die erhaltenen Bindungskurven sind in Abbildungen 6.45, 6.46 und 6.47 dargestellt.

Die Bindungskurven der CagL und CagL-RGA Proteine zeigen einen ähnlichen Verlauf sowohl in der Assoziationsphase wie auch in der Dissoziationsphase. Im Fall der Bindungskurven des CagL-RAD Proteins beobachtet man einen langsameren Verlauf der Bindungskurven in der Assoziationsphase. Alle Proteine wurden in Konzentrationsreihen im submikromolaren Bereich untersucht und die Intensität der Bindungskurven ist, wie erwartet, konzentrationsabhängig. Mit Hilfe der *Biaevaluation software* wurde die Kinetik der un-

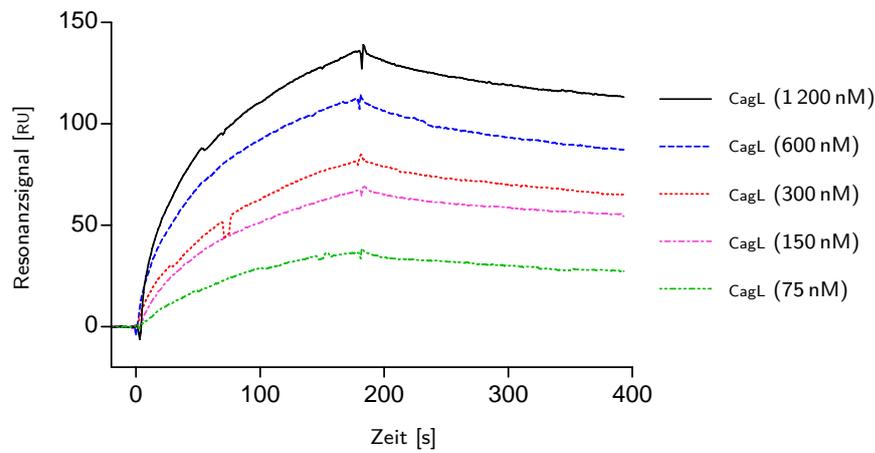


Abbildung 6.45: Bindung des CagL Proteins an immobilisiertes Integrin  $\alpha_v\beta_5$ .

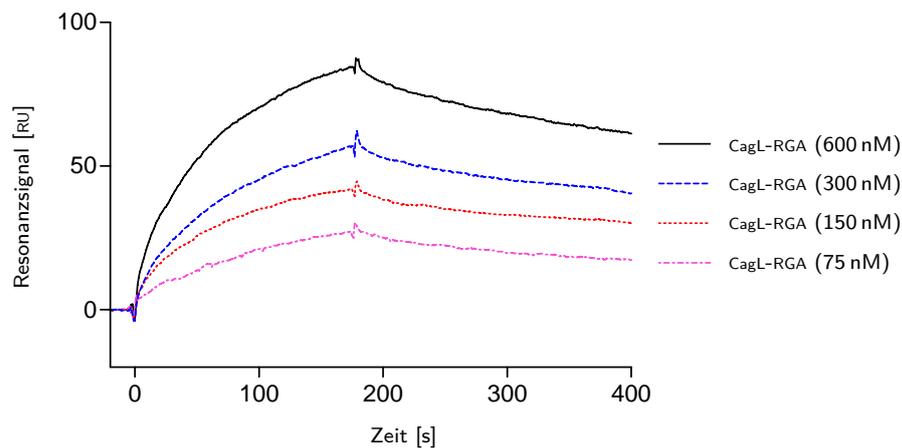
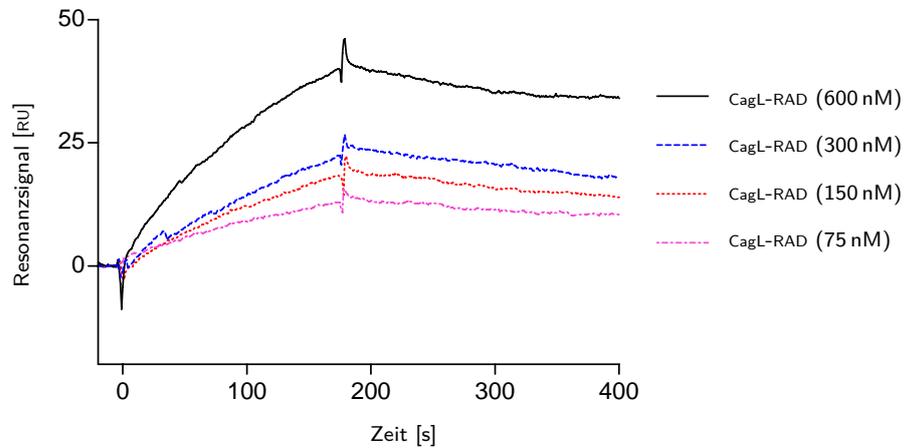


Abbildung 6.46: Bindung des CagL-RGA Proteins an immobilisiertes Integrin  $\alpha_v\beta_5$ .

tersuchten Interaktionen analysiert. Die besten Anpassungen der Bindungskurven wurden wie im Fall des Integrins  $\alpha_5\beta_1$  mit dem bivalentem Bindungsmodell bzw. dem Bindungsmodell für heterogenen Ligand erhalten. Auch hier wurden die  $\kappa_D$ -Werte für ein Langmuir Bindungsmodell (1:1) anhand der zu einem Gleichgewichtszustand extrapolierten Kurven in einem *Scatchard plot* berechnet. Tabelle 6.8 stellt die Ergebnisse der Kinetikanalyse dar. Die Anpassung der Bindungskurven für das Bindungsmodell für heterogenen Liganden ist exemplarisch für das CagL Protein in Abbildung 6.48 dargestellt. Die erhaltenen Daten deuten im Fall des Integrins  $\alpha_v\beta_5$  ebenfalls auf einen komplexen Charakter der Interaktion mit dem CagL Protein hin. Die Qualität der Anpassung ist durch den  $\chi^2$  Faktor bzw. durch  $R^2$  im Fall des *Scatchard plots* bestimmt und zeigt, dass in diesem Fall ein Bindungs-



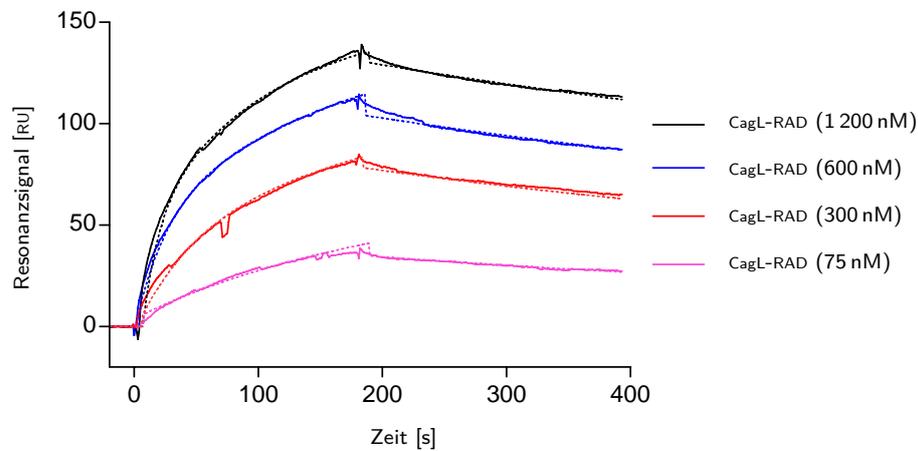
**Abbildung 6.47:** Bindung des CagL-RAD Proteins an immobilisiertes Integrin  $\alpha_v\beta_5$ .

modell für heterogenen Liganden zutreffender ist als das bivalente Bindungsmodell. Die  $K_D$ -Werte aus dem *Scatchard plot* sind für das CagL Protein und die Mutanten annähernd identisch. Auch bei Verwendung des bivalenten Bindungsmodell lässt sich sagen, dass die Mutationen des RGD Motivs im CagL Protein nicht ausreichend sind, um die Bindung dieses Proteins an Integrin  $\alpha_v\beta_5$  zu vermindern und dass die Interpretation der Bindungskurven mit einer eindeutigen Aussage über die Kinetik und den Bindungsmechanismus schwierig ist.

**Tabelle 6.8:** Kinetik der Wechselwirkung des CagL Proteins und der Mutanten mit Integrin  $\alpha_v\beta_5$ .

	CagL	CagL-RGA	CagL-RAD
<i>Scatchard plot</i>			
$K_D (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]	0.20 (0.02)	0.35 (0.06)	0.18 (0.04)
$R^2$	0.97	0.92	0.90
<i>bivalent model</i>			
$K_{D1} (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]	0.15 (0.007)	0.18 (0.010)	0.18 (0.020)
$K_{D2} (\pm \sigma)$ [RU]	29.9 (2.15)	50.3 (9.45)	28.0 (6.41)
$\chi^2$	5.74	4.75	4.01
<i>heterologous ligand</i>			
$K_{D1} (\pm \sigma)$ [nM]	24.0 (1.0)	16.0 (0.6)	2.0 (0.3)
$K_{D2} (\pm \sigma)$ [ $\mu\text{M}$ ]	0.03 (0.001)	0.55 (0.031)	24 (3.24)
$\chi^2$	0.98	0.89	0.91

Die durchgeführten Bindungsstudien mit isolierten Integrinen  $\alpha_5\beta_1$  (Kap. 6.4.4.2) und  $\alpha_v\beta_5$  haben gezeigt, dass in die Wechselwirkung dieser Integrine mit dem CagL Protein und der Mutanten vermutlich mehrere Bindestellen involviert sind und die Punktmutationen



**Abbildung 6.48:** Anpassung der Bindungskurven (durchgezogen) des CagL-RAD Proteins für die Interaktion mit Integrin  $\alpha_v\beta_5$  mit Hilfe des Bindungsmodells für einen heterogenen Liganden (gestrichelt).

des RGD Motivs diese Interaktion nicht verhindern können.

Diese Daten stehen nicht im Einklang mit den Ergebnissen der Zelladhäsionstests mit WM115 Zellen. Diese zeigen, dass die Mutation des RGD Motivs die Affinität des CagL Proteins zu Integrinen eindeutig reduziert (Kap. 6.4.1, Abb. 6.33). Die Adhäsion der WM115 Zellen an das CagL wird zum größten Teil über Integrin  $\alpha_v\beta_3$  vermittelt. In diese Adhäsion sind ebenfalls das Integrin  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$  involviert. Das in SPR-Experimenten untersuchte Integrin  $\alpha_5\beta_1$  wird auf der Oberfläche der WM115 Zellen nicht präsentiert. Der Beitrag von Integrin  $\alpha_v\beta_5$  an Adhäsion dieser Zellen an CagL Protein ist nicht signifikant, wie in Konkurrenzexperimenten mit spezifischen Antikörper gezeigt wurde (Kap. 6.4.1). Auf diese Weise können die Ergebnisse der Zelladhäsionstests mit WM115 Zellen mit Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten nicht direkt verglichen werden.

