
Etablierung von zellbasierten Assays zur Identifizierung von Inhibitoren des Chemokins CXCL8

Establishment of cell-based assays for identification of inhibitors of the chemokine CXCL8

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von Marina Jöst aus Bensheim

Tag der Einreichung: 19. Mai 2016, Tag der Prüfung: 12. Juli 2016

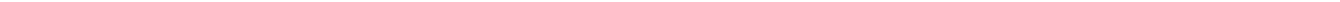
Darmstadt — D 17

1. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. K. Schmitz
2. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. H. Kolmar



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Clemens-Schöpf-Institut
Biologische Chemie, Prof. Dr. rer. nat.
Schmitz



Etablierung von zellbasierten Assays zur Identifizierung von Inhibitoren des Chemokins CXCL8
Establishment of cell-based assays for identification of inhibitors of the chemokine CXCL8

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Marina Jöst
aus Bensheim

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Katja Schmitz
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Harald Kolmar
Tag der Einreichung: 19. Mai 2016
Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2016

Darmstadt 2016

D17



Publikationen

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von April 2012 bis Mai 2015 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Frau Prof. Dr. K. Schmitz durchgeführt.

Zusätzlich zur Vorstellung von Ergebnissen dieser Arbeit auf einer Tagung, wurden in diesem Zeitraum auch Beiträge zu folgenden Veröffentlichungen geleistet:

Publikationen

- S. Hörner¹, S. Knauer¹, C. Uth¹, M. Jöst, V. Schmidts, H. Frauendorf, O. Avrutina, H. Kolmar, „New-generation organic-inorganic hybrids for efficient cell penetration and drug delivery“, in Vorbereitung
- C. F. Weber¹, E. H. Adam¹, A. Pape, M. Jöst, P. Meybohm, K. Schmitz, K. Zacharowski, M. Hermann, D. Fries, „Der Gerinnungsfaktor XIII - Pathophysiologie, Klinik und Therapie von Mangelzuständen“, *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **2015**, *50*, 684-690.
- D. Helmer, I. Rink, J. A. R. Dalton, K. Brahm, M. Jöst, T. M. Nargang, W. Blum, P. Wadhvani, G. Brenner-Weiss, B. E. Rapp, J. Giraldo, K. Schmitz, „Rational design of a peptide capture agent for CXCL8 based on a model of the CXCL8: CXCR1 complex“, *RSC Advances* **2015**, *5*, 25657-25668.

Posterbeiträge

- „Fluorescence polarization assay to screen for inhibitors of interleukin 8“, Chemical Biology, Heidelberg, **2014**.
-



Danksagung

Frau Prof. Dr. Katja Schmitz danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in Ihrem Arbeitskreis am Clemens-Schöpf-Institut für organische Chemie und Biochemie durchführen zu dürfen und die große Unterstützung in dieser Zeit. Ich danke ihr für Ihre Hilfestellungen bei Fragen und Problemen und dass ich mit diesen immer zu ihr kommen konnte. Zudem bedanke ich mich für das Vertrauen, das sie in mich und meine Arbeit gelegt hat.

Ebenso gilt mein Dank meinem Korreferenten Herrn Prof. Dr. Kolmar.

Bei Dorothea Helmer möchte ich mich ganz herzlich für die gemeinsame Zeit mit viel Lachen und Humor, die wertvollen Diskussionen und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei Kerstin Bathon für die gemeinsame Zeit und die Freundschaft, die hieraus entstanden ist. Hier gilt auch mein besonderer Dank Ina Rink, auf die ich sowohl im fachlichen Austausch als auch freundschaftlich immer zählen kann und froh bin, sie als Freundin gewonnen zu haben.

Ich bedanke mich bei Kevin Brahm für die Hilfe und Ratschläge an der HPLC sowie bei den Kupplungsreaktionen. Bei Anke Imrich für Ihre Hilfe bei der Kultivierung meiner Zellen.

Zudem bedanke ich mich für die Hilfe bei der Bedienung des Durchflusszytometers bei Janine Becker, bei Sebastian Hörner, Heiko Fittler und Sascha Knauer für die Durchführung der LC-MS-Messungen und bei Prof. Dr. Kolmar, der mir die Messung meiner Proben an diesen Geräten ermöglicht hat.

Ebenso möchte ich mich beim Arbeitskreis Dencher, vor allem bei Victoria Decker, Manuela Kratochwil und Sven Marx für den produktiven fachlichen Austausch sowie bei Prof. Dr. Dencher für die Nutzung des Potter-Elvehjem-Homogenisators bedanken.

Bei PD. Dr. Tobias Meckel und Sarah Albrecht bedanke ich mich für die gute Kooperation bei der Analyse meiner Zellen mittels konfokaler Mikroskopie.

Herr Prof. Galzi, Ph.D., Frau Prof. Dr. Koch-Brandt und Herr Prof. Dr. Kolmar danke ich dafür, dass sie mir Zelllinien zur Nutzung als Kontrolle zur Verfügung gestellt haben.

Meiner Familie und meinem Freund, Kevin Frank, danke ich von ganzem Herzen für ihren Halt und die Unterstützung, welche mir die nötige Motivation und Kraft gegeben haben und immer an mich geglaubt haben.



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Chemokine und ihre Rezeptoren	1
1.1.1 CXCL8	3
1.1.2 Die Wechselwirkung von CXCL8 mit CXCR1/2	4
1.1.3 CXCL8 vermittelte zelluläre Effekte	6
1.1.4 Regulierung der Rezeptoraktivität	9
1.1.5 Krankheiten mit Beteiligung von CXCL8 und bereits identifizierte Inhibitoren	9
1.2 Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen	11
1.2.1 Bindungsstudien	11
1.2.2 Bindungsstudien zur Untersuchung der Wechselwirkung von Chemokinen mit ihren Rezeptoren	14
1.3 Fluoreszenzpolarisation	16
1.4 Aktivitätsassays	19
1.4.1 Aktivitätsassays zur Untersuchung der durch CXCL8 ausgelösten Signalwege	20
1.4.2 Calcium-Assay	22
2 Zielsetzung	25
3 Materialien	27
3.1 Geräte	27
3.2 Software	29
3.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
3.4 Biologisch aktive Substanzen	32
3.4.1 Antikörper	32
3.4.2 Primer zur Sequenzierung	33
3.4.3 Enzyme	33
3.4.4 Plasmide	34
3.4.5 Transfektionsreagenzien	34
3.4.6 Größenstandards	34
4 Methoden	35
4.1 Mikrobiologische Arbeiten	35
4.1.1 Anlegen von Glycerolstocks	35
4.1.2 Transformation und Ausplattieren	35
4.1.3 Plasmidpräparation und Konzentrationsbestimmung	36

4.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) einer Bakterienkolonie	36
4.1.5	Agarosegelelektrophorese	37
4.2	Proteinbiochemische Methoden	38
4.2.1	Häufig verwendete Puffer	38
4.2.2	Proteinexpression und Zellyse	38
4.2.3	Proteinquantifizierung	39
4.2.4	Chromatographie	40
4.2.5	SDS-Gelelektrophorese	42
4.2.6	Kolloidale Coomassie-Färbung	43
4.2.7	Western Blot	43
4.2.8	Proteinkonjugation	45
4.3	Funktionalisierung eines Übergangsmetallkomplexes	45
4.4	Zellbiologische Methoden	46
4.4.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	47
4.4.2	Anlegen von Kryokonserven und Aussäen von Zellen	47
4.4.3	Passagieren von Zellen	48
4.4.4	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer	48
4.4.5	Transfektion und Selektion stabil transfizierter Zellen	49
4.4.6	Lyse eukaryotischer Zellen	50
4.4.7	Präparation von Plasmamembranen	50
4.4.8	Durchflusszytometrie	51
4.4.9	Konfokale Laser-Raster Mikroskopie	52
4.5	Aktivitäts- und Bindungsassays	53
4.5.1	Isolierung neutrophiler Granulozyten aus Spenderblut	53
4.5.2	Calcium-Assay	53
4.5.3	Transwell-Assay	54
4.5.4	Fluoreszenzanisotropiemessungen	55
5	Ergebnisse	57
5.1	Nachweis der Rezeptorexpression	57
5.1.1	Transfektion und Charakterisierung von HEK293-Zellen zur Expression von CXCR1 und CXCR2	57
5.2	Etablierung eines Aktivitätsassays zur Bestätigung der biologischen Aktivität der rekombinant exprimierten Rezeptoren	70
5.2.1	Etablierung eines Calcium-Assays mit neutrophilen Granulozyten	70
5.2.2	Optimierung und Durchführung des Calcium-Assays mit transfizierten HEK293-Zelllinien	72
5.2.3	Anwendung des Calcium-Assay zur Bestätigung von Inhibitoren des Chemokins CXCL8 und der Spezifität des in transfizierten HEK293-Zellen ausgelösten Signals	75
5.2.4	Verwendung der transfizierten HEK293-Zellen in Aktivitätsassays	79

5.3	Konjugation von CXCL8 mit Fluorophoren	80
5.4	Fluoreszenzanisotropie	87
5.4.1	Vergleich der Tracer	88
5.4.2	Hintergrundkorrekturen bei Fluoreszenzanisotropiemessungen	98
5.4.3	Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen im Fluoreszenzanisotropie-Assay . .	98
5.4.4	Bindungsversuche	106
6	Diskussion	117
6.1	Nachweis der Rezeptorexpression	117
6.1.1	Rezeptordimerisierung	117
6.1.2	Analyse von Zelllysaten und ganzer Zellen zum Nachweis der rekombinanten Expression	118
6.1.3	Analyse von Membranpräparationen zum Nachweis der rekombinanten Expression . .	120
6.1.4	Vergleich der Nachweismethoden	121
6.2	Etablierung eines Calcium-Assays und Nachweis der Rezeptorfunktion	122
6.2.1	Calcium-Assay mit neutrophilen Granulozyten	122
6.2.2	Calcium-Assay mit transfizierten HEK293	123
6.2.3	Calcium-Assay zum Test von Inhibitoren	125
6.3	Proteinkonjugation	128
6.3.1	Nachweis und Quantifizierung der Proteinkonjugate	128
6.3.2	Konjugation mit einem Übergangsmetall-basierten Fluorophor	129
6.4	Fluoreszenzanisotropie	132
6.4.1	Vergleich der Tracer	132
6.4.2	Bindungsstudien mittels Fluoreszenzanisotropie	138
7	Zusammenfassung	151
	Literaturverzeichnis	153



Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxy-methylester
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APT	Aminoglykosid-phosphotransferase
ARP	<i>actin-related proteins</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	<i>correction factor</i>
CHO	<i>chinese hamster ovarian</i>
CMV	Cytomegalovirus
CRAC	<i>calcium release-activated Ca²⁺-channels</i>
CS	Chondroitinsulfat
Da	Dalton
DARC	<i>Duffy Antigen Receptor for Chemokines</i>
DAG	Diacylglycerol
DS	Dermatansulfat
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	engl.: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid

GDP	Guanosindiphosphat
G418	Geneticin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, Förster-Energie-Resonanztransfer
FKS	fötales Kälberserum
G418	Geneticin
GAG	Glykosaminoglykan
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HEK	engl.: <i>human embryonic kidney</i>
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
HHBS	<i>Hank's buffered salt solution</i> mit Hepes
HS	Heparinsulfat
HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
IP3	Inositoltrisphosphat
pI	isoelektrischer Punkt
KS	Keratinsulfat
LC	<i>liquid chromatography</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein</i> -Kinase
mP	Millipolarisationseinheiten
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
mTor	<i>mechanistic target of Rapamycin</i>
NG	Neutrophile Granulozyten

NHS	N-Hydroxysuccinimid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>photo diode array</i>
PIK3	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP-K	Phosphatidylinositol-Phosphatkinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
dNTP	Desoxynukleotide
RAP	engl.: <i>receptor related protein</i>
SDS	engl.: <i>Sodium dodecyl sulfat</i>
SRC	<i>cellular sarcoma</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>TRIS-Buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp



1 Einleitung

Chemokine, chemotaktische Cytokine, sind eine Familie sekretorischer Proteine, die durch Initiieren und Regulieren der gerichteten Migration von Immunzellen an der Homöostase und Entwicklung des Immunsystems sowie an entzündlichen Prozessen beteiligt sind.^{[1][2]}

Diese meist 8-14kDa großen Proteine werden anhand von auf N-terminalen Cysteinresten basierender, struktureller Eigenschaften in vier Untergruppen unterteilt.^[3] Zusätzlich erfolgen weitere Gruppierungen entsprechend funktioneller Aspekte. Durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) werden unterschiedliche Signaltransduktionswege eingeleitet, welche neben inflammatorischen Prozessen auch die Angiogenese beeinflussende und proliferative Wirkungen hervorrufen. Neben dieser Ligand-Rezeptorbindung wechselwirken Chemokine als kationische Proteine mit den auf Plasmamembranen und gelöst vorliegenden Glykosaminoglykanen, was neben dem Aufbau eines haptotaktischen Gradienten der Regulierung der Chemokinfunktion dient.