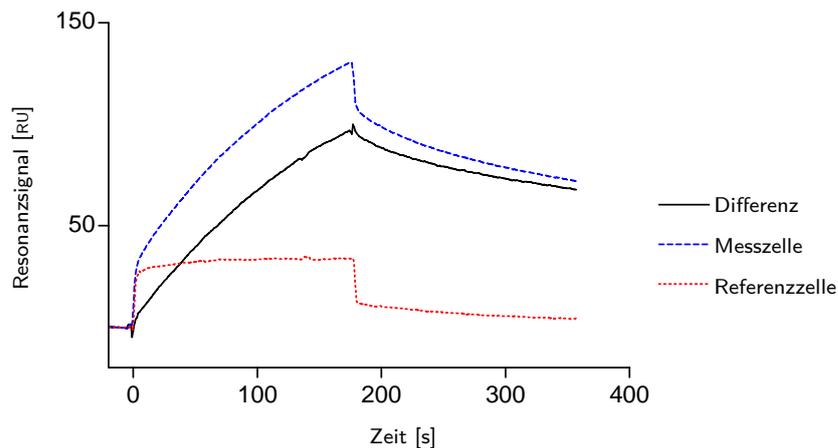
#### 6.4.4.4 Interaktion des Integrins $\alpha_v\beta_5$ mit immobilisiertem CagL Protein

Die Interaktion des Integrin  $\alpha_v\beta_5$  mit CagL Protein wurde ebenfalls in einem System nachgewiesen, in welchem das CagL Protein immobilisiert wurde und Integrin im Analyt untersucht wurde.

Die durch Dr. K. Sewald durchgeführten Versuche der Bindungsstudien waren nicht erfolgreich und zeigten, dass die Immobilisierung des CagL Proteins auf der Oberfläche eines CM5 Chips zu dem Verlust der biologischen Aktivität des Proteins führt. Die Bindungsstudien wurden in CagL Puffer mit Fibronectin bzw. Integrin  $\alpha_5\beta_1$  als Ligand durchgeführt. In beiden Fällen wurde keine Bindung detektiert.

In dieser Arbeit wurde CagL Protein erfolgreich mit Hilfe der *capture method* immobi-

liert. Da das CagL Protein rekombinant hergestellt wurde und ein Polyhistidine-Epitop enthält, wurde es über His<sub>6</sub>-Tag Antikörper (Maus anti-C-Terminal-His<sub>6</sub>-Epitop) immobilisiert. Die Immobilisierung des Antikörpers erfolgte in HBS-N Puffer in beiden Messzellen eines CM5 Chip über Aminokupplung mit Hilfe des EDC/NHS Protokolls. Nach der Deaktivierung der Sensoroberfläche mit Ethanolamin wurde das CagL Protein auf der Messzelle immobilisiert. Als Referenz diente die Messzelle mit Antikörper. Die Chipoberfläche wurde zusätzlich mit 10 mM Glycin, pH 1.5, gewaschen, um unspezifische Bindungen des CagL Proteins an den Antikörper zu reduzieren. Es wurde ein Immobilisierungsniveau von 600 RU erreicht. Die Bindungsstudien mit Integrin  $\alpha_v\beta_5$  wurden in ME Puffer bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Die durchgeführten Bindungsexperimente zeigen, dass das auf diese Weise immobilisierte CagL Protein biologisch aktiv ist und mit Integrin  $\alpha_v\beta_5$  wechselwirkt. Die Wechselwirkung ist spezifisch, da an der Referenzzelle nur geringe Bindung zu beobachten war (Abb. 6.49).



**Abbildung 6.49:** Bindung des Integrins  $\alpha_v\beta_5$  an CagL Protein.

Während der Bindungsstudien wurde eine Instabilität des Messsystems beobachtet. Die Intensität der detektierten Resonanzkurven zeigte eine abfallende Tendenz bei konstanter Konzentration des Integrins. Verschiedene Faktoren können hier eine Rolle spielen. Möglich ist, dass der verwendete Bindungspuffer (ME Puffer), der Triton X-100 enthält, für die biologische Aktivität des CagL Proteins nicht optimal ist. Des Weiteren ist es denkbar, dass der Protein-Antikörper-Komplex unter diesen Bedingungen nicht stabil ist und während der Regenerierung der Chipoberfläche mit 10 mM Glycin pH 1.5, abgewaschen wurde. Die Verwendung von milderer Substanzen wie 6 M NaCl bzw. 50 mM NaOH resultierten in keiner Regenerierung der Sensoroberfläche. Eine erneute Immobilisierung des CagL Proteins an den His<sub>6</sub>-Tag Antikörper war nicht erfolgreich.

Die Verwendung der *capture method* zur Immobilisierung ist eine Alternative zur direkten Immobilisierung des CagL Proteins mit Beibehalten der biologischen Aktivität des CagL Proteins. Eine Optimierung der experimentellen Bedingungen ist jedoch erforderlich, wobei der Schwerpunkt auf die Regenerierungsbedingungen gesetzt werden sollte.

#### 6.4.4.5 Bindung des CagL Proteins an Fibronectin

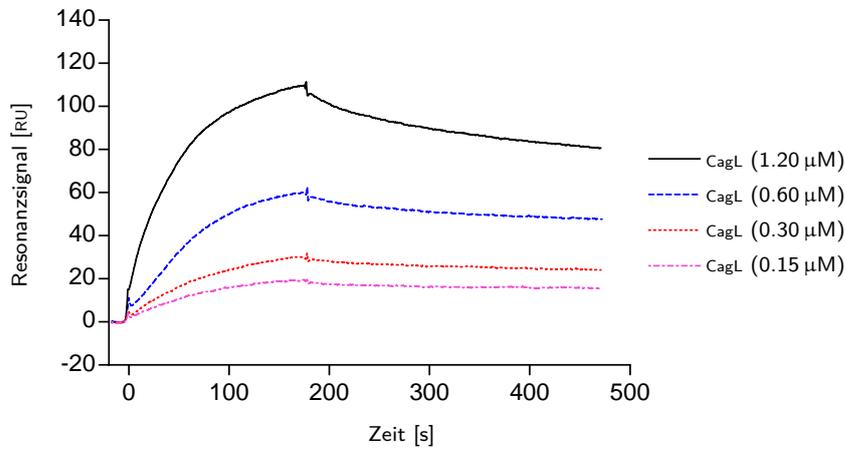
Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Wechselwirkung der CagL Proteine mit humanem Fibronectin in SPR Experimenten untersucht. Erste Hinweise der Wechselwirkung von CagL mit Fibronectin wurden durch Dr. Backert und Dr. Kwok gewonnen.<sup>[244]</sup> Das humane Fibronectin wurde auf der Chipoberfläche eines CM5 Chip mittels Aminokupplungschemie mit EDC/NHS immobilisiert. Es wurde ein Immobilisierungsniveau von 1180 RU erreicht. Die Bindungsstudien wurden in CagL Puffer bei einer Flussgeschwindigkeit von  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  durchgeführt. Nach der Dissoziationsphase wurde die Chipoberfläche mit 10 mM Glycin pH 1.5 regeneriert und mit Laufpuffer gewaschen. Alle drei CagL Proteine wurden auf demselben Sensorchip untersucht. Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in den Abbildungen 6.50, 6.51 und 6.52 dargestellt.

Die Wechselwirkung des CagL Proteins bzw. der Mutanten mit Fibronectin wurden in SPR Experimenten eindeutig nachgewiesen. Die CagL Proteine wurden in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Die Intensität der erhaltenen Kurven (*response*) spiegelt die Konzentrationsreihe der über die Chipoberfläche geleiteten CagL Proteine wider. Für alle drei Wechselwirkungen ähneln sich die Kurven sowohl in der Assoziationsphase wie auch in der Dissoziationsphase. Bei der Injektion der gleichen Konzentrationen ist bei den Mutanten lediglich eine Minderung der Antwort (*response*) zu beobachten. Dies hat aber keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die  $\kappa_D$ -Werte. Abbildung 6.52 zeigt die

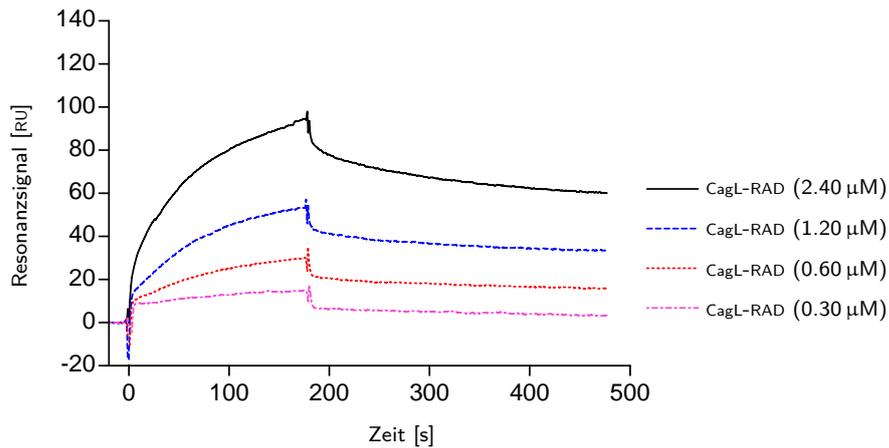
**Tabelle 6.9:** Kinetik der Wechselwirkung des CagL Proteins mit Fibronectin bestimmt mit Hilfe des *Scatchard plot*.

	$\kappa_D (\pm\sigma) [\mu\text{M}]$	$R^2$
CagL	2.0 (0.4)	0.85
CagL-RGA	1.8 (0.7)	0.84
CagL-RAD	9.4 (0.6)	0.88

Kurven für die Wechselwirkung von CagL-RGA Protein mit Fibronectin, wobei bei der Konzentration von  $0.6 \mu\text{M}$  CagL-RGA Protein die Messung zweimal durchgeführt wurde. Bei der Messung zeigen die beiden Kurven den gleichen Verlauf. Dies bestätigt die Stabilität des Messsystems. Die  $\kappa_D$ -Werte wurden mittels *Scatchard-plot* berechnet, da die Auswertung mittels *Biaevaluation software* keine zufriedenstellende Anpassung der Bindungskurven zu dem Bindungsmodell liefert (Tab. 6.9). Der



**Abbildung 6.50:** Bindung des CagL Proteins an immobilisiertes Fibronectin.



**Abbildung 6.51:** Bindung des CagL-RAD Proteins an immobilisiertes Fibronectin.

$\kappa_D$ -Wert für die Wechselwirkung des nativen Proteins mit Fibronectin ( $2.0 \mu\text{M}$ ) ist vergleichbar mit dem für CagL-RGA Protein bestimmten  $\kappa_D$ -Wert ( $1.8 \mu\text{M}$ ). Der  $\kappa_D$ -Wert für das zweite mutierte Protein CagL-RAD ( $9.4 \mu\text{M}$ ) ist im Vergleich zu den anderen zwei Proteinen im Schnitt um Faktor fünf höher. Dies deutet jedoch auch nicht auf eine signifikante Minderung der Affinität des Proteins hin. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die Mutation des RGD Motivs im CagL Protein keinen relevanten Einfluss auf die Interaktion des Proteins mit Fibronectin besitzt. Das Erkennungsmotiv für die Interaktion befindet sich erwartungsgemäß außerhalb der RGD Sequenz.