Das in dieser Arbeit näher verwendete Interleukin-8 (IL-8), im Folgenden entsprechend der systematischen Nomenklatur als CXCL8 bezeichnet, bindet mit hoher Affinität an die auf neutrophilen Granulozyten endogen exprimierte Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, wodurch es ein Chemoattraktant dieser Immunzellen darstellt. Als inflammatorisches und angiogenetisches Protein mit zellproliferativer Wirkung ist CXCL8 sowohl an entzündlichen Erkrankungen wie der Arteriosklerose als auch bei der Entstehung und Entwicklung von Krebs beteiligt.

Die Identifizierung von Antagonisten ist sowohl mit Hilfe von Aktivitäts- als auch Bindungsassays möglich, welche für die hier betrachteten Ligand-Rezeptorpaare bereits etabliert sind. In Bindungsstudien werden zumeist radioaktiv markierte Liganden eingesetzt. Die Messung der Fluoreszenzanisotropie stellt eine weitere Messmethode für homogene Assays dar. Die Charakterisierung einer Bindung ist für kleine Ligandmoleküle wie Hormone und GPCRs, jedoch nicht die hier betrachteten Ligand-Rezeptorpaare, bereits publiziert, weshalb in dieser Arbeit untersucht werden soll, ob die Messung der Fluoreszenzanisotropie auch in Bindungsstudien des Chemokins CXCL8 mit seinen Rezeptoren genutzt werden kann.

1.1 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine werden strukturell anhand der Anordnung konservierter, N-terminaler Cysteinreste in vier Untergruppen unterteilt: Bei der Mehrzahl der Chemokine bilden das erste mit dem dritten und das zweite mit dem vierten Cystein insgesamt zwei Disulfidbrücken. Bei ersteren befindet sich eine weitere, beliebige Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinen, bei letzteren sind die Cysteine direkt aufeinander folgend angeordnet. Eine dritte Untergruppe, C-Chemokine, besitzt lediglich zwei Cysteinreste entsprechend der 2. und 4. Position und somit eine Disulfidbrücke, wohingegen im Fall der vierten Gruppe, CX3C, die beiden ersten Cysteine von drei beliebigen Aminosäureresten getrennt werden.^{[4][5][6]}

Chemokine binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) der Klasse A, welche strukturelle Ähnlichkeiten zum Rhodopsinrezeptor aufweisen.^{[7][8][9]} In Vertebraten werden GPCRs entsprechend struktureller und funktionaler Übereinstimmungen in fünf Klassen unterteilt, wobei Klasse A die größte und vielseitigste

darstellt.^{[10][11]} Die Definition dieser Superfamilie von Rezeptoren basiert auf der Bindung kleiner, heterotrimerer G-Proteine, durch welche nach Bindung des Liganden verschiedene Signalkaskaden ausgelöst werden. Strukturell besitzen GPCRs sieben Transmembrandomänen, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär angeordnet ist. Alle Chemokinrezeptoren enthalten im intrazellulären Bereich der dritten Transmembrandomäne das zur Rezeptoraktivierung notwendige DRYLAIVHA-Motiv, unter Umständen leicht verändert.^{[12][8]} Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren entspricht der bereits erläuterten Einordnung ihrer Chemokinliganden, wobei Rezeptoren entsprechend mit einem zusätzlichen R, Liganden mit einem L gekennzeichnet werden. Zur Identifizierung der einzelnen Chemokine und Rezeptoren einer Untergruppe werden diese nummeriert, wobei die jeweilige Ligandenummer keine Übereinstimmung mit den zugehörigen Rezeptoren aufweist. So bindet CXCL8 beispielsweise an CXCR1 und CXCR2.^[8] In der Regel wechselwirkt ein bestimmtes Chemokin zumeist mit mehreren Rezeptoren und ein Rezeptor besitzt mehrere Chemokine, die er mit hoher Affinität bindet.^{[13][1]} Hierdurch entsteht ein komplexes System verschiedener Ligand-Rezeptorwechselwirkungen, was eine sensitive Regulierung der verschiedenen Prozesse, in die Chemokine involviert sind, ermöglicht. So kann ein bestimmtes Chemokin teilweise als Antagonist anderer Ligand-Rezeptorpaare agieren, wobei hier auch Bindungen außerhalb der jeweiligen Untergruppe zu beobachten sind, obwohl Chemokine in der Regel an Rezeptoren der gleichen Klasse binden.^[14] Zusätzlich zu den zahlreichen Chemokin-Rezeptorwechselwirkungen sind sogenannte Nicht-Chemokinliganden bekannt, beispielsweise das Tripeptid N-Acetyl-Pro-Gly-Pro (PGP). Dieses stellt ein proteolytisches Abbauprodukt von neutrophilen Granulozyten dar, welche die extrazelluläre Matrix infiltrieren und durch die Bindung an CXC-Rezeptoren Chemotaxis und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert.^[15] Neben den Chemotaxis einleitenden Chemokinrezeptoren sind auch atypische Sieben-Transmembranrezeptoren bekannt, die Chemokine binden, jedoch vermutlich aufgrund des fehlenden oder veränderten zur Rezeptoraktivierung benötigten DRY-Motivs keine chemotaktische Aktivität zeigen und somit als negative Regulatoren fungieren könnten.^[1]

Neben dieser Ligand-Rezeptorbindung wechselwirken Chemokine mit sowohl auf Plasmamembranen immobilisierten als auch gelösten Glykosaminoglykanen (GAGs). Die Wechselwirkung mit ersteren nimmt einerseits durch die lokale Erhöhung der Chemokinkonzentration Einfluss auf die Wirkung und dient andererseits der Bildung eines haptotaktischen Gradienten.

Eine Besonderheit der CXC-Familie besteht in der weiteren Unterteilung in ELR⁺- und ELR⁻-Chemokine. Diese aus den drei Aminosäuren Glu-Leu-Arg bestehende Sequenz am N-Terminus ist bei allen Chemokinen der Untergruppe ELR⁺ zu finden, die auf neutrophile Granulozyten wirken, und ist ausschlaggebend für die Aktivierung von GPCRs.^{[16][17][18]} Funktionell betrachtet unterscheiden sich beide Gruppen in ihrer Wirkung auf die Bildung neuer Blutgefäße. Während ELR⁺-Chemokine angiogenetisch wirken, wird bei ELR⁻-Chemokinen ein angiostatischer Effekt beobachtet.^{[19][20]}

Zusätzlich wird funktionell zwischen inflammatorischen und homöostatischen Chemokinen unterschieden, wobei erstere bei entzündlichen Prozessen durch Aktivierung von Immunzellen verstärkt exprimiert werden, um neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu rekrutieren und aktivieren. Homöostatische Chemokine werden dagegen konstitutiv exprimiert und sind in die Regulierung und Kontrolle des Immunsystems involviert. Zusätzlich üben sie durch ihren Einfluß auf Lymphozyten und dendritische Zellen eine organisatorische Wirkung auf die Organe des Immunsystems aus. Entsprechend ihrer Funktionen können einige

Chemokine beiden Untergruppen zugeordnet werden.^{[1] [21] [13] [2] [22] [23]}

Neben Fibroblasten, Endothelzellen und mononuklearen Phagozyten können vermutlich alle Zellen unter entsprechenden Bedingungen Chemokine exprimieren, wobei verschiedene Chemokine simultan von einer einzigen Zelle sezerniert werden können. Dieses auch als Polyspeirismus bezeichnete Verhalten dient vermutlich der Regulierung und Stabilität des komplexen Chemokinsystems.^[13]

1.1.1 CXCL8

Die Expression des Ende der 80er Jahre entdeckten, inflammatorischen Chemokins CXCL8, auch Interleukin-8 wird sowohl durch bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharid (LPS) und Bakterien selbst (z.B. *Helicobacter pylori* und *Pseudomonas aeruginosa*) als auch durch Viren wie beispielsweise Rhinoviren und dem Zytomegalievirus oder durch virale Produkte induziert.^{[24] [25] [26] [27] [28] [29]} Zudem stimulieren proinflammatorische Cytokine wie der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β die CXCL8-Expression. Die Induktion von CXCL8 durch letztere ist auf die Aktivierung von mindestens drei verschiedenen Signaltransduktionswegen zurückzuführen. Die Aktivierung von NF- κ B (*nuclear factor-kappaB*), der SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/s-Jun N-terminal kinase*) und der p38-MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*) resultieren in einer Aktivierung der Transkription und der Stabilisierung der entstehenden mRNA.^[30]

Die Hauptisof orm von CXCL8 besitzt 72 Aminosäuren und entsteht durch proteolytische Abspaltung einer Signalsequenz aus einer aus 99 Aminosäuren bestehenden Vorläuferform.^[31] Sie besitzt ein Molekulargewicht von 8,4 kDa und einen isoelektrischen Punkt im basischen Bereich, welcher in der Literatur sowohl mit 8,3 als auch 9,5 angegeben wird.^{[24] [7]} CXCL8 bindet an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2.^{[32] [33] [7]} Die Struktur dieses Vertreters der CXC-Gruppe wurde bereits 1991 aufgeklärt und weist neben einem ungeordneten N-Terminus, auf welchen eine Loop-Region folgt, ein antiparalleles dreisträngiges β -Faltblatt und schließlich eine α -Helix am C-Terminus auf (siehe Abbildung 1.1).^[34] Bei NMR- und Röntgenstrukturanalysen kann eine nicht-kovalente Homodimerisierung des Proteins beobachtet werden. Durch sechs Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Rückgraten der Monomere entsteht ein sechs-strängiges β -Faltblatt.^{[34] [35]} Abbildung 1.1 stellt die Struktur des Homodimers dar. Bezüglich der Konzentration, ab welcher eine Dimerisierung zu beobachten ist, sind in der Literatur unterschiedliche Angaben vom dreistelligen nanomolaren bis zum zweistelligen mikromolaren Bereich zu finden.^{[36] [37] [38]} Unter physiologischen Bedingungen liegt das Chemokin in nanomolaren Konzentrationen vor und ist somit als Monomer biologisch aktiv, wobei ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht sowie höhere Oligomere beobachtet werden.^{[39] [40] [38] [41] [42] [37]} Die Bindung an Glykosaminoglykane begünstigt diese Dimerisierung und ermöglicht die Bildung höherer Oligomere.^{[43] [44]} Die verschiedenen Oligomerisierungszustände besitzen jeweils unterschiedliche Affinitäten zu CXCR1 und CXCR2, wobei das Monomer zu beiden Rezeptoren eine vielfach höhere Affinität (CXCR1: 70-fach, CXCR2: 20-fach) aufweist als das Dimer.^[45] Thermodynamisch ist die Dissoziation eines CXCL8-Dimers nach Rezeptorbindung begünstigt, sodass ein CXCL8-Molekül an ein Rezeptormolekül gebunden ist.^[46] Die Aktivierung der Rezeptoren scheint im Fall von CXCR2 weniger vom Oligomerisierungszustand des Liganden beeinflusst zu werden als dies bei CXCR1 der Fall ist.^{[41] [37] [42]}

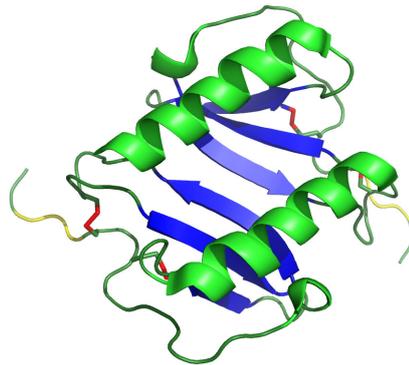


Abbildung 1.1: **Struktur des CXCL8-Dimers.** Durch die nicht-kovalente Bindung zweier CXCL8-Monomere entsteht ein sechs-strängiges β -Faltblatt (blau). In grün sind die α -Helices der beiden Moleküle zu sehen. Gelb zeigt das ELR-Motiv und rot die für Chemokine charakteristischen Disulfidbrücken. (Eigene Abbildung, PDB-Nummer: 1ILP)

1.1.2 Die Wechselwirkung von CXCL8 mit CXCR1/2

CXCL8 bindet an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, welche eine Homologie von 77% zueinander aufweisen. Die Affinitäten liegen im einstelligen nanomolaren Bereich, wobei zu CXCR2 eine geringfügig höhere Affinität als zu CXCR1 berichtet wird.^{[45][42][47]} Abbildung 1.2 zeigt die Struktur des Rezeptors CXCR1 mit den sieben Transmembrandomänen, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. Das Aminosäuretriplet DRY des zur Rezeptoraktivierung wichtigen Motifs DRYLAIVHA, welches sich im intrazellulären Bereich der dritten Transmembrandomäne befindet, ist gelb dargestellt. Die