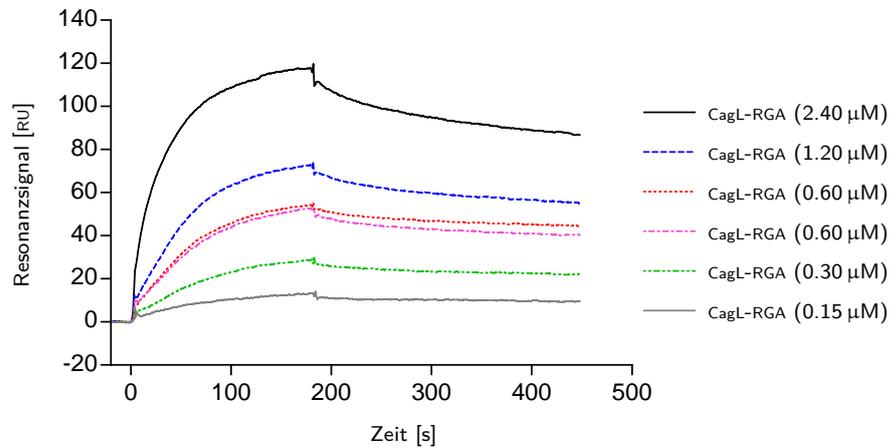


Abbildung 6.52: Bindung des CagL Proteins an immobilisiertes Fibronectin.

#### 6.4.5 Resumé

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fähigkeit des bakteriellen CagL Proteins zur Bindung an humane Integrine bewiesen. Die durchgeführten Konkurrenzexperimente mit Antikörpern zeigen, dass die Integrine  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  als Rezeptoren für das CagL Protein während der Adhäsion der WM115 Zellen in Frage kommen. Die Fähigkeit des CagL Proteins zur Bindung an Integrine wurde in Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten mit isolierten Integrinen  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_5$  bestätigt.

In Zelladhäsionstests führte die Mutation des RGD-Motivs des CagL Proteins zur Minderung der Adhäsion der WM115 Zellen an dieses Protein, was auf die RGD-abhängige Interaktion der Integrine mit dem CagL Protein hindeutet (Abb. 6.33). Die über Integrine vermittelte Bindung der WM115 Zellen an das CagL Protein wurde durch die zyklischen Penta- bzw. Hexapeptide gehemmt, die ein Epitop des CagL Proteins (RGDLA bzw. RGD-LAL) enthalten (Abb. 6.36, Tab. 6.6). Dies bestätigt die RGD-abhängigen Interaktionen zwischen Integrinen und CagL Protein. Die aktivsten Peptide c(RGDLa) **37** und c(RGDLAL) **40** weisen  $IC_{50}$ -Werte von  $0.09 \mu\text{M}$  bzw.  $0.13 \mu\text{M}$  auf.

Die Bindung des CagL Proteins an Integrine wurde in SPR-Bindungsstudien bestätigt. Allerdings waren die Mutationen des RGD Motivs nicht ausreichend, um diese Wechselwirkungen in SPR-Bindungsstudien zu unterbinden. Die Interpretation der Kinetik-Daten erwies sich als schwierig. Die Bindung des CagL Proteins an Integrine besitzt einen komplexen Charakter und kann mit einfacher Bindungskinetik 1:1 nicht bestimmt werden. Zusätzlich wurde in SPR-Experimenten eine Bindung des CagL Proteins an humanes Fibronectin bewiesen. Diese Bindung erfolgt über andere Erkennungssequenzen als das RGD-Motiv.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse einen Einblick in die Interaktion des bakteriellen CagL Proteins mit Integrinen liefern. An dieser Interaktionen ist eindeutig die Erkennungssequenz RGD beteiligt, obwohl es nicht auszuschließen ist, dass andere Erkennungssequenzen in diese Interaktionen involviert sind. Eine vollständige Strukturanalyse der hier untersuchten zyklischen Peptide würde erste Informationen über die strukturelle Präferenz der aktiven Substanzen liefern, die potenziell als Leitstruktur zur Entwicklung neuer pharmakologischer Verbindungen gegen *H. pylori* Infektionen dienen würden. Alle hier präsentierten Daten deuten darauf hin, dass das CagL Protein eine multifunktionelle Rolle während der Infektion der Wirtszelle durch *H. pylori* Bakterium spielen kann. Künftige Arbeiten auf diesem Gebiet, die zur Erklärung der Bindungsmechanismen mit Integrinen und zur Charakterisierung potentieller anderer Erkennungssequenzen sind jedoch erforderlich.

Die Bestimmung der Kristallstruktur des CagL Proteins oder die Erstellung eines Homologie-Modells dieses Proteins würde einen Anhaltspunkt zur Untersuchung potentieller Erkennungssequenzen dieses Proteins darstellen. Das RGD-Motiv sollte auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert sein. Punktmutationen anderer Aminosäuresequenzen, die auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind, würden eine Aussage über die Lokalisierung und Relevanz anderer Erkennungsmotive in diesem Protein liefern. Eine Synthese neuer Peptide, die aufgrund dieser Sequenzen konzipiert wären und folgende Konkurrenzexperimente würden Informationen über potentielle neue Erkennungsmotive komplementieren.



## 7 Zusammenfassung

Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die vor allem in höheren Organismen auf unterschiedlichen Zelltypen vorkommen. Durch hochspezifische Wechselwirkungen mit natürlichen Liganden vermitteln Integrine eine Vielfalt biologischer Prozesse, die für einen korrekten Ablauf physiologischer Phänomene von substantieller Bedeutung sind. So sind die Integrine an der Regulierung der Embryogenese, der Wundheilung, der Knochenfunktionen oder der Immunantwort beteiligt. Sie können ebenfalls an pathologischen Prozessen teilnehmen. Auf diese Weise spielen Integrine eine wichtige Rolle z. B. bei der tumorinduzierten Angiogenese, bei chronischen Immunkrankheiten oder bei der Tumormetastasierung. Molekulare Erkennung während der Infektion eines Organismus mit Viren oder Bakterien wird auch häufig über Integrine vermittelt.

Auf molekularer Ebene erfolgt die Erkennung der Liganden durch Integrine über kurze Aminosäuresequenzen, häufig Tripeptide, welche auf der Oberfläche eines Liganden lokalisiert sind. Die dreidimensionale Struktur einer Erkennungssequenz spielt für die biologische Aktivität und Selektivität eines Liganden eine eminente Rolle. Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts entwickelte die Arbeitsgruppe Kessler das *spatial screening*-Verfahren, welches zur Suche nach neuen aktiven Strukturen eingesetzt wird. Diese Methode beruht auf der Synthese stereoisomerer Peptide und anschließender Untersuchung der biologischen Aktivität. Die Anwendung dieser Methode führte bislang zu aktiveren und selektiveren Peptid- und Peptidomimetika-Integrinliganden und zur Markteinführung einiger Substanzen als Therapeutika (Integrilin<sup>®</sup>, Lamifiban).<sup>[123,135]</sup>

Im Fokus dieser Arbeit stellt die Suche nach neuen peptidischen Integrinliganden. Dazu wurden verschiedene Forschungsprojekte bearbeitet, in welchen spezielle Wechselwirkungen zwischen Integrinen und Liganden und der Einfluss von chemisch modifizierten Peptiden auf diese Interaktionen ausführlich untersucht wurden. Zur Charakterisierung der Protein-Protein und Protein-Peptid Wechselwirkungen gelang es, entsprechende Assaysysteme zu entwickeln.

Für die molekulare Erkennung zwischen Integrin  $\alpha_4\beta_1$  und seinem natürlichen Liganden VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) war vermutet worden, dass das Bindungsepitop TQIDSPLN verantwortlich ist.<sup>[65]</sup> Diese Interaktion ist relevant sowohl für die physiologische

Immunantwort eines Organismus als auch für Immunerkrankungen.<sup>[62,65]</sup> In dieser Arbeit wurde der Einfluss der nach dem *spatial screening*-Verfahren konzipierten zyklischen Peptide **1-21** auf diese Wechselwirkung untersucht. Die Sequenz der untersuchten Peptide wurde anhand der mutmaßlichen Erkennungssequenz (TQIDSPLN) des VCAM-1 ausgewählt und die Konformation der Peptide wurde durch Einbau bestimmter  $\beta$ - (z. B. Acpc, Achc, Ambs) und D-Aminosäuren beeinflusst.

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Integrin  $\alpha_4\beta_1$  mit VCAM-1 wurde ein Zelladhäsionstest entwickelt, in welchem die Bindung der Integrin  $\alpha_4\beta_1$ -exprimierenden Zellen an VCAM-1 bestimmt wurde. Diese Adhäsion konnte erfolgreich mit dem monoklonalen Antikörper gegen Integrin  $\alpha_4\beta_1$  in nanomolarer Konzentration gehemmt werden, was die Vermittlung dieser Interaktion über Integrin  $\alpha_4\beta_1$  bestätigt. Alle untersuchten Peptide zeigten jedoch keine signifikante Affinität zu Integrin  $\alpha_4\beta_1$ . Unerwarteterweise erwies sich auch das literaturbekannte Oktapeptid cyclo(-Thr-Ala-Ile-Asp-Ala-Pro-Asn-Ala-) **22**, für welches durch Quan *et al.* ein  $IC_{50}$ -Wert im mikromolaren Bereich bestimmt worden war, als nicht aktiv.<sup>[66]</sup>

Anhand der Konformationsanalyse durch Strijowski konnte in einigen Fällen die nicht vorhandene biologische Aktivität erklärt werden. Die Peptide mit den inkorporierten  $\beta$ -Aminosäuren Achc, Acpc und Acmb zeigten keine zufriedenstellende konformationelle Ähnlichkeit mit dem Bindungsepitop von VCAM-1.<sup>[140]</sup> Die durch Guthöhrlein durchgeführte Konformationsanalyse einiger der hier untersuchten Peptide mit inkorporierten  $\beta$ -Homoaminosäuren zeigte jedoch relativ gute konformationelle Übereinstimmung der Struktur (cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-Asp-) **1** und cyclo(-Ser- $\beta^h$ Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-) **10**) mit dem mutmaßlichen Erkennungsmotiv TQIDSPLN von VCAM-1.<sup>[212]</sup> Die Diskrepanz zwischen der strukturellen Übereinstimmung dieser Peptide und dem Mangel an biologischer Aktivität konnte nicht geklärt werden. Da die dreidimensionale Struktur der Oktapeptide durch Quan *et al.* aufgrund großer Beweglichkeit des Peptidrückgrats nicht bestimmt werden konnte, bleibt die Frage unbeantwortet, welche konformationelle Präferenz Integrin  $\alpha_4\beta_1$ -Liganden aufweisen müssen, um einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Interaktion dieses Integrins mit VCAM-1 ausüben zu können.