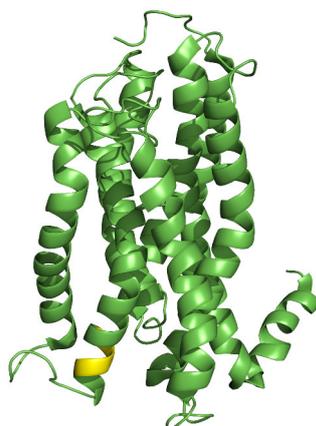


Abbildung 1.2: **Struktur des Transmembranrezeptors CXCR1.** Die sieben Helices, welche die Phospholipiddoppelmembran senkrecht durchspannen, sind in grün dargestellt. In gelb eingefärbt ist das Aminosäuretriplet des zur Aktivierung wichtigen DRYLAIVHA-Motiv. (Eigene Abbildung, PDB-Nummer: P25024)

höchsten Expressionslevel dieser Rezeptoren sind bei neutrophilen Granulozyten zu finden, wobei beide Membranproteine in gleichem Ausmaß exprimiert werden.^[48] Des Weiteren werden die Rezeptoren von CXCL8, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß sowohl auf verschiedenen Leukozyten, unter anderem Lymphozyten, Monozyten und CD⁸⁺-T-Zellen, als auch auf Endothel- und Epithelzellen sowie Krebszellen exprimiert.^{[48] [49] [50] [51] [52]} Im zentralen Nervensystem kann beispielsweise in Mikrogliazellen und Astrozyten die Expression von CXCR2 nachgewiesen werden.^{[53] [54]} Die ELR-positiven und inflammatorischen Chemokine CXCL6-8 stellen Liganden beider Rezeptoren dar, während CXCR2 zusätzlich CXCL1-3 sowie CXCL5, welche teilweise ebenfalls ELR-positiv und inflammatorisch sind, bindet.^{[3] [1]} Sowohl in transfizierten Zellen als auch bei der endogenen Expression bilden CXCR1 und CXCR2 gleichermaßen Homo- und Heterodimere sowie die jeweiligen Oligomere.^{[55] [56]} Diese Oligomerisierung findet konstitutiv ohne Bindung des Agonisten bereits während der frühen Proteinbiosynthese am endoplasmatischen Retikulum statt.^{[56] [49]} Mutageneseexperimente mit CXCR2 identifizierten den Bereich zwischen Ala106 und Lys163 (Bereich zwischen der zweiten extrazellulären Domäne und der vierten Transmembrandomäne) als eine für die Oligomerisierung notwendige Region.^[55] Wie bereits beschrieben, ist bei beiden Rezeptoren die zur Aktivierung wichtige DRYLAHIVA-Sequenz in diesem Bereich lokalisiert.^{[57] [58]} Obgleich die Bindung von CXCL8 die Dimerisierung nicht initiiert, scheint CXCL8 an der Regulierung der Dimerisierung beteiligt zu sein. So ist eine Stabilisierung der Homodimere und eine Störung der Heterodimerisierung durch die Bindung des Chemokins beschrieben. Zudem wird das dynamische Gleichgewicht, in welchem sich Homo- und Heterodimere beider Rezeptoren befinden, durch die Expression der beiden Rezeptoren beeinflusst.^[49] Für die Bindung des Chemokins an die Rezeptoren wird ein Zwei-Stufen-Modell angenommen, wobei genauere, unter anderem auf NMR-Spektroskopie und Mutageneseexperimenten basierte Untersuchungen vor allem für die Wechselwirkung zwischen CXCL8 und CXCR1 veröffentlicht sind.^{[59] [60] [46] [61] [62]} Während der erste Bindungsschritt des CXCL8-N-Loops mit dem N-Terminus des Rezeptors vor allem Selektivität und Affinität beeinflusst, ist der zweite Bindungsschritt, bei dem das konservierte ELR-Motiv mit der dritten und vierten extrazellulären Rezeptordomäne wechselwirkt, wichtig für die Rezeptoraktivierung.^[62] Diese beiden erläuterten Bindungsschritte sind voneinander abhängig und könnten die Selektivität und Affinität zwischen verschiedenen Chemokinen und ihren Rezeptoren erklären.^{[63] [64] [65]} Mittels heteronuklearer NMR-Spektroskopie wurden das dritte β -Faltblatt, Aminosäuren in der C-terminalen α -Helix, die N-terminale Schleifenregion und der N-Terminus als für die Wechselwirkung mit den Rezeptoren wichtige Domänen des Chemokins ermittelt.^[61] Die Synthese von Peptiden aus dem N-Terminus ermöglichte die Analyse der Wechselwirkung dieser zu unterschiedlichen CXCL8-Mutanten.^{[66] [62] [67]} Durch Einbetten eines solchen Peptids in membranähnliche, aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) oder Dodecylphosphocholin (DPC) bestehende Vesikel, konnte zudem die Wechselwirkung des Rezeptors mit der Membran gezeigt werden.^{[67] [59]} Die Bedeutung der den Rezeptor umgebenden Membran wird durch die größere Affinität des Liganden, CXCL8, zu einem in dieser künstlichen Membran enthaltenen Rezeptorpeptid im Vergleich zum gelösten Peptid deutlich.^[59] Die Wechselwirkung des extrazellulären N-Terminus des CXCR1-Rezeptors mit der Phospholipidschicht basiert auf N-terminalen Tryptophanresten, wobei die flexible und dennoch strukturierte Verankerung in der Membrandoppelschicht speziell auf Trp10 zurückzuführen ist.^{[60] [67]} Der an sauren Aminosäuren und damit negativen Ladungen reiche N-Terminus des GPCRs stellt die erste Bindungsstelle für das basische CXCL8 dar, wobei das Chemokin mit der N-Loop-Region (Ile10,

Lys11, Thr12, Tyr13, Lys15, Pro16, Phe17, Phe21) bindet und die Dissoziation des Rezeptor-N-Terminus von der Membran auslöst.^{[7][60][67]} Dieser erste Schritt der Bindung von CXCL8 an den N-Terminus von CXCR1 basiert vorwiegend auf hydrophoben, aber auch elektrostatischen und apolaren Wechselwirkungen sowie der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen.^{[68][46]} Ergebnisse von Bindungs- und Aktivitätstests nach Mutation des CXC- in ein CC-Motiv durch Entfernen der Aminosäure an Position 8, Gln8, lassen vermuten, dass sowohl das CXC-Motiv als auch die Disulfidbrücken zu dieser ersten Bindung beitragen.^[63] Des Weiteren führen diese ersten Wechselwirkungen zwischen CXCL8 und CXCR1 zu strukturellen und dynamischen Veränderungen des Liganden, sodass der N-Terminus des Liganden eine für die Wechselwirkung mit der zweiten Bindungsstelle günstigere Orientierung einnimmt.^{[63][46]} Die Bedeutung dieser ersten, von der N-Loop-Region des CXCL8 ausgehenden, Wechselwirkung für die Bindung wird zudem dadurch verdeutlicht, dass ein das ELR-Motiv (N-Terminus) enthaltendes Peptid alleine keine Bindung aufweist.^[17] Der zweite Bindungsschritt ist durch die Wechselwirkung des ELR-Motivs im Liganden und somit dessen N-Terminus mit der dritten und vierten extrazellulären Schleife des Rezeptors charakterisiert. Hierbei scheinen vor allem die Aminosäurereste Arg199, Arg203 sowie Asp265 in der dritten und vierten extrazellulären Schleife des Rezeptors von Bedeutung zu sein. Diese Bindung vermittelt letztlich die Konformationsänderungen im Rezeptor mit anschließender Aktivierung der G-Proteine.^[60]

1.1.3 CXCL8 vermittelte zelluläre Effekte

Die Bindung des Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor resultiert in der Aktivierung heterotrimerer G-Proteine. Hierbei wird das in der inaktiven Form gebundene Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht, worauf die Untereinheiten des G-Proteins dissoziieren und unterschiedliche Signaltransduktionswege, im Fall der α -Untereinheit (α_i) beispielsweise durch Aktivierung der Phospholipase C β oder Regulierung der Adenylylcyclase, einleiten. Als Resultat der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und G-Protein wird somit die Aktivität verschiedener Enzyme beeinflusst, was in einer Konzentrationsänderung der entsprechenden, sekundären Botenstoffe resultiert.

Die Bindung von CXCL8 an CXCR1/2 leitet eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, unter anderem jenen der MAP-Kinasen und Phospholipase C, ein. Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Übersicht über die wichtigsten, in neutrophilen Granulozyten ausgelösten Kaskaden. Obgleich beide Rezeptoren dieselben G-Proteine binden, werden die Aktivierung der Phospholipase D sowie die Aktivierung der NADPH-Oxidase mit anschließender Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies nur durch CXCR1 induziert.^[72] Durch Aktivierung verschiedener Signalkaskaden vermittelt CXCL8 als inflammatorischer Chemoattraktant in neutrophilen Granulozyten vorwiegend drei Effekte: Formveränderung, Exozytose und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies.^[24] Ersteres stellt die Aktivierung des kontraktilen Systems und damit die Grundlage zur Chemotaxis, der durch ein chemisches Signal ausgelöst, gerichteten Migration, dar.^[73] Die bei der Exozytose freigesetzten bioaktiven Lipide und granulären Enzyme, unter anderem Elastase, Cathepsine und Lysozym, sind für Mikroorganismen toxisch und führen zusätzlich zu Gewebeschäden und Entzündungen. Diese Effekte werden durch die Freisetzung von H₂O₂ und der Aktivierung der NADPH-Oxidase, welche zur Entstehung des Hyperoxidations O₂⁻ führt, noch verstärkt.^{[74][75][24]} Im Zuge der Exozytose kommt es zusätzlich zu Umstrukturierungen der Plasmamembran mit Expression von Adhäsionsproteinen, was die