Des Weiteren wurde ADAM8 Protein als Integrinligand untersucht. Zu den lebenswichtigen Prozessen, die durch Wechselwirkungen der ADAM Proteine mit Integrinen reguliert werden, gehören unter anderem Fertilisation, Embryogenese und Immunantwort eines Organismus. Die Beteiligung dieser Proteine an pathologischen Prozessen, wie z. B. Immunerkrankungen des zentralen Nervensystems<sup>[99]</sup>, weckt Interesse an Forschung und Entwicklung aktiver Inhibitoren dieser Interaktionen. ADAM Proteine enthalten unter anderem eine Disintegrin-Domäne, die eine hohe Sequenzhomologie zu den Disintegrinen,

---

bekannten Integrinliganden aufweist. Bei einigen ADAM Proteinen, wie z. B. ADAM15 und ADAM28, wurden die Erkennungssequenzen für die Interaktion mit Integrinen innerhalb Disintegrin-Schleife dieser Domäne gefunden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das humane ADAM8 Protein als Integrinligand untersucht. Mit Hilfe von Durchflusszytometrie-Untersuchungen wurde gezeigt, dass dieses Protein ein Ligand humaner Integrine ist. Die Erkennungssequenz dieser Interaktionen ist jedoch wahrscheinlich nicht das KDM-Aminosäuremotiv, welches anhand einer Sequenzhomologie-Analyse der ADAM Proteine vorgeschlagen wurde. Konkurrenzexperimente zeigten, dass die zyklischen KDM-Hexapeptide keinen inhibitorischen Einfluss auf die Interaktion von hADAM8 mit Integrinen aufweisen. Um eine genaue Aussage über die Lokalisierung der Erkennungssequenz in hADAM8 zu treffen, sind weitere Experimente erforderlich. Mutagenesestudien der Disintegrin-Domäne von hADAM8 und Untersuchungen neuer Peptide, die aufgrund überlappender Sequenzen der Disintegrin-Domäne des hADAM8 konzipiert sind, würden einen detaillierten Einblick in diese Interaktion ermöglichen.

Des Weiteren wurde versucht, den Einfluss zyklischer KDK-Hexapeptide auf die homophile Interaktion des murinen ADAM8 zu untersuchen. Unerwarteterweise konnte das von Schlomann *et al.* beschriebene Assaysystem zur Untersuchung homophiler Interaktionen des mADAM8 nicht reproduziert werden. Eine plausible Erklärung der nicht erfolgreichen Etablierung dieses Assays ist auf die verfehlte Wahl des Expressionssystems, das von Schlomann *et al.* zur Herstellung des nativen mADAM8 Proteins verwendet wurde, zurückzuführen. Säugerproteine, wie z. B. mADAM8, besitzen häufig Disulfidbrücken und sind posttranslational modifiziert. Aus diesem Grund können diese im bakteriellen System nicht korrekt gefaltet werden. Damit stellt die Auswahl des von Schlomann *et al.* verwendeten bakteriellen Expressionssystems zur Herstellung des nativen ADAM8 einen konzeptionellen Fehler dar.<sup>[98]</sup> Die biologische Aktivität von zyklischen KDK-Peptiden konnte daher nicht bestimmt werden. Eine erfolgreiche Etablierung eines Messsystems zur Untersuchung homophiler Wechselwirkung von mADAM8 erfordert eine erneute Klonierung dieses Proteins im höheren Expressionssystem, wie z. B. Insektenzellen oder Säugerzellen.

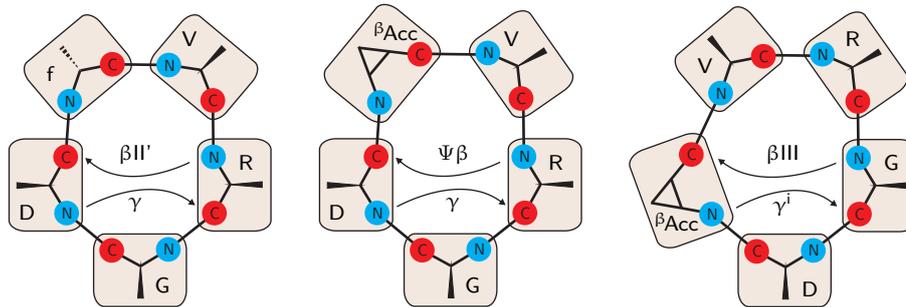
Der überwiegende Teil dieser Arbeit konzentriert sich auf die RGD-abhängigen Bindungen der Liganden an Integrine. Das RGD-Erkennungsmotiv stellt eine der wichtigsten Erkennungssequenzen der Integrine dar. Sie wird sowohl durch Proteine des extrazellulären Raums als auch durch Oberflächenrezeptoren anderer Zellen präsentiert.

Es wurde gezeigt, dass die Inkorporation einer konformationell eingeschränkten  $\beta$ -Aminosäure ( $\beta$ Acc) in das Peptidrückgrat zu einem neuen potenten Liganden mit erhöhter Selektivität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  führte. Der Einfluss der neuen zyklischen RGD-Peptide cyclo-

(-Arg-Gly-Asp-(+)<sup>β</sup>Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-)<sup>β</sup>Acc-Val-) **34** auf die Wechselwirkung der Integrine mit Matrixproteinen wurde sowohl in Adhäsionstests mit humanen Zellen als auch in Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten untersucht. Im Zelladhäsionstest mit WM115 Zellen und Vitronectin wurden die inhibitorischen Eigenschaften beider Peptide nachgewiesen. Die Konkurrenzexperimente mit monoklonalen Antikörpern zeigten, dass die Bindung der WM115 Zellen an Vitronectin hauptsächlich über Integrin  $\alpha_v\beta_3$  erfolgt. Die relative Selektivität der beiden Peptide **33** und **34** wurde durch Bestimmung der Affinität dieser Peptide zu Integrin  $\alpha_5\beta_1$  untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zelladhäsionstests mit Integrin  $\alpha_5\beta_1$ -präsentierenden K562 Zellen und Fibronectin als Integrinligand durchgeführt.<sup>[52]</sup> In biologischen Tests wurde bewiesen, dass der Einbau der  $\beta$ -Aminosäure (<sup>β</sup>Acc) in die Peptide cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+)<sup>β</sup>Acc-Val-) **33** und cyclo(-Arg-Gly-Asp(-)<sup>β</sup>Acc-Val-) **34** zu dem neuen Liganden **33** mit erhöhter Affinität und Selektivität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  führte. Für das Peptid **33** wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0.02  $\mu$ M in Zelladhäsionstests mit WM115 Zellen und Vitronectin bestimmt; es erwies sich dabei zehnfach aktiver als das literaturbekannte Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) (IC<sub>50</sub>-Wert von 0.2  $\mu$ M).

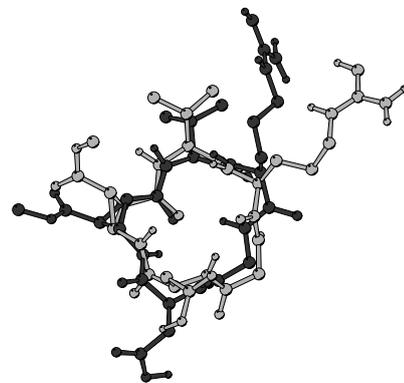
Die biologische Aktivität der beiden Peptide **33** und **34** wurde in Konkurrenzexperimenten mittels SPR-Studien bestätigt. Zu diesem Zweck wurde ein Messsystem mit immobilisiertem humanem Vitronectin und Membranextrakten aus WM115 Zellen, die als Quelle nativer Integrine dienen, entwickelt. In Konkurrenzexperimenten wurden die Membranextrakte aus WM115 Zellen mit Peptiden **33** und **34** inkubiert und untersucht. Erwartungsgemäß konnte die Bindung der Integrine an Vitronectin durch beide Peptide **33** und **34** reduziert werden. Bei dem Peptid **33** war die Minderung des Resonanzsignals stärker ausgeprägt. Dies bestätigte die höhere Affinität des Peptides **33** zu untersuchten Integrinen.

Die biologische Aktivität und Selektivität beider Peptide **33** und **34** konnte im Zusammenhang mit der durch Gaus durchgeführten Strukturanalyse dieser Peptide und im Kontext bereit bekannter Struktur-Wirkungs-Beziehungen erklärt werden.<sup>[232]</sup> Die Strukturanalyse zeigte, dass in Peptid **33** die RGD-Aminosäuresequenz in einem  $\gamma$ -turn positioniert ist und eine geknickte Konformation einnimmt. Diese Konformation ist spezifisch für die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -selektiven Liganden. Sie wird auch im literaturbekannten Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) gefunden und ist durch den relativ kleinen Abstand zwischen den C<sup>β</sup>-Atomen von Asp und Arg charakterisiert. In Peptid **33** beträgt dieser Abstand 706 pm. Der Abstand zwischen den C<sup>β</sup>-Atomen von Asp und Arg in dem Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) ist ebenfalls klein und beträgt 668 pm. Damit zeigt Peptid **33** eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu dem Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-), welches eine erhöhte



**Abbildung 7.1:** Schematische Darstellung der Strukturen der Peptide c(RGDfV) **31** (links), c(RGD-(+)<sup>β</sup>Acc-V) **33** (mittig), c(RGD-(-)<sup>β</sup>Acc-V) **34** (rechts).

Affinität und Selektivität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  aufweist. Im Peptid **34** ist ein  $\beta$ III-turn mit Val in der  $i+1$  Position und ein  $\gamma^i$ -turn mit zentral positioniertem Asp zu finden. Somit nimmt das RGD-Motiv eine gestrecktere Konformation ein, die für die geringere Affinität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  verantwortlich ist. Der Abstand zwischen den C<sup>β</sup>-Atomen von Asp und Arg in diesem Peptid ist deutlich größer und beträgt 826 pm (Abb. 7.1, 7.2).<sup>[232]</sup> Die Struktur dieses Peptides ähnelt einem anderen in der Literatur beschriebenen Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-). Darin nimmt das RGD-Motiv eine gestreckte Konformation ein, die mit einem Abstand zwischen den C<sup>β</sup>-Atomen von Asp und Arg von 905 nm und einer geringeren Affinität zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  einher geht.



**Abbildung 7.2:** Überlagerung der Strukturen der Peptide **33** (grau) und **34** (schwarz).<sup>[232]</sup>

Weiterhin wurden Studien zur Untersuchung der Wechselwirkung des bakteriellen CagL Proteins aus *Helicobacter pylori* mit humanen Integrinen begonnen. Das CagL Protein enthält ein RGD-Motiv und ist ein Bestandteil des bakteriellen Sekretionssystems TFSS (*type four secretion system*). Somit können seine Interaktionen mit Integrinen bei der Verankerung vom *H. pylori*-Bakterium an der Oberfläche der Wirtszelle und der darauf folgenden Infektion eines Organismus eine signifikante Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zu beweisen, dass das CagL Protein zu einer RGD-abhängigen Bindung an Integrine fähig ist, und dass diese Interaktionen durch zyklische RGD-Peptide gehemmt werden können. Um die Interaktion von CagL Protein mit Integrinen zu untersuchen, wurden zuerst Zelladhäsionstests mit Integrin-präsentierenden humanen

Zellen entwickelt. Als Modellzelllinie wurden in biologischen Tests WM115 Zellen verwendet, welche Integrine  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_3\beta_1$  auf der Oberfläche präsentieren. In Kompetitionsexperimenten mit spezifischen Antikörpern gegen Integrine wurde gezeigt, dass die Adhäsion dieser Zellen an CagL Protein über Integrine vermittelt wird. Punktmutationen des vorgeschlagenen RGD-Erkennungsmotivs im CagL Protein führten zur Verminderung der Bindung dieser Zellen an CagL, was die wichtige Funktion des RGD-Motivs während der Interaktion zwischen Integrinen und CagL bewiesen hat. Die Relevanz des RGD-Motivs als Erkennungssequenz für Integrine wurde in Kompetitionsstudien mit zyklischen Peptiden bestätigt. Die Bindung des CagL Proteins an humane Integrine konnte durch zyklische RGD-Penta- und RGD-Hexapeptide gehemmt werden. Die aktivsten Peptidliganden cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-D-Ala-) **37** und cyclo(-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala-D-Leu-) **40** wurden mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0.09 \mu\text{M}$  bzw.  $0.13 \mu\text{M}$  bestimmt. Die Bindung des bakteriellen CagL Proteins an humane Integrine konnte auf molekularer Ebene in SPR-Experimenten mit isolierten Rezeptoren  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  nachgewiesen werden. Allerdings wurde gezeigt, dass die Bindung von CagL an Integrine nicht mit einer einfachen 1:1 Kinetik beschrieben werden kann. Zusätzlich wurde bewiesen, dass das CagL Protein ebenfalls ein Ligand des Matrixproteins Fibronectin ist. Alle hier erzielten Ergebnisse brachten einen Einblick in die multifunktionelle Rolle, die das CagL Protein während der Infektion der Wirtszelle durch *H. pylori* möglicherweise spielt. Die Aufklärung der Struktur der aktiven zyklischen Peptide wird im besseren Verständnis der Aktivität-Wirkungs-Beziehungen resultieren und kann zu einer Leitstruktur führen, die zur Entwicklung neuer pharmakologischer Verbindungen gegen *H. pylori*-Infektionen dienen kann.

## Literaturverzeichnis

- [1] J. W. Tamkun, D. W. D. Simone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A.-F. Horwitz, R. O. Hynes, Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin, *Cell* **1986**, *46*, 271–282.
- [2] L. T. Dunog, G. A. Rodan, Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation, *Front. Biosci.* **1998**, *3*, 757–768.
- [3] R. O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [4] C. A. Whittaker, R. O. Hynes, Distribution and evolution of the Willebrand/integrin A domain: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere, *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 3369–3387.
- [5] J. A. McDonald, Integrins minireview series, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21783.
- [6] M. J. Humphries, Integrin structure, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311–339.
- [7] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, Ligand binding to integrins, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788.
- [8] J. M. de Pereda, G. Wiche, R. C. Liddington, Crystal structure of the tandem pair of fibronectin type III domains from the cytoplasmic tail of integrin  $\alpha_6\beta_4$ , *EMBO J.* **1999**, *18*, 4087–4095.
- [9] T. A. Springer, Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin  $\alpha$ -subunits into a  $\beta$ -propeller domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 65–72.
- [10] A. L. Corbi, J. Garcia-Aguilar, T. A. Springer, Genomic structure of an integrin  $\alpha$  subunit, the leukocyte p150.95 molecule, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 2782–2788.
- [11] R. H. Kretsinger, Calcium-binding proteins, *Ann. Rev. Biochem.* **1976**, *75*, 239–266.
- [12] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1. Auflage **1994**.
- [13] R. S. Larson, A. L. Corbi, L. Berman, T. Springer, Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1  $\alpha$  subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily, *J. Cell Biol.* **1989**, *108*, 703–712.

- [14] A. Colomabatti, P. Bonaldo, The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms, *Blood* **1991**, *77*, 2305–2315.
- [15] M. Michishita, V. Videm, M. A. Arnaout, A novel divalent cation-binding site in the a domain of the  $\beta_2$  integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding, *Cell* **1993**, *72*, 857–867.
- [16] M. S. Diamond, J. Garcia-Aguilar, J. K. Bickford, A. L. Corbi, T. A. Springer, The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18), *Cell* **1993**, *120*, 1031–1043.
- [17] J.-O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, R. Liddington, Crystal structure of the A domain from the  $\alpha$  subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18), *Cell* **1995**, *80*, 631–638.
- [18] J. Emsley, S. L. King, J. M. Bergelson, R. C. Liddington, Crystal structure of the I domain from integrin  $\alpha_2\beta_1$ , *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28512–28517.
- [19] M. Shimaoka, J. Takagi, T. A. Springer, Conformational regulation of integrin structure and function, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, *31*, 485–516.
- [20] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, Stereoisomere Peptid-Bibliotheken und Peptidmimetika zum Design von selektiven Inhibitoren des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins für eine neuartige Krebstherapie, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440–1456.
- [21] R. O. Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* **1992**, *69*, 11–25.
- [22] J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$ , *Science* **2001**, *294*, 339–345.
- [23] Q. Zhang, T. A. Springer, Amino acid residues in the PSI domain and cystein-rich repeats of the integrin  $\beta$  subunit that restrain activation of the integrin  $\alpha_X\beta_2$ , *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6922–6929.
- [24] N. Beglova, S. C. Blacklow, J. Takagi, T. A. Springer, Cystein-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 282–287.
- [25] J. Takagi, N. Beglova, P. Yalamanchili, S. C. Blacklow, T. A. Springer, Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin  $\beta$  subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 11175–11180.
- [26] C. Huang, T. A. Springer, A binding interface on the I domain of lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19008–19016.

- [27] T. Kamata, R. Wright, Y. Takada, Critical threonine and aspartic acid residues within the I domain of  $\beta_2$  integrins for interactions with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and C3bi, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 12531–12535.
- [28] A. M. Randi, N. Hogg, I domain of  $\beta_2$  integrin lymphocyte function-associated antigen-1 contains a binding site for ligand intercellular adhesion molecule-1, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12395–12398.
- [29] J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, R. C. Liddington, Structural basis of collagen recognition by integrin  $\alpha_2\beta_1$ , *Cell* **2000**, *101*, 47–56.
- [30] A. Qu, D. J. Leahy, The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin, *Structure* **1996**, *4*, 931–942.
- [31] J. Takagi, T. A. Springer, Integrin activation and structural rearrangement, *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 141–163.
- [32] S. J. Shattil, H. Kashiwagi, N. Pampori, Integrin signaling: the platelet paradigm, *Blood* **1998**, *91*, 2645–2657.
- [33] K. E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler, A three-state mechanism of integrin activation and signal transduction for integrin  $\alpha_v\beta_3$ , *ChemBioChem* **2002**, *3*, 470–473.
- [34] K. E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brunger, H. Kessler, Transmembrane signal transduction of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin, *Prot. Sci.* **2002**, *11*, 1800–1812.
- [35] E. A. Clark, J. S. Brugge, Integrins and signal transduction pathways: the road taken, *Science* **1995**, *268*, 233–239.
- [36] F. G. Giancotti, Complexity and specificity of integrin signaling, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 13–14.
- [37] S. Miyake, H. Yagita, H. Maruyama, H. Hashimoto, N. Miyasaka, K. Okumura, Beta 1 integrin-mediated interaction with extracellular matrix proteins regulates cytokine gene expression in synovial fluid cells of rheumatoid arthritis patients, *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 863–868.
- [38] T. Werb, P. M. Tremble, O. Behrendtsen, E. Crowley, C. H. Damsky, Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression, *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 877–889.
- [39] M. H. Ginsberg, A. Partridge, S. J. Shattil, Integrin regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 509–516.
- [40] W. Li, D. G. Metcalf, R. Gorelik, R. Li, N. Mitra, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. Degrado, J. S. Benneth, A push-pull mechanism for regulating integrin function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 1424–1429.

- [41] J. B. Knight, K. Yamauchi, J. E. Pessin, Divergent insulin and platelet-derived growth factor regulation of focal adhesion kinase (pp125FAK) tyrosine phosphorylation and rearrangements of actin stress fiber, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10199–10203.
- [42] C. V. Carman, T. A. Springer, Integrin avidity regulation: are changes and conformation underemphasized?, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 547–556.
- [43] M. E. Hemler, Specific tetraspanin functions, *J. Cell. Biol.* **2001**, *155*, 1103–1107.
- [44] R. L. Yauch, M. E. Hemler, Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase, *Biochem. J.* **2000**, *351*, 629–637.
- [45] G. A. Driver, R. B. Veale, Modulation of integrin-linked kinase (ILK) expression in human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines by the EGF and TGF $\beta$ 1, *Cancer Cell Int.* **2006**, *6*, 1–12.
- [46] G. P. Curley, H. Blum, M. J. Humphries, Integrin antagonists, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 427–441.
- [47] D. M. Rose, J. Han, M. H. Ginsberg,  $\alpha_4$  integrins and the immune response, *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 118–124.
- [48] T. Kwok, R. Hartig, M. Rohde, R. Misselwitz, J. Berger, S. Urman, N. Sewald, W. König, S. Backert, The RGD motif of *Helicobacter pylori* CagL lures integrin into type IV secretion **2007**, in Vorbereitung.
- [49] J. M. Bergelson, M. P. Sheply, B. M. C. Chan, M. E. Hemler, R. W. Finberg, Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1, *Science* **1992**, *255*, 1718–1720.
- [50] D. Bigler, Y. Takahashi, M. S. Chen, E. A. C. Almeida, L. Osbourne, J. M. White, Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 and murine eggs, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11576–11584.
- [51] M. A. T. Gimez, J. E. Sim, J. H. Russell, TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation, *J. Neuroimmunol.* **2004**, *151*, 116–125.
- [52] D. Zimmermann, *Der Einfluss cyclischer RGD-Peptide auf die Wechselwirkung Fibronectin-Integrin  $\alpha_5\beta_1$* , Dissertation, Universität Bielefeld **2003**.
- [53] D. Zimmermann., E. Guthöhrlein, M. Malešević, K. Sewald, L. Wobbe, C. Hegemann, N. Sewald, Integrin  $\alpha_5\beta_1$  ligands: biological evaluation and conformational analysis, *ChemBioChem.* **2005**, *6*, 272–276.
- [54] P. Schaffner, M. M. Dard, Structure and function of RGD peptides involved in bone biology, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 119–132.