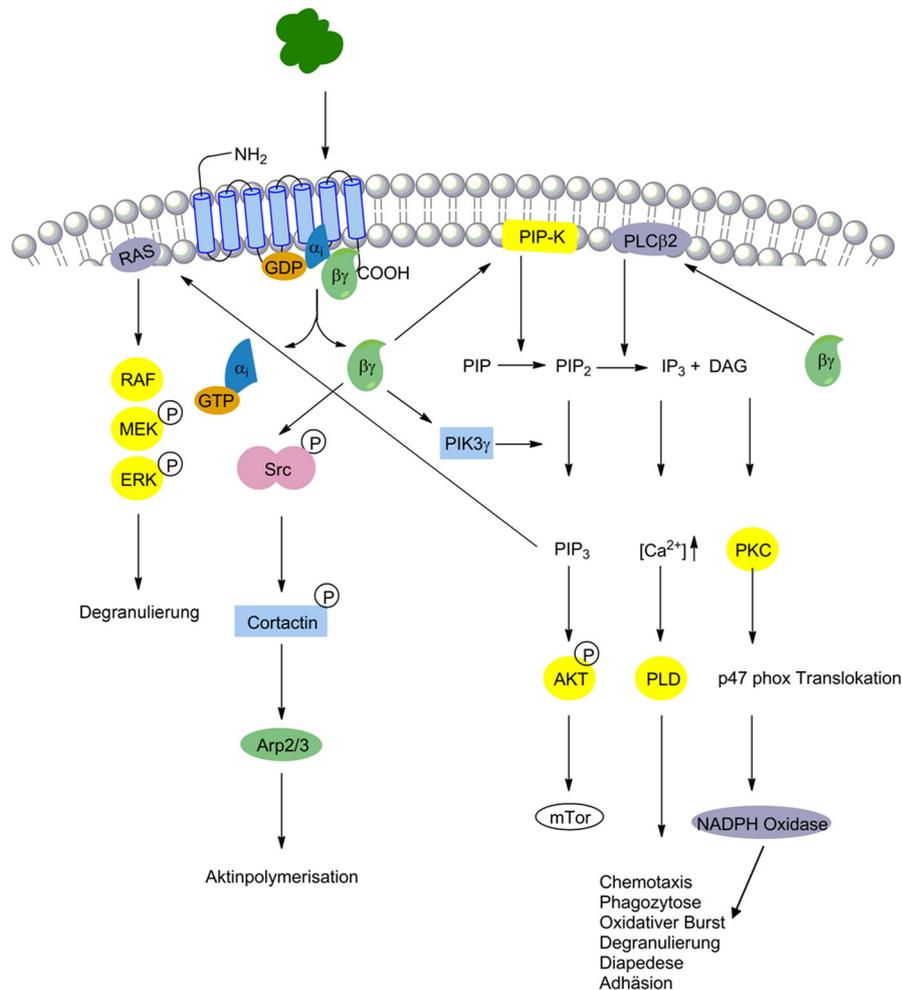


Abbildung 1.3: **Die wichtigsten durch die Bindung von CXCL8 an seine Rezeptoren ausgelösten, Signaltransduktionswege in neutrophilen Granulozyten.** Die Bindung von CXCL8 (grün) an CXCR1/2 resultiert in der Dissoziation der β -/ γ -Untereinheit des aktivierten, in der Membran verankerten, heterotrimeren G-Proteins, welches durch Wechselwirkung mit Enzymen wie der Phosphatidylinositol-Phosphatkinase (PIP-K), Phospholipase C β 2 (PLC β 2), Phosphoinositid-3-Kinase γ (PIK3 γ) die Entstehung und Freisetzung sekundärer Botenstoffe initiiert. (Phosphatidylinositolphosphat (PIP), Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP $_3$), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$), Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP $_3$), Diacylglycerol (DAG)). Dies wiederum führt zur Aktivierung weiterer Enzyme wie der Phospholipase D (PLD), der Proteinkinase C (PKC) sowie der Akt-Kinase, auch Proteinkinase B genannt, wobei letztlich auch Signalkaskaden der MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein*) involviert sind. Letztere resultieren in der Degranulierung neutrophiler Granulozyten. Als Folge dieser intrazellulären Vorgänge sind zudem als Zellantworten die der gerichteten Zellbewegung (Chemotaxis) zugrunde liegende Aktinpolymerisation, Adhäsion und Diapedese sowie Phagozytose und oxidativer Burst zu nennen. (*mechanistic Target of Rapamycin* (mTor), cellulläre Tyrosinkinase (SRC), *Actin-Related Proteins* (Arp)) (Abbildung modifiziert nach Stillie *et al.*, Waugh *et al.*, Mukaida^{[69] [70] [71]})

Wechselwirkung sowohl mit Endothelzellen als auch mit der extrazellulären Matrix zusätzlich verstärkt.^[76] Durch die Freisetzung unter anderem von α -Defensin 1 resultiert die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch CXCL8 als Chemoattraktant direkt und auch indirekt in einer chemotaktischen Wirkung auf T-Zellen. Zudem wird durch CXCL8 die Chemotaxis weiterer Blutzellen, wie zum Beispiel B-Zellen und Fibroblasten, ausgelöst.^[71]

Leukozyten folgen einem Chemokingradienten in Richtung der höchsten Konzentration am Entzündungsherd, wo die Diapedese, der Austritt von Blutzellen aus den Kapillarzellen in das Endothel, beobachtet werden kann. Diese transendotheliale Migration beginnt mit der Margination, der Verlangsamung des Blutstroms, was den Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen ermöglicht.^[77] Die ersten, noch von Chemokinen unabhängigen, Wechselwirkungen basieren auf Selektinen und führen zu einer langsamen, rollenden Leukozytenbewegung entlang des Endothels. Hierbei involviert sind das auf Leukozyten exprimierte L-Selektin sowie P- und E-Selektin auf Endothelzellen.^[78] zytoplasmatische Domänen dieser gebundenen und aktivierten Selektine sind mit Signaltransduktionswegen verbunden, welche neben inflammatorischen Cytokinen zur Aktivierung der auf Leukozyten präsentierten Integrine führt. Als Folge dieser Aktivierung wird die auf Selektinen aufbauende, reversible Adhäsion durch die Bindung dieser Integrine mit entsprechenden endothel-ständigen Rezeptorproteinen, wie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*), gefestigt.^{[79] [77] [78] [80]}

Die durch Degranulierung der neutrophilen Granulozyten freigesetzten Proteasen dienen dem Abbau der extrazellulären Matrix und sind unter anderem gegen Kollagen und Laminin gerichtet. Die Notwendigkeit solcher proteolytischer Prozesse sowie der genaue Vorgang des extravaskulären Durchgangs sind noch nicht endgültig geklärt, doch scheint die Einwanderung von Leukozyten sowohl para- als auch trans-zellulär, durch geöffnete endothel Zellkontakte, stattzufinden.^{[78] [81]}

Die durch Chemokine induzierte, gerichtete Migration basiert sowohl auf chemotaktischen als auch haptotaktischen Gradienten, wobei erstere die Konzentrationsänderung gelöster, letztere jene gebundener Stoffe beschreibt. Die Ausbildung eines haptotaktischen Chemokingradienten ist durch Bindung an Glykosaminoglykane (GAGs) möglich, durch welche CXCL8 am Endothel immobilisiert und konzentriert wird. Bei GAGs handelt es sich um aus Disaccharideinheiten bestehende, hochgeladene, lineare und sulfatisierte Polysaccharide, die sich in Länge, Zusammensetzung, Sulfatisierungsgrad und -muster stark unterscheiden und auf allen Säugerzellen exprimiert werden.^{[3] [82]} GAGs kommen in gelöster Form, oberflächengebunden sowie als Resultat des *Ectodomain-Sheddings*, der enzymatischen Abspaltung von Ektodomänen, vor.^[82] Die Verankerung in der Zellmembran und extrazellulären Matrix beruht auf der Bindung an Lipide oder Proteine, wobei die mit CXCL8 wechselwirkenden GAGs, Heparinsulfat (HS), Chondroitinsulfat (CS), Dermatinsulfat (DS) und Keratinsulfat (KS) hauptsächlich als Proteoglykane vorliegen.^{[3] [83]} CXCL8 bindet im unteren μM -Bereich, jedoch mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene GAGs, wobei die Affinität von Sulfatisierungsgrad und -muster beeinflusst zu werden scheint.^{[83] [44]} In die Wechselwirkung sind C-Terminus und α -Helix des CXCL8 involviert, wobei die Bindung in einer Oligomerisierung des Chemokins resultiert.^{[84] [85] [44]} Aufgrund der Vielfalt an Proteoglykanen ist die Bindung von CXCL8 an die einzelnen GAGs noch nicht endgültig erforscht.^{[86] [85]} Zusätzlich zur Ausbildung des haptotaktischen Gradienten besitzt die Bindung an GAGs regulatorische Funktionen. Einerseits resultiert die Bindung ober-

flächengebundener GAGs in einer erhöhten Affinität von CXCL8 zu seinen Rezeptoren und somit erhöhter Aktivität, andererseits inhibiert die Bindung löslicher GAGs an CXCL8 dessen Wechselwirkung mit den Rezeptoren.^{[44] [43]} Des Weiteren wird der proteolytische Abbau von CXCL8 durch die Bindung an GAGs verlangsamt, wodurch die erhöhte Konzentration aufrecht erhalten und die Wirkung verlängert wird.^[87]

1.1.4 Regulierung der Rezeptoraktivität

Der Austausch des im aktiven Zustand gebundenen GTP gegen GDP führt zu einer Beendigung des durch den Liganden ausgelösten Signals. Zusätzlich tragen G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GRK) durch Phosphorylierung hierzu bei. Neben der Regulierung der durch CXCL8 ausgelösten Effekte auf dieser Ebene der Rezeptoraktivierung durch oben genannte Vorgänge ist die Rezeptorinternalisierung als negativer Regulator zu nennen. Hierbei handelt es sich um einen von der Phosphorylierung des Rezeptors sowie Arrestin/Dynamin abhängigen Prozess, bei welchem die Adapterproteine β -Arrestine durch die Aktivierung der Clathrin-vermittelten Endozytose des Rezeptors dessen Deaktivierung einleiten.^{[88] [89]} Zusätzlich ist für CXCR2 eine phosphorylierungsunabhängige Internalisierung möglich.^[90] Diese Art der durch den Liganden selbst ausgelösten Rezeptorregulierung stellt einen zeit- und dosisabhängigen Prozess dar.^[91] In mehreren Experimenten wurde eine schnellere Internalisierung von CXCR2 nach Bindung von CXCL8 im Vergleich zu CXCR1 beobachtet, wobei sowohl Endozytose als auch der im nachfolgenden stattfindende erneute Transport des Rezeptors an die Plasmamembran bereits innerhalb von Minuten nachgewiesen werden konnte.^{[91] [90] [92] [93] [94]} Während die Rezeptoren rezykliert werden, wird CXCL8 nach der Internalisierung proteolytisch abgebaut.^[94] Dementsprechend werden für die Regulierung der beiden Rezeptoren unterschiedliche Mechanismen angenommen.^[92] Die Rezeptordimerisierung scheint jedoch keinen Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung zu nehmen.^[90] Zusätzlich zur Regulation der Desensitivierung scheint die Internalisierung ein für die gerichtete Zellmigration notwendiger Prozess zu sein.^[92]

Als weitere, die Bindung von CXCL8 an seine Rezeptoren modulierende Ereignisse, kann zum einen die Bindung an den Rezeptor DARC (*Duffy antigen/receptor for chemokines*) mit einem Einfluss auf den trans-epithelialen Transport des Chemokins und somit auf die Leukozytendiapedese genannt werden.^[95] Zum anderen wird die CXCL8/CXCR1-Wechselwirkung durch Bindung des Liganden an Proteine, wie α 1-Antitrypsin inhibiert. So führt ein Mangel dieses Proteins zu einer chronischen Lungenerkrankung, welche durch eine erhöhte Einwanderung von neutrophilen in die Lunge charakterisiert ist.^[96]

1.1.5 Krankheiten mit Beteiligung von CXCL8 und bereits identifizierte Inhibitoren

Oben erläuterte Effekte der Bindung von CXCL8 an seine Rezeptoren verdeutlichen die inflammatorische Wirkung des Proteins. Aufgrund dieser Eigenschaft ist es in einer Vielzahl von entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen involviert. Hierbei sind unter anderem die rheumatoide Arthritis, die kardiovaskuläre und weit verbreitete Erkrankung Arteriosklerose, die Erbkrankheit Mukoviszidose und die Autoimmunerkrankung Psoriasis vulgaris zu nennen.^{[97] [98] [58] [40]} Bei rheumatoider Arthritis, einer chronisch entzündlichen Gelenkerkrankung, stellen die ELR-positiven Chemokine ENA-78 (CXCL5), CXCL8 und Gro α (CXCL1) die Hauptmediatoren der Entzündung und Gelenkerstörung dar.^[99] Während im

gesunden Gelenk keine nachweisbaren Mengen an CXCL8 beobachtet werden, kann bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine erhöhte Konzentration an CXCL8 nachgewiesen werden, wobei die die Synovialis auskleidenden Zellen, gefolgt von Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten an der Produktion von CXCL8 beteiligt sind.^{[100][101][102]} Hierbei bildet sich durch die unterschiedliche Verteilung der CXCL8-positiven Zellen ein chemotaktischer Gradient aus, welcher die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Gelenklumen begünstigt.^[101] Neben einer erhöhten Konzentration an CXCL8 im entzündeten Synovialgewebe und -flüssigkeit, wird die Rolle des Chemokins durch eine erhöhte Konzentration an Autoantikörpern gegen CXCL8 bewiesen, da diese mit der Menge an C-reaktivem Protein, welches ein Maß für die Schwere der Erkrankung darstellt, korreliert.^[99] Die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch CXCL8 resultiert in einer Degranulierung dieser Immunzellen, was einen Abbau des Gelenkknorpels hervorruft.^[103] Sowohl die erhöhte Leukozytenzahl als auch die beobachtete Gelenkentzündung können durch den CXCR2-Antagonisten N-(3-(Aminosulfonyl)-4-chloro-2hydroxyphenyl)-N'-(2,3-dichlorophenyl)-Harnstoff reduziert werden. Hierbei handelt es sich um einen CXCR2-selektiven nicht-peptidischen Antagonisten. Durch diese inhibitorische Wirkung wird deutlich, dass die Wirkung des Chemokins bei rheumatoider Arthritis nicht auf beide Rezeptoren des Chemokins, sondern auf die Aktivierung von CXCR2 zurückzuführen ist.^[99] Neben diesen Sulfonamiden wurden weitere kleine Moleküle als Antagonisten der Rezeptorbindung ermittelt, worunter SB225002 als selektiver Inhibitor der CXCR2-CXCL8-Bindung einen Vertreter der Bisaryl-Harnstoffe darstellt.^[104] Des Weiteren sind auf Imidazolpyrimidin basierte Substanzen mit verbesserter oraler Verfügbarkeit und metabolischer Stabilität beschrieben.^[105] Chapman *et. al* veröffentlichte eine detaillierte Zusammenstellung der von Pharmaunternehmen näher untersuchten und teilweise in klinischen Phasen befindlichen Substanzen, unter anderem bei Schering-Plough, AstraZeneca und GlaxoSmithKline.^[106] Als nicht kompetitiver, allosterischer Inhibitor ist das Ketoprofen-Derivat Repertaxin zu nennen, welches sowohl durch spezifische interhelikale, polare als auch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Rezeptor dessen Aktivierung inhibiert.^[107]

Ein weiterer Ansatzpunkt besteht in der Synthese von Inhibitorpeptiden. So inhibiert das gegen mehrere Chemokine wirkende Antileukin (Ac-RRWWCR-NH₂) von CXCL8 ausgelöste Effekte ebenfalls.^[108] Als weiteres Beispiel ist das mit geringerer Affinität bindende Peptid VTTFFDYDYGAPC zu nennen.^[109] Zudem sind vom N-Terminus des Chemokins abgeleitete Peptide (Attwood *et al.* Ac-MWDFDD-Linker-MPPADEDYSP-NH₂), sowie das an die dritte und vierte extrazelluläre Domäne angelehnte, von Dorothea Helmer in unserem Arbeitskreis synthetisierte Peptid (CXCL8-RPLoops, AKWRMVLR-Ahx-ADTLMRTQ), welches in dieser Arbeit ebenfalls verwendetet wird, bekannt.^{[110][111][112]} Neben solchen antagonistisch wirkenden kleinen Molekülen bestehen weitere Ansatzpunkte zur Inhibierung der durch dieses Chemokin ausgelösten Effekte auf Antikörpern und N-terminal modifizierten Chemokinen.^{[113][107]}

Neben seiner inflammatorischen Wirkung besitzt CXCL8 eine Wirkung auf Zellzyklus und -wachstum. Durch die Beteiligung an Tumorwachstum, Angiogenese und der Metastasierung wird die Bedeutung des Chemokins in der Krebsforschung deutlich.^[114] Zusammenfassend handelt es sich bei CXCL8 zusätzlich zu seiner inflammatorischen Wirkung um ein angiogenetisches, anti-apoptotisches und proliferatives Protein, wodurch es in einer Vielzahl, unterschiedlicher Erkrankungen beteiligt ist, was die Notwendigkeit der Identifizierung potentieller Inhibitoren verdeutlicht.

1.2 Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen

1.2.1 Bindungsstudien

Die im Folgenden erläuterten theoretischen Grundlagen zur Charakterisierung einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung sind der folgenden Literatur entnommen: „Der Experimentator: Proteinbiochemie“ und „Technical Resource Guide“ von PanVera (Invitrogen®).^{[115][116]}

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D stellt eine wichtige Größe zur Beschreibung der Affinität der Bindungspartner zueinander dar. Während die Affinität ein Maß für die Stärke der Bindung darstellt, verdeutlicht die Spezifität die Tendenz der Bindung des Liganden an eine spezielle Bindungsstelle im Vergleich zu einer Vielzahl, in biologischen Systemen möglichen Bindungsstellen. Hierbei ist zu beachten, dass immer nur die Spezifität gegenüber einem tatsächlich gemessenen Bindungspartner angegeben werden kann. Besitzt der betrachtete Rezeptor mehrere Ligandenbindungsstellen, können allosterische Effekte auftreten, wobei der zuerst gebundene Ligand die Wechselwirkung zu weiteren Liganden negativ oder positiv beeinflussen kann. Liegt lediglich eine Ligandenbindungsstelle vor, kann die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung durch Gleichung 1.1 dargestellt werden, wobei ein Ligandmolekül (L) mit einem Rezeptormolekül (R) assoziiert (RL). Dabei sind mit k_{off} und k_{on} die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion gegeben.



Hieraus ergibt sich das Massenwirkungsgesetz der im Gleichgewicht befindlichen Interaktion, wodurch der Zusammenhang zwischen Gleichgewichtsassoziations- und dissoziationskonstante (K_A und K_D) deutlich wird:

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{[R] * [L]}{[RL]} \quad (1.2)$$

Die Geschwindigkeit der Assoziationsreaktion ist hierbei von der Konzentration beider Bindungspartner, [R] und [L], abhängig, weshalb sie als Reaktion zweiter Ordnung beschrieben werden kann. Die Dissoziationsreaktion wird dagegen Reaktionen erster Ordnung zugeordnet und wird nur von [RL], der Konzentration des Rezeptor-Ligandkomplexes, beeinflusst. Eine Reaktion befindet sich im Gleichgewicht, wenn die Zeitspanne nach Zugabe beider Komponenten mehrere Halbwertszeiten der Dissoziation und Assoziation beträgt und somit die Geschwindigkeit der Hinreaktion gleich jener der Rückreaktion ist. Die Assoziation ist thermodynamisch begünstigt, wenn K_D möglichst klein ist. Diese Größe beschreibt jene Konzentration des freien Liganden im Gleichgewicht bei welcher die Hälfte der vorhandenen Rezeptormoleküle, oder je nach Aufbau des Experiments der Ligandmoleküle, gesättigt ist. Der Zusammenhang zwischen freier Energie (G_0) und Gleichgewichtsdissoziationskonstante ist in Gleichung 1.3 zu sehen.

$$\Delta G_0 = R * T * \ln K_D = -R * T * \ln K_A \quad (1.3)$$

R steht hierbei für die allgemeine Gaskonstante, T für die absolute Temperatur. Zur praktischen Analyse einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung wird je nach Methode die Konzentration einer der Komponenten konstant gehalten (L_0 , R_0), während die andere in steigenden Konzentrationen zugegeben wird. Zur Bestimmung der Bindungsparameter entsprechend des Massenwirkungsgesetzes aus Gleichung 1.2 werden jedoch die Gleichgewichtskonzentrationen der Bindungspartner ($[R]$ und $[L]$) benötigt, welche bei der Messung jedoch mit Ausnahme von Dialyseverfahren nicht zugänglich sind. Dieses Problem kann durch folgenden Zusammenhang aus Gleichungen 1.4 und 1.5 umgangen werden:

$$[R]_0 = [R] + [RL] \quad (1.4)$$

$$[L]_0 = [L] + [RL] \quad (1.5)$$

Die anfänglich eingesetzten Gesamtkonzentrationen $[R]_0$ und $[L]_0$ setzen sich entsprechend der geltenden Erhaltungsgleichungen aus der Konzentration an freien Molekülen, $[R]$ und $[L]$ sowie jener des Rezeptor-Ligand-Komplexes, $[RL]$, zusammen. Durch Einsetzen in das Massenwirkungsgesetz und Umformen ergibt sich folgende Gleichung 1.6:

$$K_D = \frac{([R]_0 - [RL]) * ([L]_0 - [RL])}{[RL]} \quad (1.6)$$

In einem Rezeptor-Ligand-System mit gleichwertigen und unabhängigen Rezeptoren sollten die Versuchsbedingungen so gewählt werden, dass sich die Konzentration an freiem Rezeptor auch nach Einstellen des Bindungsgleichgewichts nicht signifikant ändert, sodass:

$$[R]_0 \gg [L]_0 \quad (1.7)$$

und

$$[R]_0 \approx [R] \quad (1.8)$$

Gleichung 1.6 vereinfacht sich für den Versuchsaufbau mit konstanter Ligandkonzentration und steigender Rezeptorkonzentration demnach zu 1.9:

$$\frac{1}{K_D} = \frac{[RL]}{[R] * ([L]_0 - [RL])} \quad (1.9)$$

Ändert sich die Anzahl ungebundener Moleküle durch stufenweise Zugabe des Bindungspartners, so spricht man bei konstanter Rezeptorkonzentration von einer Liganddepletion bzw. bei konstanter Ligandkonzentration von einer Rezeptordepletion. In diesen Fällen ist die erwähnte Vereinfachung nicht möglich.

Durch Auflösen von Gleichung 1.9 nach [RL] kann die zur weiteren Berechnung der Bindungsparameter benötigte Sättigung B des Liganden, wie in Gleichung 1.10, ausgedrückt werden.

$$\frac{[\text{RL}]}{[\text{L}]_0} = \frac{[\text{R}]}{K_D + [\text{R}]} = B \quad (1.10)$$

Bei geeigneter Wahl der jeweiligen Konzentrationen in einem Titrationsversuch und Auftragung der Sättigung B gegen die steigende Konzentration des Rezeptors ergibt sich eine hyperbolische Bindungsisotherme, bzw. bei semilogarithmischer Auftragung ein sigmoidaler Verlauf. Die Sättigungskurve nähert sich hierbei dem Wert 1, was bedeutet, dass alle Ligandmoleküle gebunden vorliegen. Bei semilogarithmischer Auftragung kann der K_D direkt aus dem Wendepunkt im Kurvenverlauf abgeschätzt werden. Um sowohl den Bereich der Sättigung als auch des freien Liganden zu erfassen, sollte die Konzentration der variierten Komponente, hier jene des Rezeptors, etwa zwei Größenordnungen unterhalb bis zwei Größenordnungen oberhalb des erwarteten K_D und die Konzentration des Liganden unterhalb jener des K_D liegen. Bei bekanntem Verhältnis von RL zu R_0 kann eine lineare Regression nach Scatchard zur Auswertung durchgeführt werden. Hierbei wird der Quotient $[\text{RL}]/[\text{R}]$ gegen die Konzentration des gebundenen Liganden $[\text{RL}]$ aufgetragen, worauf sich K_D als negative, reziproke Steigung und B_{max} als Achsenabschnitt der linearen Gleichung ermitteln lassen. Die zugehörige linearisierte Form von Gleichung 1.9 ist in 1.11 dargestellt.

$$\frac{[\text{RL}]}{[\text{R}]_0} = -\frac{1}{K_D} * [\text{RL}] + \frac{[\text{L}]_0}{K_D} \quad (1.11)$$

Diese Art der Darstellung ermöglicht zudem die Identifizierung unspezifischer Bindungen sowie positiver und negativer Kooperation bei mehreren Ligandbindungsstellen. So deutet ein konkaver Kurvenverlauf mit negativer Steigung, welcher sich der x-Achse asymptotisch nähert, auf unspezifische Wechselwirkungen oder negative Kooperation hin, wohingegen ein konkaver Verlauf, welcher durch den Ursprung des Koordinatensystems verläuft, eine positive Kooperation vermuten lässt. Ist die lineare Regression nach Scatchard nicht möglich, bietet sich die Auswertung mit einer geeigneten Software zur nicht-linearen Regression an.

Zur Identifizierung eines potentiellen Inhibitors wird ermittelt, in welchem Ausmaß die Rezeptor-Ligand-Bindung durch den Inhibitor verringert wird. Man unterscheidet zwischen kompetitiver und unkompetitiver, allosterischer und kovalenter Inhibierung. Bei ersterer konkurriert der Inhibitor selbst mit dem Liganden um dessen Bindungsstelle am Rezeptor, während sowohl bei einer unkompetitiven als auch einer allosterischen Hemmung unterschiedliche Bindungsstellen für Ligand und Inhibitor vorliegen. Im Fall eines unkompetitiven Inhibitors bleibt die Substratbindungsstelle im Gegensatz zur Bindung eines allosterischen Inhibitors intakt. Die kovalente Inhibierung stellt im Gegensatz zu den bereits erläuterten eine irreversible Hemmung dar. Die Affinität der Inhibitor-Rezeptor-Wechselwirkung, K_i , wird in einem Kompetitionsassay anhand der IC_{50} ermittelt, wobei beide Gleichgewichtskonstanten über die Cheng-Prusoff-Gleichung, 1.12 miteinander verbunden sind.

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[L]}{K_D}\right) * K_i \quad (1.12)$$

Die gemessene Größe IC_{50} gibt die Konzentration des Inhibitors an, die nötig ist, um die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung um 50 % zu hemmen. Wird eine konstante Konzentration an markiertem Liganden durch eine steigende Konzentration desselben unmarkierten Liganden verdrängt, spricht man von einem homologen Konkurrenzexperiment. Der hieraus berechnete K_i -Wert sollte aufgrund der identischen Affinitäten der konkurrierenden Komponenten dem K_D entsprechen.