- 
- [55] J. A. Eble, K. Kühn, *Integrin–ligand interaction*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany **1997**.
- [56] E. Ruoslahti, RGD and other recognition sequences for integrins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
- [57] S. Johansson, G. Svineng, K. Wennerberg, A. Armulik, L. Lohikangas, Fibronectin-integrin interactions, *Front. Biosci.* **1997**, *2*, 126–146.
- [58] L. L. Chen, R. Lobb, J. H. Cuevo, K.-C. Lin, S. P. Adams, R. B. Pepinsky, Identification of ligand binding sites on integrin  $\alpha_4\beta_1$  through chemical cross-linking, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8743–8753.
- [59] M. R. Campanero, R. Pulido, M. A. Ursa, M. Ridriguez-Moyo, M. O. de Landazuri, F. Sanchez-Madrid, An alternative leukocyte homotypic adhesion mechanism, LFA-1/ICAM-1-independent, triggered through the human VLA-4 integrin, *J. Cell Biol.* **1990**, *110*, 2157–2165.
- [60] M. J. Humphries, A. Komoriya, S. K. Akiyama, K. Olden, K. M. Yamada, Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6886–6892.
- [61] A. P. Mould, M. J. Humphries, Identification of a novel recognition sequence for the integrin  $\alpha_4\beta_1$  in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin, *EMBO J.* **1991**, *10*, 4089–4095.
- [62] T. M. Carlos, B. R. Schwartz, N. L. Kovach, E. Yee, M. Rosa, L. Osborn, G. Chi-Rosso, B. Newmann, R. Lobb, M. J. Rosa, Vascular cell adhesion molecule 1 mediates lymphocytes adherence to cytokin-activated cultured human endothelial cells, *Blood* **1990**, *76*, 965–970.
- [63] P. J. Simmons, B. Masinovsky, B. M. Longenecker, R. Berenson, B. Torok-Strob, W. M. Gallatin, Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells, *Blood* **1992**, *80*, 388–395.
- [64] J.-H. Wang, R. B. Pepinsky, T. Stehle, J.-H. Liu, M. Karpusas, B. Browning, L. Osborn, The crystal structure of an N-terminal two domain fragment of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1): a cyclic peptide based on the domain 1 C-D loop can inhibit VCAM-1- $\alpha_4$  integrin interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5714–5718.
- [65] J.-H. Wang, Protein recognition by cell surface receptors: physiological receptors versus interactions, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 122–126.

- [66] C. Quan, N. J. Skelton, K. Clark, D. Y. Jackson, M. E. Renz, H. H. Chiu, S. M. Keating, M. H. Beresini, S. Fong, D. R. Artis, Transfer of a protein binding epitope to a minimal designed peptide, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **1998**, *47*, 265–267.
- [67] M. D. Bale, L. A. Wohlfart, D. F. Mosher, B. Tomasini, R. C. Sutton, Identification of vitronectin as a major plasma protein absorbed on polymer surfaces of different copolymer composition, *Blood* **1989**, *74*, 2698–2706.
- [68] K. T. Preissner, Structure and biological role of vitronectin, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1991**, *7*, 275–310.
- [69] S. Suzuki, A. Oldberg, E. G. Hayman, M. D. Pierschbacher, E. Rouslahti, Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin, *EMBO J.* **1985**, *4*, 2519–2524.
- [70] A. Mayasundari, N. A. Whittemore, E. H. Serpersu, C. B. Peterson, Somatomedin-B domain of human plasma vitronectin, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29359–29366.
- [71] D. Jenne, K. K. Stanley, Nucleotide sequence and organisation of the human S-protein gene: repeating peptide motifs in the “pexin“ family and a model for their evolution, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6735–6742.
- [72] T. Kreis, R. Vale (Herausgeber), *Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*, Oxford University Press Inc., New York, 2 Auflage **1999**.
- [73] M. Izumi, K. M. Yamada, M. Hayashi, Vitronectin exists in two structurally and functionally distinct forms in human plasma, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *990*, 101–108.
- [74] L. Paili, P. Hammel, C. Uherek, F. Bachmann, R. H. Gisler, D. Dunon, B. A. Imhof, CD31/PECAM-1 is a ligand for  $\alpha_v\beta_3$  integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium, *J. Cell Biol.* **1995**, *130*, 451–460.
- [75] S. Strömblad, D. A. Cheresh, Integrins, angiogenesis and vascular cell survival, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 881–885.
- [76] L. A. Liotta, P. S. Steeg, W. G. Stetler-Stevenson, Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation, *Cell* **1991**, *64*, 327–336.
- [77] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Zambonin Zallone, Adhesion properties and integrin expression of cultured human osteoclast-like cells, *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 209–218.
- [78] J. Savill, I. Dransfield, N. Hogg, C. Haslett, Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis, *Nature* **1990**, *343*, 170–173.
- [79] R. O. Hynes, A. D. Lander, Contact and adhesive specificities in the association, migration, and targeting of cells and axons, *Cell* **1992**, *68*, 303–322.

- [80] J. Folkman, M. Klagsburg, Angiogenic factors, *Science* **1987**, *235*, 442–447.
- [81] S. Aznavoorian, M. L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, L. A. Liotta, Integrin  $\alpha_v\beta_3$  mediates chemotactic and haptotactic motility in human melanoma cells through different signaling pathways, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3247–3254.
- [82] W. Stocker, F. Grams, U. Baumann, P. Reinemann, F. X. Gomis-Ruth, D. B. McKay, W. Bode, The metzincins - topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralyisin, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases, *Prot. Sci.* **1995**, *4*, 823–840.
- [83] D. F. Seals, S. A. Courtneidge, The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 7–30.
- [84] B. J. Gilpin, F. Loechel, M. G. Mattei, E. Engvall, R. Albrechtsen, U. M. Wewer, A novel, secreted form of human ADAM12 (meltrin  $\alpha$ ) provokes myogenesis in vivo, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 157–166.
- [85] L. Lum, M. S. Reid, C. P. Blobel, Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26236–26247.
- [86] A. Anders, S. Gilbert, W. Garten, R. Postina, F. Fahrenholz, Regulation of the  $\alpha$ -secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertase, *FASEB J.* **2001**, *15*, 1837.
- [87] M. E. Milla, M. A. Leesnitzer, M. L. Moss, W. C. Clay, H. L. Carter, A. B. Miller, J. L. Su, M. H. Lambert, D. H. Willard, D. M. Sheeley, Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE), *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30563–30570.
- [88] K. Maskos, C. Ferananden-Catalan, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, G. A. Ellestad, P. Reddy, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, B. J. Castner, Crystal structure of the catalytic domain of human tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 3408–3412.
- [89] K. Brew, D. Dinakarpanthian, H. Nagase, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochim. Biophysic. Acta* **2000**, *1477*, 267–283.
- [90] A. Amour, C. G. Knight, C. G. Webster, A. Slocombe, P. E. Stephens, V. Knauper, A. J. Docherty, G. Murphy, The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3, *FEBS Lett.* **2000**, *473*, 275–279.
- [91] A. Amour, C. G. Knight, W. R. English, A. Webster, P. M. Slocombe, V. Knäuper, A. J. P. Docherty, J. D. Becherer, C. P. Blobel, G. Murphy, The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs, *FEBS Lett.* **2002**, *524*, 154–158.
- [92] C. P. Blobel, J. White, Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, *4*, 760–765.

- [93] D. Nath, P.-M. Slocombe, P. E. Stephens, A. Warn, G. R. Hutchinson, K. M. Yamada, A. J. P. Docherty, G. Murphy, Interaction of metargidin (ADAM-15) with  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins on different haemopoietic cells, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 579–587.
- [94] X.-P. Zhang, T. Kamata, K. Yokoyama, W. Puzon-McLaughlin, Y. Takada, Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin  $\alpha_v\beta_3$ , *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7345–7350.
- [95] K. Eto, W. Puzon-McLaughlin, D. Sheppard, A. Sehara-Fujisawa, X.-P. Zhang, Y. Takada, RGD-independent binding of integrin  $\alpha_9\beta_1$  to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediated cell-cell interaction, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34992–34930.
- [96] A. L. Stone, M. Kroeger, Q. X. Amy Sang, Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review), *J. Protein Chem.* **1999**, *18*, 447–465.
- [97] L. C. Bridges, K. R. Hanson, P. H. Tani, T. Mather, R. D. Bowditch, Integrin  $\alpha_4\beta_1$ -dependent adhesion to ADAM 28 (MDC-L) requires an extended surface of the disintegrin domain, *Biochemistry* **2003**, *42*, 3734–3741.
- [98] U. Schlomann, D. Wildeboer, A. Websters, O. Antropova, D. Zeuschner, C. G. Knight, A. J. P. Docherty, M. Lambert, L. Skelton, H. Jockusch, J. W. Bartsch, The metalloprotease disintegrin ADAM8, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48210–48219.
- [99] H. J. Schluesener, The disintegrin domain of ADAM8 enhances protection against rat experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis by a polyvalent autoantigen vaccine, *J. Neuroimmunol.* **1998**, *87*, 197–202.
- [100] R. R. Isberg, G. T. van Nhieu, Binding and internalisation of microorganisms by integrin receptors, *Trends Microbiol.* **1994**, *2*, 10–14.
- [101] T. J. Wickham, E. J. Filardo, D. A. Cheresh, G. R. Nemerow, Integrin  $\alpha_v\beta_3$  selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization, *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 257–264.
- [102] D. Sheppard, Functions of pulmonary epithelial integrins: from development to disease, *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 673–686.
- [103] R. R. Isberg, P. Barnes, Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 21–28.
- [104] J. Dellacasagrande, E. Ghigo, S. Macherui-El, R. Toman, D. Raoult, C. Capo, J.-L. Mege,  $\alpha_v\beta_3$  Integrin and bacterial lipopolysaccharide are involved in *Coxiella burnetii*-stimulated production of tumor necrosis factor by human monocytes, *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 5673–5678.

- 
- [105] M. Asahi, T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagai, M. Tsubokawa, Y. Tohyama, S. Maeda, M. Omata, T. Suzuki, C. Sasakawa, *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells, *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 593–602.
- [106] S. Das, J. C. Sierra, K. V. Soman, G. Suarez, A. A. Mohammad, T. A. T. Dang, B. A. Luxon, V. E. Reyes, Differential protein expression profiles of gastric epithelial cells following *Helicobacter pylori* infection using proteinchips, *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 920–930.
- [107] S. Backert, T. Kwok, W. König, Conjugative plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori* mediated by chromosomally encoded relaxe and TraG-like proteins, *Microbiology* **2005**, *151*, 3493–3503.
- [108] D. M. Monack, A. Mueller, S. Falkow, Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immun system, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 747–765.
- [109] K. M. Bourzac, K. Guillemin, *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion, *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 911–919.
- [110] E. Cascales, P. J. Christie, The versatile bacterial type IV secretion systems, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 137–149.
- [111] M. Rohde, J. Püls, R. Buhrdorf, W. Fischer, R. Haas, A novel sheated surface organelle of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system, *Mol. Microbiol.* **2003**, *49*, 219–234.
- [112] P. J. Christie, Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines, *Mol. Microbiol.* **2001**, *40*, 294–305.
- [113] A. Covacci, J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Personnet, R. Rappuoli, *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography, *Science* **1999**, *284*, 1328–1333.
- [114] S. Backert, E. Zisaka, V. Brinkmann, U. Zimny-Arndt, A. Faucinnier, P. R. Jungblut, M. Neumann, T. F. Meyer, Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus, *Cell Microbiol.* **2000**, *2*, 155–164.
- [115] W. Fischer, J. Püls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, R. Haas, Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8, *Mol. Microbiol.* **2001**, *42*, 1337–1348.
- [116] G. Rieder, W. Fischer, R. Haas, Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules, *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 67–73.