1.2.2 Bindungsstudien zur Untersuchung der Wechselwirkung von Chemokinen mit ihren Rezeptoren

Zur Charakterisierung einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung und Berechnung von Bindungskonstanten sind für Chemokine und ihre Rezeptoren verschiedene Methoden bekannt. Wichtige Aspekte zur Bewertung eines solchen Assays stellen unter anderem der Arbeitsaufwand, die Sensitivität und die Übertragbarkeit auf andere Rezeptor-Ligand-Paare dar. Zusätzlich muss beim Einsatz markierter Bindungspartner der Einfluss der Modifizierung auf die Affinität der untersuchten Bindung geprüft werden. Der Radioligand-Bindungsassay stellt einen bereits seit mehreren Jahrzehnten etablierten Vertreter dar. Hierbei wird eine definierte Zellzahl, die den entsprechenden Rezeptor exprimiert, mit steigenden Konzentrationen an radioaktiv markiertem Liganden, z. B. ^{125}I -CXCL8, inkubiert, zur Abtrennung des ungebundenen Liganden mehrmals gewaschen und nach Lyse der Zellen die Konzentration an gebundenem Liganden aus der gemessenen Radioaktivität ermittelt. Es handelt sich somit um einen heterogenen Assay. Alternativ wird statt vollständiger Zellen eine Membranpräparation eingesetzt.^{[104] [117]} Ein wichtiger Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität, welche Messungen bis in den oberen pikomolaren Bereich ermöglicht. Zur Identifizierung potentieller Inhibitoren ist ein Verdrängungsassay im Hochdurchsatzverfahren möglich, bei welchem der markierte Tracer von unmarkierten Substanzen verdrängt wird.^[104] Neben hohen Materialkosten, der Notwendigkeit spezieller Labore zum Strahlenschutz und umweltbezogener Aspekte ist die nötige Trennung von freien Liganden und gebundenem Liganden als Nachteil zu nennen.

Diese Aspekte haben die Entwicklung auf Fluoreszenz basierender Methoden gefördert. Durch fluoreszente Markierung beider Bindungspartner kann ein sogenannter FRET-Assay (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer, auch Förster-Resonanzenergietransfer) durchgeführt werden. Hierzu werden zwei verschiedene Fluorophore eingesetzt, wobei die Emissions- und Absorptionsspektren überlappen müssen. Bei Annäherung der Bindungspartner verringert sich der Abstand der Fluorophore zueinander ebenfalls, sodass ein entfernungs-sensitiver Energietransfer möglich wird. Bei einer Entfernung in der Größenordnung des Förster-Radius, i. d. R. 1-10 nm, kann die zur Anregung des Donors verwendete Energie strahlungsfrei auf den Akzeptor übertragen werden.^[118] Neben der Messung der Akzeptoremission kann die Abnahme der Donatoremission durch Titration des Liganden, auch zeitaufgelöst, ermittelt werden.^[119] Diese Methode ist als Verdrängungsassay zum Inhibitorscreening des Ligand-Rezeptor-Paares CXCL12-Texas-Red/CXCR4-EGFP bereits etabliert worden.^[120] Besonders zur Analyse der Wechselwirkung eines Rezeptors mit Liganden niedrigerer Affinität, für welche Konzentrationen im μ M-Bereich benötigt werden, bietet sich ein FRET-Assay mit

EGFP-markiertem Rezeptor und nicht-fluoreszent markiertem Liganden an, wobei der Ligand aufgrund der spektralen Überschneidung bei Bindung an den Rezeptor als Fluoreszenzquencher dient.^[121] Während die Durchführung dieser homogenen Assays die Trennung des gebundenen von ungebundenem Liganden nicht erfordert, ist die Markierung des Rezeptors und Liganden, nicht aber der Inhibitoren, nötig, was durch rekombinante Expression als Fusionsproteine möglich ist oder die Modifizierung bereits rekombinant hergestellter Proteine und weitere Reinigungs- und Analyseschritte verlangt. Weiterhin ist ein Fluoreszenzassay publiziert, in welchem eine Mutante des Chemokins CXCL8, CXCL8S72C, mit einem Europiumkomplex gekuppelt wurde. Die Durchführung erfolgte hierbei analog jener der Radioligand-Bindungsassays, wobei der Nachweis des gebundenen Liganden durch Zugabe eines gelösten Chelators erfolgt. Dieser komplexiert die im $[\text{Eu}^{3+}]$ -CXCL8S72C vorliegenden Metallionen, sodass die in Lösung gemessene Fluoreszenz quantifiziert werden kann. Diese Methode zeigt alle Vorteile der Radioligand-Bindungsassays, kommt jedoch ohne Radioaktivität aus. Sie erfordert jedoch ebenfalls die Trennung des gebundenen von ungebundenem Liganden.^[122] Eine weitere, der Fluoreszenzmessung zugrunde liegende Möglichkeit zum Nachweis einer Bindung ist die markierungsfreie Messung der Autofluoreszenz von Tryptophan, welche bereits zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen CXCL12 und potentiellen Inhibitoren beschrieben wurde.^[120] Wesentliche Probleme bei der Aufnahme einer Bindungskurve basierend auf Fluoreszenzintensitätsmessungen bestehen in der bei biochemischen Proben auftretenden Autofluoreszenz, da die meisten Proteine Tryptophan enthalten, sodass solche Messungen nur *in vitro* sinnvoll sind. Zudem erfordert die Fluoreszenz des ungebundenen und markierten Liganden auch hier eine Trennung des gebundenen von freiem Ligand. Die Konjugation des Liganden (am Beispiel des Peptidliganden Carbetocin des Oxytocin-Rezeptors) mit dem solvatochromen Farbstoff Nilrot ermöglichte die Etablierung eines weiteren, homogenen Assays zur Quantifizierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in vitalen Zellen. Grundlage ist die Abhängigkeit der Emission des fluoreszierenden Solvatochroms von der chemischen Umgebung, welche sich durch Bindung an den Oxytocin-Rezeptor ändert. Während für freie Liganden im wässrigen, polaren Milieu keine Fluoreszenz beobachtet werden kann, führt die apolare Umgebung des gebundenen Liganden zu einer detektierbaren Fluoreszenzintensität.^[123] Als weiteres Beispiel der homogenen Assays ist der Fluoreszenzpolarisations- oder -anisotropie-Assay zu nennen, welcher ausführlich unter 1.3 beschrieben wird. Hierbei wird der kleinere Bindungspartner, welcher als freier Ligand eine hohe Beweglichkeit aufweist, fluoreszent markiert und mit polarisiertem Licht angeregt. Nach Bindung an den Rezeptor wird diese Beweglichkeit herabgesetzt, was in einer Zunahme der Fluoreszenzanisotropie des emittierten Lichts resultiert. Dieser Assay zeichnet sich durch den geringen Arbeitsaufwand, die je nach Fluorophor und Messgerät hohe Sensitivität sowie den geringeren Materialverbrauch aus und ist für kleine Hormone und Peptidliganden mit den jeweiligen GPCRs auch im Hochdurchsatzverfahren beschrieben.^{[124][125]} Als Nachteil ist auch hier die notwendige Markierung der Liganden mit zugehörigen Reinigungs- und Analyseschritten zu nennen.

Eine weitere, fluoreszenzunabhängige Methode zur näheren Charakterisierung einer biochemischen Bindung stellt die isotherme Titrationskalorimetrie dar. Hierbei werden die thermodynamischen Parameter wie Bindungsenthalpie, Entropie und Gibbs'sche Enthalpie sowie die Bindungsaffinität ermittelt. Dieses Verfahren ist jedoch für membrangebundene Rezeptoren schwierig durchzuführen und eignet sich zudem nicht zur Durchführung im Hochdurchsatz, sondern dient hauptsächlich der genaueren Beschreibung einer bereits ermittelten Wechselwirkung bzw. der Bestätigung der in einem Screening entdeckten Inhibito-

ren und deren Bindung an den Rezeptor oder Liganden.^[120] Weitere Methoden, welche unter anderem strukturelle und thermodynamische Informationen sowie Auskunft über die Bindungskinetik liefern, sind die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*Surface Plasmon Resonance* SPR) und die Analyse einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung mittels NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*)^{[109] [45] [126]} Bei letzterer ist die Isotopenmarkierung, oftmals mit ^{15}N , eines der Bindungspartner nötig, während die beiden erstgenannten Verfahren zwar markierungsfreie Methoden darstellen, allerdings ist bei der SPR die Immobilisierung eines der Bindungspartner nötig.

1.3 Fluoreszenzpolarisation

Als Grundlage der erläuterten Theorie zur Fluoreszenzpolarisation wurde folgende Literatur genutzt: Der Aufsatz „*Fluorescence polarization: past, present and future*“ und das Lehrbuch „*Principles of fluorescence spectroscopy*“.^{[127] [118]}

Bei Anregung eines Fluorophors mit linear polarisiertem Licht ist das emittierte Licht ebenfalls polarisiert. Ist die Rotationsdiffusionszeit der frei in Lösung beweglichen Moleküle jedoch kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer, die Zeitspanne zwischen Exzitation und Emission, so sinkt die beobachtete Polarisation, da sich die Orientierung der Moleküle innerhalb dieser Zeitspanne ändert. Das emittierte Licht erscheint insgesamt depolarisiert. Die ermittelte Polarisation korreliert demnach mit der Rotationsdiffusion (Beweglichkeit) und somit mit dem Volumen des fluoreszenzmarkierten Moleküls und kann zur Detektion der Wechselwirkung zweier Moleküle stark unterschiedlicher Größe genutzt werden. Das Prinzip einer Fluoreszenzpolarisationsmessung ist in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt. Die Polarisation (P) des

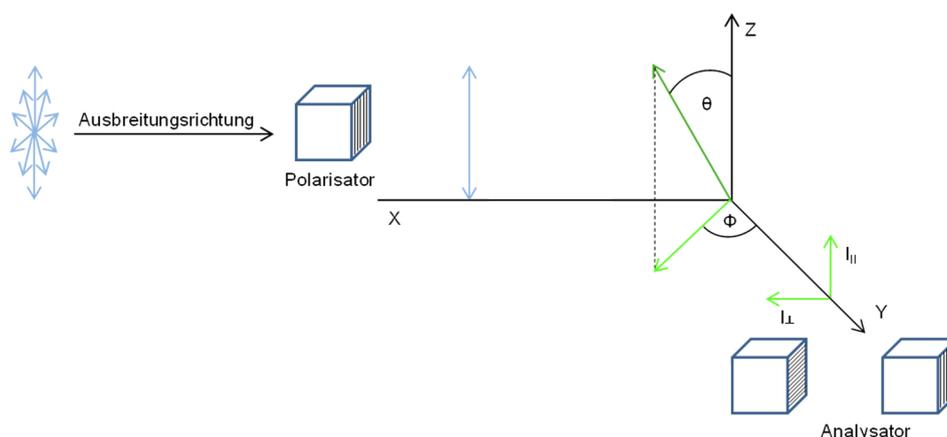


Abbildung 1.4: **Technischer Aufbau zur Messung der Fluoreszenzpolarisation.** θ beschreibt den Winkel zwischen der Orientierung des elektrischen Feldvektors (blau) und des molekularen Übergangsdipolmoments, ϕ jenen Winkel der Projektion von diesem mit der Y-Achse. I_{\parallel} und I_{\perp} sind die durch Analysatoren gemessenen parallelen und perpendicularen Intensitäten des emittierten Lichts. (Abbildung modifiziert nach *Jameson und Crony*.^[127])

emittierten Lichts errechnet sich, aus diesem Messaufbau folgend, nach Gleichung 1.13, wobei I_{\parallel} und I_{\perp} die durch Analysatoren gemessenen parallelen und perpendicularen Intensitäten des emittierten Lichts sind

und G für den Gerätefaktor, welcher die unterschiedliche Empfindlichkeit des Detektorsystems für parallele und perpendikuläre Strahlung korrigiert, steht:

$$P = \frac{I_{\parallel} - G * I_{\perp}}{I_{\parallel} + G * I_{\perp}} \quad (1.13)$$

Fluoreszenzpolarisation und Fluoreszenzanisotropie (r) beschreiben dasselbe Phänomen und können durch Gleichung 1.14 ineinander umgerechnet werden.

$$r = \frac{2 * P}{3 - P} \quad (1.14)$$

Die Anregung mit linear polarisiertem Licht basiert auf der sogenannten Photo Selektion. Licht kann als senkrecht zur Ausbreitungsrichtung schwingendes elektromagnetisches Feld betrachtet werden. Beim Passieren eines Polarisationsfilter wird nur noch eine Ebene des perpendikular zur Ausbreitungsrichtung stehenden elektrischen Feldvektors durchgelassen, welcher dann der Anregung von Fluorophoren dient. Es können jedoch nur solche Moleküle angeregt werden, deren Übergangsdipolmoment der Absorption parallel zu jenem dieses elektrischen Feldvektors ausgerichtet ist. Demnach wird nur ein Teil der Fluorophore, jene Moleküle mit entsprechender Orientierung, angeregt. Die Wahrscheinlichkeit der Anregung ist somit proportional zum Quadrat des Kosinus des Winkels zwischen der Orientierung des elektrischen Feldvektors und des molekularen Übergangsdipolmoments θ . Dieser Zusammenhang ist in Gleichung 1.15 zu sehen:

$$P_{Absorption} \propto \cos^2 \theta \quad (1.15)$$

In Abbildung 1.4 wird angenommen, dass Absorptions- und Emissionsdipolmoment der Probe parallel zueinander stehen, sodass der Winkel β zwischen diesen 0° beträgt. Dieser Winkel nimmt Einfluss auf die intrinsische Polarisation (P_0), welche bei unbeweglichen Fluorophoren in Abwesenheit depolarisierender Effekte beobachtet werden kann. In Lösung kann die Polarisationen je nach β Werte zwischen 20 und 400 mP (Millipolarisationseinheiten) erreichen. Der Zusammenhang zwischen β und intrinsischer Polarisation P_0 ist in Gleichung 1.16 gegeben. Je kleiner β , desto größer die gemessene P_0 .