- [117] Y. Nozawa, K. Nishihara, R. M. Peek, M. Nakano, T. Uji, H. Ajioka, N. Matsuura, H. Miyake, Identification of the signaling cascade for the interleukin-8 production by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 21–30.
- [118] J. M. Kilby, S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, M. S. Saag, Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry, *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1302–1307.
- [119] C. E. Baldwin, R. Sanders, B. Berkhout, Inhibiting HIV-1 entry with fusion inhibitors, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1633–1642.
- [120] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1, *FEBS* **1991**, *291*(1), 50–54.
- [121] H. Kessler, Konformation und biologische Wirkung von cyclischen Peptiden, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509–520.
- [122] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: chemistry and biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 1. Auflage **2002**.
- [123] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *N*-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective  $\alpha_v\beta_3$  integrin antagonists, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.
- [124] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, Pharmacophore refinement of gpIIb/IIIa antagonists based on comparative studies of antiadhesive cyclic and acyclic RGD peptides, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 709–730.
- [125] H. C. Kawato, K. Nakayama, H. Inagaki, R. Nakajima, A. Kitamura, K. Someya, T. Ohta, Synthesis and antifungal activity of rhodopeptin analogues. 1. Modification of the east and south amino acid moieties, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 973–976.
- [126] H. Chiba, H. Agematu, K. Sakai, K. Dobashi, T. Yoshioka, Rhodopeptins, novel cyclic tetrapeptides with antifungal activities from *Rhodococcus sp.* III. Synthetic study of rhodopeptins, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 710–720.
- [127] P. J. Quinn, A. A. Boldyrev, V. E. Foramzuyk, Carnosine: its properties, functions and potential therapeutics applications, *Mol. Aspects Med.* **1992**, *13*, 379–444.
- [128] F. Schumann, A. Müller, M. Kokschi, G. Müller, N. Sewald, Are  $\beta$ -amino acids  $\gamma$ -turn mimetics? Exploring a new design principle for bioactive cyclopeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009–12010.

- [129] M. A. Ondetti, S. L. Engel, Bradykinin analogs containing  $\beta$ -homoamino acids, *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 761–763.
- [130] A. Hayen, M. A. Schmitt, F. N. Ngassa, K. A. Thomasson, S. H. Gellman, Two helical conformations from a single foldamer backbone: “split personality” in short  $\alpha/\beta$ -peptides, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 511–516.
- [131] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado,  $\beta$ -Peptides: from structure to function, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232.
- [132] U. Strijowski, N. Sewald, Structural properties of cyclic peptides containing *cis*- or *trans*-2-aminocyclohexane carboxylic acid, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1105–1109.
- [133] S. De Pol, C. Zorn, C. D. Klein, O. Zerbe, O. Reiser, Überraschend stabile helicale Strukturen in  $\alpha$ - $\beta$ -peptiden durch einbau von *cis*- $\beta$ -Aminocyclopropancarbonsäuren, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 517–520.
- [134] N. Koglin, C. Zorn, R. Beumer, C. Cabrele, C. Bubert, N. Sewald, O. Reiser, A. G. Beck-Sickinger, Neuropeptid- $\gamma$ -Analoga mit  $\beta$ -aminocyclopropancarbonsäure-einheiten sind die kürzesten linearen und selektiven peptide am Y1-rezeptor, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 221–215.
- [135] G. C. Tucker, Integrins: molecular targets in cancer therapy, *Curr. Oncol. Rep.* **2006**, *8*, 96–103.
- [136] A. Meyer, J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler, Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2723–2747.
- [137] E. Lohof, E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M. A. Dechantsreiter, R. Haubner, H.-J. Wester, M. Schwaiger, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, Kohlenhydrate im Wirkstoffdesign am Beispiel von cyclischen  $\alpha_v$ -selektiven RGD-Peptiden, *Angew. Chem.* **2000**, *112*(15), 2868–2871.
- [138] S. A. Mousa, D. A. Cheresh, Recent advances in cell adhesion molecules and extracellular matrix proteins: potential clinical implications, *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 187–199.
- [139] M. Malešević,  *$\beta$ -Amino acids as secondary structure inducers in peptide*, Dissertation, Universität Bielefeld **2002**.
- [140] U. Strijowski, *Synthese und Konformationsanalyse cyclischer Peptide als potentielle Liganden von Integrinen*, Dissertation, Universität Bielefeld **2004**.
- [141] T. Turbadar, Complete absorption of light by thin metal films., *Proc. Phys. Soc. (London)* **1959**, *73*, 40–44.
- [142] A. Otto, Eine neue Methode der Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmaschwingungen, *Phys. Solid State* **1968**, *26*, 199–201.

- [143] D. G. Myszka, X. He, M. Dembo, T. A. Morton, B. Goldstein, Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data, *Biophys. J.* **1998**, *75*, 583–594.
- [144] U. Jönsson, L. Fägerstamm, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfås, B. Persson, H. Ross, I. Rönnberg, Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology, *Biotechniques* **1991**, *11*, 620–627.
- [145] R. L. Rich, D. G. Myszka, Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 54–61.
- [146] D. G. Myszka, Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 50–57.
- [147] P. Y. Tsoi, M. Yang, Surface plasmon resonance study of the molecular recognition between polymerase and DNA containing various mismatches and conformational changes of DNA-protein complexes, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1209–1218.
- [148] J. R. Krone, R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams, R. Granzow, BIA/MS: Interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry, *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 124–132.
- [149] M. Fivach, E. M. Towler, R. J. Fisher, BIAcore for macromolecular interaction, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 97–101.
- [150] A. Szabo, L. Stolz, R. Granzow, Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA), *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 699–705.
- [151] B. Johnsson, S. Löfås, Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 268–277.
- [152] S. Löfås, B. Johnsson, A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, *21*, 1526–1528.
- [153] D. J. O'Shannessy, M. Birgham-Burke, K. Peck, Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector, *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 132–136.
- [154] T. Stein, G. Gerisch, Oriented binding of a lipid-anchored cell adhesion protein onto a biosensor surface using hydrophobic immobilization and photoactive crosslinking, *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 252–259.
- [155] T. A. Morton, D. B. Bennett, E. R. Appelbaum, D. M. Cusimano, K. O. Johanson, R. E. Matico, P. R. Young, I. M. Chaiken, Analysis of the interaction between human interleukin-5 and the soluble domain of its receptor using a surface plasmon resonance biosensor, *J. Mol. Recognit.* **1994**, *7*, 47–55.

- [156] B. C. Cunningham, J. A. Wells, Comparison of a structural and a functional epitope, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 554–63.
- [157] B. Johnsson, S. Löfås, G. Lindquist, A. Ådström, R. M. M. Hillgren, A. Hanson, Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies, *J. Mol. Recgnit.* **1995**, *8*, 125–131.
- [158] A. Bernard, H. R. Bosshard, Real-time monitoring of antigen-antibody recognition on a metal oxide surface by an optical grating coupler sensor, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 416–423.
- [159] *Biacore concentration analysis handbook*, Biacore AB **2001**.
- [160] S. J. Foster, J. P. Perkins, Glucocorticoids increase the responsiveness of cells in culture to prostaglandin E<sub>1</sub>, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 4816–4820.
- [161] C. M. Croce, J. Erikson, A. Ar-Rushdi, D. Aden, K. Nishikura, Translocated c-myc oncogene of burkitt lymphoma is transcribed in plasma cells and repressed in lymphoblastoid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3170–3174.
- [162] C. A. M. La Porta, D. Porro, R. Comolli, Higher levels of melanin and inhibition of cdk2 activity in primary human melanoma cells WM115 overexpressing nPKC[ $\delta$ ], *Melanoma Res.* **2002**, *12*, 297–307.
- [163] F. Meier, M. Nesbit, M.-Y. Hsu, B. Martin, P. V. Belle, D. E. Elder, G. Schaumburg-Lever, C. Garbe, T. M. Walz, P. Donatien, T. M. Crombleholme, M. Herlyn, Human melanoma progression in skin reconstructs, biological significance of bFGF, *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 193–200.
- [164] G. Benga, Basic studies on gene therapy of human malignant melanoma by use of the human interferon beta gene entrapped in cationic multilamellar liposomes, *J. Cell. Mol. Med.* **2001**, *5*, 402–408.
- [165] R. F. Thorne, J. F. Marshall, D. R. Shafreni, P. G. Gibson, I. R. Hart, G. F. Burns, The integrins  $\alpha_3\beta_1$  and  $\alpha_6\beta_1$  physically and functionally associate with CD36 in human melanoma cells, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35264–35275.
- [166] N. K. Haass, K. S. M. Smalley, L. Li, M. Herlyn, Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma, *Pigment Cell. Res.* **2005**, *18*, 150–159.
- [167] D. Benjamin, I. T. Magrath, R. Maguire, C. Janus, H. D. Todd, R. G. Parson, Immunoglobulin secretion by cell lines derived from african and american undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type, *J. Immunol.* **1982**, *129*, 1336–1342.
- [168] R. Pulido, M. R. Campanero, A. Garcia-Pardo, F. Sanchez-Madrid, Structure-function analysis of the human integrin VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ). Correlation of proteolytic alpha 4 peptides with alpha 4 epitopes and sites of ligand interaction, *FEBS Lett.* **1991**, *294*, 121–124.

- [169] K. Miyake, Y. Hasunuma, H. Yagita, M. Kimoto, Requirement for VLA-4 and VLA-5 integrins in lymphoma cells binding to and migration beneath stromal cells in culture, *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 653–662.
- [170] P. H. Reinhardt, J. F. Elliott, P. Kubes, Neutrophils can adhere via  $\alpha_4\beta_1$ -integrin under flow conditions, *Blood* **1997**, *89*, 3837–3846.
- [171] J. Feder, W. R. Tolbert, The large-scale cultivation of mammalian cells, *Sci. Am.* **1984**, *248*, 24–31.
- [172] S. B. Primrose, *Molecular biotechnology*, Blackwell Scientific Publications, 2. Auflage **1991**.
- [173] T. Lindl, *Zell- und Gewebekultur*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Berlin-Heidelberg, 4. Auflage **2002**.
- [174] B. M. Martin, *Tissue culture techniques, an introduction*, Birkhäuser Boston **1994**.
- [175] D. Hanahan, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580.
- [176] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [177] C. R. Merrill, R. C. Schwitzer, M. L. van Kauren, Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and highly sensitive silver stain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 4335–4339.
- [178] C. R. Merrill, M. L. Dunau, D. Goldmann, A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamid gels, *Anal. Biochem.* **1981**, *110*, 201–207.
- [179] C. Merrill, Gel-staining techniques, *Methods Enzymol.* **1990**, *182*, 477–488.
- [180] M. P. Molloy, B. R. Herbert, K. L. Williams, A. A. Gooley, Extraction of *Escherichia coli* proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 701–704.
- [181] H. Towbin, T. Staechelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to ultracellulose sheets: Procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 4350–4354.
- [182] W. F. Glass II, R. C. Briggs, L. S. Hnilica, Identification of tissue-specific nuclear antigens transferred to nitrocellulose from polyacrylamid gels, *Science* **1981**, *10*, 2606–2617.
- [183] J. Khyse-Andersen, Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfers of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1984**, *10*, 203–209.