$$\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} = \frac{5}{3} * \left(\frac{2}{3 * \cos^2 \beta - 1} \right) \quad (1.16)$$

Kommt es zur Rotation des Fluorophors während der Fluoreszenzlebensdauer, so weicht die Ebene des emittierten Lichts von jener des Anregungslichts ab, wobei die ungeordnete Rotation vieler freier Fluorophore bewirkt, dass das emittierte Licht der Lösung insgesamt betrachtet depolarisiert erscheint. Der Zusammenhang zwischen der detektierten Polarisation (P) und Versuchsparametern wie der Viskosität der Lösung (η), der Größe des Fluorophors (V) oder der Fluoreszenzlebensdauer (τ) wurden erstmals durch Perrin

1926 als Gleichung 1.17 formuliert, wobei die unter 1.18 gezeigte Definition der Rotationsrelaxationszeit (ρ_0) bereits berücksichtigt ist.^{[128][127]}

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) * \left(1 + \frac{3 * \tau}{\rho} \right) \quad (1.17)$$

$$\rho_0 = \frac{3 * \eta * V}{R * T} \quad (1.18)$$

R ist hierbei die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur und τ die Fluoreszenzlebensdauer. Da die ermittelte Polarisation mit der Rotationsdiffusion (Beweglichkeit) und somit mit dem Volumen des fluoreszent markierten Moleküls korreliert, kann die Bindung eines kleineren Fluorophors an ein größeres Molekül, den Rezeptor, durch einen Anstieg der Polarisation detektiert werden, sodass sich diese Methode gut zur Untersuchung von Bindungen eignet.

Die Messung der Polarisation ergibt ein gewichtetes Mittel der Polarisationswerte aller angeregten Komponenten. Aufgrund der Komplexität der von Weber aufgestellten Formel wird dieser additive Effekt zumeist nach Jablonski anhand der Anisotropie berechnet, wobei sich die beobachtete Anisotropie r_{gesamt} einer Probe mit i Komponenten wie in 1.19 zusammensetzt^{[129][130]}:

$$r_{gesamt} = \sum f_i * r_i \quad (1.19)$$

Durch den Faktor f_i werden die einzelnen Komponenten entsprechend ihres Anteils an der Gesamtpopulation gewichtet. Die Bindung des Liganden kann zu einer Änderung von dessen Fluoreszenzintensität führen, weshalb eine Korrektur der gemessenen Anisotropie mit Hilfe der Intensitäten im freien und gebundenen Zustand durchgeführt werden muss.^{[131][132]} Gleichung 1.20 zeigt die Berechnung der korrigierten Anisotropie r_{korrr} , in dieser Arbeit nach Dandliker *et al.* durchgeführt.^[133]

$$r_{korrr} = \frac{\left(\frac{r-r_f}{r_b-r} * \frac{Q_f}{Q_b} * r_b \right) + r_f}{1 + \left(\frac{r-r_f}{r_b-r} * \frac{Q_f}{Q_b} \right)} \quad (1.20)$$

Hierbei stellen die Indizes „f“ und „b“ jeweils den freien bzw. gebundenen Zustand des Tracers dar, während r die Anisotropie und Q die Fluoreszenzintensität beschreiben. Im Fall des freien Tracers können diese direkt gemessen werden, während r und Q des gebundenen Tracers als Asymptoten der Bindungsisothermen angenähert werden. Bei bekannter Rezeptorkonzentration im Gleichgewicht können die Werte des gebundenen Zustands auch aus den unter 1.21 und 1.22 dargestellten Gleichungen durch lineare Regression berechnet werden, wobei Q_b und r_b jeweils als Y-Achsenabschnitt der nach Auftragung von Q/r gegen den entsprechenden Bruch erhaltene Gerade ermittelt werden, wobei zur linearen Regression nach der Beschreibung im „Fluorescence Polarization Technical Resource Guide“ (Invitrogen Corporation) die Werte der acht (neun) höchsten Rezeptorkonzentrationen verwendet wurden.

$$Q = Q_b + \frac{Q_f - Q}{[\text{Rezeptorkonzentration}]} \quad (1.21)$$

$$r = r_b - \frac{Q_f * (r - r_f)}{Q_b * [R]} \quad (1.22)$$

1.4 Aktivitätsassays

Die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren resultiert in der Aktivierung verschiedenster Signaltransduktionswege und Zellantworten, jene die durch die Bindung von CXCL8 an seine Rezeptoren ausgelöst werden, sind in Kapitel 1.1.3 bereits näher erläutert worden. Die Messung eines Ereignisses in der ersten Stufe der beginnenden Signalkaskade reduziert aufgrund der zunehmenden Vernetzung der einzelnen Signalwege mit weiteren Schritten in der Kaskade mögliche falschpositive Signale, wohingegen ein späteres Ereignis wegen der entstehenden Signalverstärkung ein besseres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ergibt.^[134] Dementsprechend kann bereits der unmittelbar nach Bindung des Liganden stattfindende Guaninnukleotid-austausch des G-Proteins durch Radioaktivitäts- oder zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung detektiert werden. Zur Detektion der intrazellulären Konzentration von *second messenger* wie Ca^{2+} , welches durch die Bindung von CXCL8 ansteigt, cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und IP_3 sind bereits eine Vielzahl von Assays etabliert und kommerziell erhältlich.^[134] Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Reporter genen (z.B. *cAMP response element* (CRE)), welche unter anderem die durch die Signalkaskade gesteuerte Gentranskription erfassen und somit rückwirkend Auskunft über den aktivierten Signalweg geben. Zum Nachweis dieser werden oftmals enzymatische Reporter wie beispielsweise Luciferase, β -Galaktosidase oder die Alkalische Phosphatase eingesetzt. Durch kolorimetrische, fluoreszente oder lumineszente Messungen kann die enzymatische Aktivität analysiert werden.^{[135][134]} Während sich die Verwendung dieser Assays auf die jeweils entsprechenden G-Protein-Untereinheiten beschränkt, stellen auf der Rezeptorinternalisierung und -dimerisierung basierende Assays universell anwendbare Verfahren dar, da sie von der Art des gekoppelten G-Proteins unabhängig sind.^[134] So präsentieren die durch β -Arrestine vermittelten Signalwege Angriffspunkte zur Untersuchung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, wobei sogenannte *β -Arrestin-recruitment*-Assays bekannt sind.^[136] Zusätzlich tragen β -Arrestine neben der Desensitivierung von GPCRs zur Aktivierung von MAPKinase-Wegen (*mitogen-activated protein*) bei.^[137] Die Aktivierung dieser Phosphorylierungskaskaden, die neben dem Einfluss von β -Arrestin durch unterschiedliche Wege nach Bindung eines Liganden an GPCRs aller G-Protein-Untergruppen ausgelöst wird, kann mit immunologischen Methoden nachgewiesen werden.^{[138][139][140]}

Die bisher genannten Verfahren umfassen sowohl Methoden mit lebenden Zellen als auch zellfreie Assays, allerdings werden stets bestimmte Markierungen benötigt. Neben diesen markierungsbasierten Assays existieren auch markierungsfreie Methoden. Hierbei bedient man sich optischer oder elektrischer/Impedanzbasierter Biosensoren, wobei komplexere Zellantworten der Rezeptoraktivierung, zumeist am Ende der Kaskade, wie beispielsweise Adhäsion, Proliferation oder der Zelltod, betrachtet werden.^[136] Je nach Men-

ge der ausgewerteten Information kann zudem zwischen sogenannten Hochdurchsatz (*High-Throughput-Screening* (HTS)) und *High-content screening* (HCS)) unterschieden werden.^[134] Ersteres kennzeichnet sich durch die Möglichkeit, eine Vielzahl potentieller Substanzen effizient durch Vergleich nur eines definierten Parameters im Hochdurchsatz vergleichen zu können. Dementsprechend ist die Detektion oben genannter sekundärer Botenstoffe zum Inhibitorscreening im (ultra) HTS-Format (zum Screening von bis zu einer Millionen Komponenten in 3456 Wellplatten) bereits etabliert.^{[141][142][143][144]} Letzterem werden Assays zugeordnet, welche zusätzlich durch den Einsatz von Fluorophoren mit unterscheidbaren Emissionsmaxima die Analyse mehrerer Biomoleküle innerhalb einer Messung ermöglichen und somit eine detaillierte Darstellung des durch eine Rezeptoraktivierung ausgelösten Mechanismus preisgeben.^[145] Hochdurchsatzscreening ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* möglich und basiert in der Regel auf fluoreszenten Sonden und chemolumineszenten Reaktionen oder Absorptionsmessungen.^[146] Die Durchführung eines Assays im Hochdurchsatzverfahren erfordert eine ausreichende Sensitivität, Reproduzierbarkeit und damit Stabilität. Die von Zhang *et al.* näher erläuterte Definition des einheitslosen Z' -Faktors erlaubt die Evaluation und den direkten Vergleich verschiedener Assays. Die Formel zur Berechnung dieser Größe ist in Gleichung 1.23 zu sehen.^[136]

$$Z' = 1 - \frac{3\sigma_{max} + 3\sigma_{min}}{|\mu_{max} - \mu_{min}|} \quad (1.23)$$

μ stellt hierbei den Mittelwert der jeweiligen Probe, σ die Standardabweichung der jeweiligen Probe dar. Der Faktor beinhaltet somit sowohl die dynamische Breite eines Assays, also die Differenz zwischen den Mittelwerten der Positiv- und Negativkontrolle (μ_{max} , μ_{min}) bzw. zwischen Kontrolle und Probensignal, als auch die Streuung der gemessenen Daten (σ_{max} , σ_{min}). Ein zur Identifizierung wirksamer Substanzen optimaler Bereich wird hierbei als jener Bereich definiert, der sich zwischen den Häufigkeitsverteilungen der beiden Proben befindet, sodass trotz Streuung der Messdaten keine Überschneidung der Datenverteilungen vorliegt (3σ -Intervall). Die Bereiche der Messdaten werden hierbei in beiden Richtungen als Mittelwerte zuzüglich der dreifachen Standardabweichung dieser Mittelwerte definiert. Zur Etablierung eines Assays bietet sich die Berechnung von Z' anhand einer Negativ- und einer Positivkontrolle als Qualitätskontrolle an. Zusätzlich können auf diese Weise auch Messdaten zu testender Substanzen (Z -Faktor) hinsichtlich ihrer Qualität geprüft werden. Ein qualitativ hochwertiger Assay zeichnet sich durch einen Z' -Faktor zwischen 0,5 und 1 aus.^[136]

1.4.1 Aktivitätsassays zur Untersuchung der durch CXCL8 ausgelösten Signalwege

Zur Untersuchung der durch die Bindung von CXCL8 an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 ausgelösten Mechanismen sind bereits die Signaltransduktionsebene betreffende als auch die komplexere Zellantwort betrachtende Methoden etabliert. Der nach Bindung des Chemokins ausgelöste Ca^{2+} -Einstrom kann mittels fluoreszenter Komplexbildner (Indo-1-AM, Fura-2AM) detektiert werden.^[147] Eine weitere, mikroskopische Methode besteht in der transienten Transfektion eines fluoreszent markierten Reporterproteins, des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), welcher durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin aktiviert wird und aus dem Zytoplasma in den Zellkern migriert.^[148]