- [184] O. Salinovich, R. C. Montelaro, Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* **1986**, *156*, 341–347.
- [185] J. A. Brand, V. C. W. Tsang, W. Zhou, S. B. Shukla, Comparison of particulate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and 3,3'-diaminobenzidine as chromogenic substrates for immunoblot, *BioTechniques* **1990**, *8*, 58–60.
- [186] E. Harlowe, D. Lane (Herausgeber), *Antibodies, a laboratory manual*, S. 471–510, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor **1998**.
- [187] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchonic acid, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- [188] V. M. Belkin, A. M. Belkin, V. E. Koteliansky, Human smooth muscle VLA-1 integrin: purification, substrate specificity, localization in aorta, and expression during development, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 2159–2170.
- [189] R. Pytela, M. D. Pierschbacher, S. Argraves, S. Suzuki, E. Ruoslahti, Arginine-glycine-aspartic adhesion receptors, *Methods Enzymol.* **1987**, *144*, 475–489.
- [190] T. Kelly, L. Molony, K. Burrige, Purification of the smooth muscle glycoproteins related to integrin, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17189–17198.
- [191] V. E. Koteliansky, G. N. Gneushev, A. M. Belkin, Purification of a 175 kDa membrane proteins, its localization in smooth and cardiac muscles, *FEBS Lett.* **1985**, *182*, 67–72.
- [192] *Ni-NTA Resin for purification of 6xHis-tagged proteins*, Invitrogen Ltd **2002**.
- [193] *Novagen's pET system, The gold standard for protein expression*, Novagen, 10. Auflage **2003**.
- [194] K. L. Franken, H. S. Hiemstra, K. E. van Meijgaarden, Y. Subronto, J. den Hartigh, T. H. M. Ottenhoff, J. W. Drijfhout, Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent, *Protein Expression Purif.* **2000**, *18*, 95–99.
- [195] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, Primer directed enzymatic amplification of DNA, *Science* **1988**, *239*, 487–491.
- [196] W. M. Barnes, The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion, *Gene* **1992**, *112*, 29–35.
- [197] W. M. Barnes, PCR amplification of up to 35-kp DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2216–2220.

- [198] M. P. Rapoza, R. E. Webster, The filamentous bacteriophage assembly proteins require the bacterial secA protein for correct localization to the membrane, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 1856–1859.
- [199] J. D. Boeke, P. Model, A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage f1 gene III protein retains it in the membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 5200–5204.
- [200] J. D. Boeke, P. Model, N. D. Zinder, Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane, *Mol. Gen. Genet.* **1982**, *186*, 185–192.
- [201] G. I. Evan, G. K. Lewis, G. Ramsay, J. M. Bishop, Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product, *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 3610–3616.
- [202] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. P. Scott, S. L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular cell biology*, W. H. Freeman and Company, 5 Auflage **2003**.
- [203] M. Al-Rubeai, A. N. Emery (Herausgeber), *Flow cytometry applications in cell culture*, Marcel Dekker, Inc. **1996**.
- [204] L. A. Sklar, D. A. Finney, Analysis of ligand-receptor interactions with the fluorescence activated cell sorter, *Cytometry* **1982**, *3*, 161–165.
- [205] O. Siiman, A. Burshteyn, Cell surface receptor-antibody association constants and enumeration of receptor sites for monoclonal antibodies, *Cytometry* **2000**, *40*, 316–326.
- [206] D. Y. Jackson, C. Quan, D. R. Artis, T. Rawson, B. Blackburn, M. Struble, G. Fitzgerald, K. Chan, S. Mullins, J. P. Burnier, W. J. Fairbrother, K. Clark, M. Berisini, H. Chui, M. Renz, S. Jones, S. Fong, Potent  $\alpha_4\beta_1$  peptide antagonists as potential anti-inflammatory agents, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3359–3368.
- [207] E. Y. Jones, K. Harlos, M. J. Bottomley, R. C. Robinson, P. C. Driscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. J. Stuart, Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 Å, *Nature* **1995**, *373*, 539–544.
- [208] K. J. Bayless, G. A. Meninger, J. M. Scholtz, G. E. Davis, Osteopontin is a ligand for the  $\alpha_4\beta_1$  integrin, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 1165–1174.
- [209] L. J. Jarvis, T. W. LeBien, Stimulation of human bone marrow stromal cell tyrosine kinases and IL-6 production by contact with B lymphocytes, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 2359–2368.
- [210] D. Greenbaum, C. Colangelo, K. Williams, M. Gerstein, Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale, *Genome Biol.* **2003**, *4*, 117.

- [211] M. E. Hemler, C. Huang, Y. Takada, L. Schwarz, J. L. Strominger, M. L. Clabby, Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11478–11485.
- [212] E. W. Guthöhrlein, *Effiziente Konformationsanalyse von Peptiden*, Dissertation, Universität Bielefeld **2006**.
- [213] D. V. Bax, A. J. Messent, J. Tart, M. van Hoang, J. Kott, R. A. Maciewicz, M. J. Humphries, Integrin  $\alpha_5\beta_1$  and ADAM-17 interact *in vitro* and co-localize migrating HeLa cells, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 22377–22386.
- [214] B. B. Böhm, T. Aigner, B. Roy, T. A. Brodie, C. P. Blobel, H. Burkhardt, Homeostatic effect of the metalloproteinase disintegrin ADAM15 in the degenerative cartilage remodelling, *Arthritis. Rheum.* **2005**, *52*, 1100–1109.
- [215] National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> **2006**.
- [216] Expert Protein Analysis System, EXPASY, <http://www.expasy.org> **2006**.
- [217] G. Georgiou, P. Valax, Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 190–197.
- [218] Y. Takada, J. Ylänne, D. Mandelman, W. Puzon, M. H. Ginsberg, A point mutation of integrin  $\beta_1$  subunit blocks binding of  $\alpha_5\beta_1$  to fibronectin and invasin but not recruitment to adhesion plaques, *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 913–921.
- [219] E. Koji, W. Puzon-McLaughlin, D. Sheppard, A. Sehara-Fujisawa, X.-P. Zhang, Y. Takada, RGD-independent binding of integrin  $\alpha_9\beta_1$  to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34922–34930.
- [220] Y. Takada, E. Murphy, P. Pil, C. Chen, M. H. Ginsberg, Molecular cloning and expression of the cDNA for  $\alpha_3$  subunit of human  $\alpha_3\beta_1$  (VLA-3), an integrin receptor for fibronectin, laminin, and collagen, *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 257–266.
- [221] T. Kamata, W. Puzon, Y. Takada, Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin  $\alpha_2\beta_1$  (VLA-2, CD49b/CD29), *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 9659–9663.
- [222] A. Irie, T. Kamata, W. Puzon-McLaughlin, Y. Takada, Critical amino acid residues for ligand binding are clustered in a predicted  $\beta$ -turn of the third N-terminal repeat in the integrin  $\alpha_4$  and  $\alpha_5$  subunits, *EMBO J.* **1995**, *14*, 5550–5556.
- [223] T. Kamata, W. Puzon, Y. Takada, Identification of putative ligand-binding sites of the integrin  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4, CD49d/CD29), *Biochem. J.* **1995**, *305*, 945–951.
- [224] B. E. Symington, Y. Takada, W. G. Carter, Interaction of integrin  $\alpha_3\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$ : potential role in keratinocyte intercellular adhesion, *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 523–535.

- [225] H. Al-Riyami, *Cloning, purification and characterisation of human and mouse ADAM8 sheddase activity*, Dissertation, Universität Bielefeld **2006**.
- [226] M. Roederer, R. F. Murphy, Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: application to epidermal growth factor endocytosis by 3T3 fibroblasts, *Cytometry* **1986**, *7*, 558–565.
- [227] L. Zamai, R. Bareggi, E. Santavenere, M. Vitale, Substraction of autofluorescent dead cells from the lymphocyte flow cytometric binding assay, *Cytometry* **1993**, *14*, 951–954.
- [228] A.-P. J. Huovila, A. J. Turner, M. Pelto-Huikko, I. Kärkkäinen, R. M. Ortiz, Shedding light on ADAM metalloproteinases, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 413–422.
- [229] J. Krätzschar, L. Lum, C. P. Blobel, Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4593–4596.
- [230] H. Kessler, B. Diefenbach, D. Finsinger, A. Geyer, M. Gurrath, S. L. Goodman, G. Hölzemann, R. Haubner, A. Jonczyk, G. Müller, E. G. von Roedern, J. Wermuth, Design of superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence, *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 155–160.
- [231] M. Delannet, F. Martin, B. Bossy, D. A. Cheresh, L. F. Reichardt, J.-L. Duband, Specific roles of the  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin, *Development* **1994**, *120*, 2687–2702.
- [232] S. Urman, K. Gaus, Y. Yang, U. Strijowski, N. Sewald, S. De Pol, O. Reiser, The constrained amino acid  $\beta$ -ACC confers potency and selectivity to integrin ligands, *Angew. Chem.* **2007**, angenommen.
- [233] H. Rehm, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin, 4. Auflage **2002**.
- [234] *Biacore® 3000 Instrument Handbook*, Biacore AB **2001**.
- [235] J. W. Smith, R. S. Piotrowicz, D. Mathis, A mechanism for divalent cation regulation of  $\beta_3$ -integrins, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 960–967.
- [236] P. Roger, E. Puchelle, O. B. J.-M. Tournier, C. Debordeaux, M.-C. Plotkowski, J. H. M. Cohen, D. Sheppard, S. de Bentzmann, Fibronectin and  $\alpha_5\beta_1$  integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium, *Eur. Respir. J.* **1999**, *13*, 1301–1309.
- [237] M. S. Dennis, P. Carter, R. A. Lazarus, Binding of kistrin with platelet glycoproteins IIb-IIIa: analysis by site-directed mutagenesis, *Proteins* **1993**, *15*, 312–21.

- [238] M. Ginsberg, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. Marquerie, E. Plow, Inhibition of fibronectin binding to platelets by proteolytic fragments and synthetic peptides which support fibroblast adhesion, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2931–2936.
- [239] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17294–17298.
- [240] U. Strijowski **2005**, persönliche Mitteilung.
- [241] S. Baumann, P. Grob, F. Stuart, D. Pertlik, M. Ackermann, M. Suter, Indirect immobilization of recombinant proteins to a solid phase using the albumin binding domain of streptococcal protein G and immobilized albumin, *J. Immunol. Methods* **1998**, *221*, 95–106.
- [242] *Kinetic and affinity analysis using BIA - Level 2*, Biacore AB **1998**.
- [243] G. Scatchard, The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660–672.
- [244] T. Kwok **2006**, persönliche Mitteilung.