Ein weiterer sekundärer Botenstoff, cAMP, wird durch die an die Rezeptoren von CXCL8 gekoppelten G-Protein-Untereinheiten inhibiert. Ein auf diesem Molekül aufbauender Assay erfordert aus diesem Grund die vorherige Stimulierung der cAMP-Produktion durch das die Adenylylcyclase aktivierende Forskolin. Die Zugabe von CXCL8 bewirkt wiederum eine Verringerung der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation, wobei die Konzentration des sekundären Botenstoffes im enzymatischen Immunoassay detektiert werden kann.^[149] Zur Analyse der Phosphoinositid-Hydrolyse sowie der GTPase-Aktivität wird jeweils ein zur Reaktion benötigtes Edukt durch eine entsprechend radioaktiv markierte Form des Moleküls zur Messung der Umsetzung ersetzt und die Produkte nach einer Inkubation mit und ohne CXCL8 verglichen.^[117]^[147] Der Austausch der Guaninnukleotide nach Bindung der G-Proteine an den aktivierten Rezeptor ist für das hier betrachtete Ligand-Rezeptor-Paar ebenfalls unter Einsatz des nicht hydrolysierbaren [³⁵S]-GTP γ beschrieben.^[147] Des Weiteren ist der Einsatz von [³²P]-Orthophosphat im Radioimmunpräzipitationsassay zur Beobachtung der Phosphorylierung der Rezeptoren CXCR1/2 sowie die hierdurch induzierte Aktivierung der Phospholipase C β , welche sich ebenfalls in einer Phosphorylierung des Enzyms äußert, beschrieben.^[117]^[147] Der Nachweis einer Aktivierung der Phospholipase D stellt ebenfalls eine auf Radioaktivitätsmessung basierende Methode dar, wobei die Entstehung von Phosphatidylethanol gemessen wird.^[150] In Bezug auf aktivierte MAP-Kinase-Wege kann die ERK1/2-Phosphorylierung mittels immunologischer Methoden beispielsweise in einer Western Blot-Analyse mit verschiedenen Antikörpern erfolgen.^[42]^[148] Als nicht radioaktive Methode ist die fluorimetrische Beobachtung der β -Arrestin-Bewegungen nach Transfektion mit entsprechend fluoreszierenden Fusionsproteinen zu nennen.^[42] Zum Nachweis der Rezeptorinternalisierung sind sowohl fluorimetrische als auch radiometrische Assays etabliert. Dabei sind sowohl die Verwendung eines mit Carboxyfluorescein markierten CXCL8 und die Zugabe fluoreszent markierter Antikörper gegen CXCL8 als auch der Einsatz von radioaktiv markiertem CXCL8 beschrieben. Die Durchführung mit letztgenanntem entspricht jener von Radioligand-Bindungsassays bei physiologischer Temperatur, 37°C, mit längeren Inkubationszeiten.^[149]^[148]^[117]

Zur Beobachtung sowohl der inflammatorischen als auch angiogenetischen Wirkung dieses Chemokins ist der Transwell-Assay zur Untersuchung der durch CXCL8 eingeleiteten Chemotaxis bereits für adhärenzte und Suspensionszelllinien beschrieben.^[151]^[152]^[153]^[42] Die Analyse der zur Zellfortbewegung notwendigen Aktinpolymerisation ist ebenfalls mit permeabilisierten und fixierten Zellen mit anschließender Färbung des Aktins in einer Fluoreszenzmessung publiziert.^[153] Zudem ist ein Assay zur Untersuchung der durch CXCL8 induzierten Adhäsion von Zellen an Komponenten der extrazellulären Matrix sowie der Nachweis der bei entzündlichen Prozessen durch neutrophile Granulozyten freigesetzten Elastase durch Zugabe fluoreszent markierter Substrate beschrieben.^[154]^[155] Ebenso kann die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies beispielsweise durch die Zugabe von 2,7-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat verfolgt werden, da dieses nach Spaltung des Esters oxidiert wird und das entstehende, fluoreszierende Produkt durchflusszytometrisch detektiert werden kann.^[156] Zusätzlich sind die anti-apoptotische und proliferative Wirkung des Chemokins betreffend Apoptose - und Proliferationsassays publiziert.^[152] Während der Großteil der genannten Methoden zur Untersuchung der durch CXCL8 angestoßenen Signalwege genutzt wurde, dienen der erwähnte Chemotaxis-Assay und der Nachweis der Ca²⁺-Mobilisierung der Bestätigung potentieller, mit den Rezeptoren wechselwirkender Inhibitoren.^[104] Zur Darstellung des CXCR2-abhängigen Signalwegs sind bereits HCS-Assays möglich, in welchen auch verschiedene Testkomponenten verglichen wurden.^[148] Eine Variante

bestand hierbei in der simultanen Verwendung eines gegen CXCR2 und eines gegen phosphorylierte ERK gerichteten Antikörpers, eine andere in der Beobachtung Transports des Transkriptionsfaktors NFAT in den Nukleus. Letzteres wurde hierbei durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der damit verbundenen Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin eingeleitet.^[148]

1.4.2 Calcium-Assay

Bei einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. So vermitteln alle fünf bekannten α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine der G_q -Klasse, $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ und $G\alpha_{16}$, eine Aktivierung der Phospholipase $C\beta 1$ -Isoformen.^[157] Dies führt zur Bildung von Inositoltriphosphat, IP_3 , aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PIP_2 . Die Bindung von IP_3 an entsprechende IP_3 -Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum resultiert wiederum in einer Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem genannten Zellorganell. Die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 des Chemokins CXCL8 wechselwirken jedoch mit G-Proteinen der Pertussistoxin sensitiven $G\alpha_i$ -Klasse, wobei die Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels mit einer Aktivierung der Phospholipase $C\beta 2$ durch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine beginnt (siehe Abbildung 1.5).^[157] Nach Bindung von CXCL8 an einen der genannten Transmembranrezeptoren wird die in Abbildung 1.5 dargestellte Signalkaskade angestoßen.

Der durch CXCL8 ausgelöste Konzentrationsanstieg von Ca^{2+} -Ionen im Zytosol von neutrophilen Granulozyten stellt einen zweistufigen Prozess dar, wobei der Ausschüttung aus intrazellulären Speichern ein Einstrom aus dem Extrazellulärraum folgt. Die extrazelluläre Konzentration dieser zweiwertigen Kationen ist für den Beginn des zytosolischen Anstiegs demnach nicht ausschlaggebend.^[158] Der durch IP_3 ausgelöste Anstieg der zytosolischen Konzentration dieser Kationen aktiviert CRAC-Kanäle (*calcium release-activated Ca^{2+} -channels*) auf der Plasmamembran, durch welche Ionen aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol strömen.^[159]

Die Verwendung Ca^{2+} -komplexierender Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die Detektion der Konzentrationsänderungen dieses Kations. Fura-2AM (Fura-2-acetoxy-methylester), ein von Grynkiewicz *et al* 1985 entwickelter Ca^{2+} -Indikator, bindet das zweiwertige Kation mit einer Dissoziationskonstanten von 224 nM bei 37°C. In Abbildung 1.5 ist die Struktur des entstehenden Komplexes, in welchem das Kation mit Carboxylatgruppen wechselwirkt, dargestellt. Je nach Temperatur und verwendetem Puffersystem werden unterschiedliche Werte in der Literatur aufgeführt, da eine Abhängigkeit von der Viskosität, Polarität und Ionenstärke zu beobachten ist.^{[160] [161] [162]} Die Komplexierung von Ca^{2+} durch den fluoreszenten Chelator beeinflusst das Absorptionsspektrum des Farbstoffes. Fura-2 absorbiert in Abwesenheit dieser zweiwertigen Kationen im Bereich von etwa 320 nm bis etwa 400 nm mit einem Maximum bei etwa 360 nm. Dieses Absorptionsmaximum verschiebt sich mit steigender Konzentration an Calciumionen zu geringeren Wellenlängen (340 nm). Die Emissionswellenlänge beträgt bei beiden Anregungswellenlängen 510 nm, wodurch die Bildung des Quotienten der Emission nach der Anregung mit den Wellenlängen beider Absorptionsmaxima (340 nm und 360 nm) eine Änderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration widerspiegelt. Das Ca^{2+} komplexierende Fura weist jedoch einen isosbestischen Punkt bei 360-361 nm auf, welcher in intakten Zellen um etwa 3 nm von jenem in Salzlösung abweicht. Bei dieser Wellenlänge ändert sich die Absorption

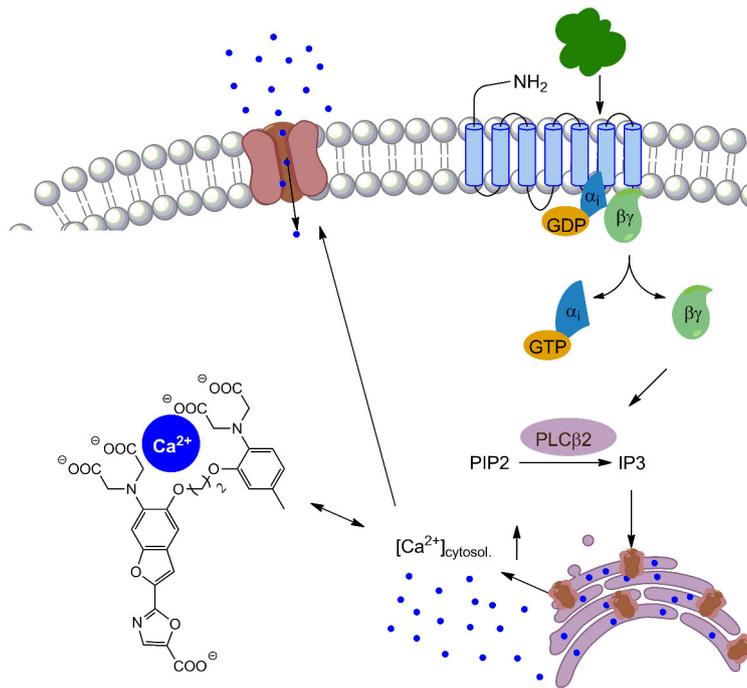


Abbildung 1.5: **Durch CXCL8 eingeleiteter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und Detektion durch Fura-2.** Die Bindung des Chemokins an einen seiner Rezeptoren (hellblau), CXCR1 oder CXCR2, resultiert in einer Aktivierung der in der Membran verankerten G-Proteine. Die im Anschluss hierdurch aktivierte Phospholipase C β 2 katalysiert die Bildung von Inositoltriphosphat, IP3, wodurch Calciumionen (dunkelblau) aus dem endoplasmatischen Retikulum (violett) freigesetzt werden. Dieser erste Ioneneinstrom in das Zytosol löst wiederum durch Aktivierung von CRAC-Kanälen auf der Plasmamembran einen Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum aus. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 ändert nach Komplexbildung dieser Kationen sein Absorptionsspektrum, wodurch die Änderung der Calciumionenkonzentration detektiert werden kann.

bei einer Änderung der Calciumionenkonzentration nicht, weshalb das Verhältnis der Absorptionsmaxima bei etwa 340 nm und 360 nm nur wenig sensitiv ist. Bei Wahl einer geringfügig höheren Absorptionswellenlänge, bei 380 nm, kann im Vergleich zum obigen Wellenlängenpaar jedoch eine zehnfach höhere Änderung des Verhältnisses beobachtet werden. Demnach kann die Ca^{2+} -Konzentrationen durch Anregung bei 340 nm und 380 nm und der Messung der jeweiligen Emission bei 510 nm analysiert werden. Die Absorption bei 340 nm und damit die gemessene Fluoreszenzintensität bei 510 nm nimmt hierbei mit steigender Calciumkonzentration zu, während die Emission bei derselben Wellenlänge (510 nm) bei der Anregung bei 380 nm sinkt, sodass der Quotient der Emission ($\text{Em}_{340}/\text{Em}_{380}$) mit steigender Ca^{2+} -Konzentration steigt.^{[163] [160]} Durch Verwendung eines solchen ratiometrischen Assays können Messparameter wie Probenvolumen, Zellzahl, Zelldicke, Farbstoffbeladung und instrumentelle Parameter bei der Auswertung vernachlässigt werden. Der veresterte Fluorophor (Fura-2AM) besitzt ein Absorptionsmaximum von 390 nm und gelangt durch passive Diffusion in die Zelle, wo zytosolische Esterasen die Esterbindung spalten und Fura-2 freisetzen. Die daraus folgende Zunahme der Hydrophilie soll die Diffusion aus der Zelle verhindern, jedoch kann ein zellabhängiger, aktiver Transport aus der Zelle beobachtet werden.^[164] Dieser zeigt entsprechend des gesteigerten Transports bei höheren Temperaturen eine Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur beim Beladen der Zellen mit Fura-2AM, weshalb diese bei Raumtemperatur durchgeführt werden sollte. Zusätzlich wird durch

eine Beladung bei niedrigeren Temperaturen die ungleichmäßige Einlagerung in zytosolischen Organellen verhindert, in welche der noch nicht gespaltene Ester (Fura-2AM) beispielsweise bei zu geringer Menge zytosolischer Esterasen ebenfalls durch passive Diffusion gelangen kann. Entsteht durch Esterasen der Zellorganellen das hydrophile Fura-2, steht es im Zytosol nicht mehr zur Detektion der Calciumionen zur Verfügung.^{[163][161][165]}

Die Detektion der Fluoreszenzintensität kann entsprechend der experimentellen Fragestellung mit Hilfe unterschiedlicher Methoden durchgeführt werden: Neben der Verwendung von Plattenlesegeräten für Mikrotiterplatten, die die Durchführung des Assays als *High-Throughputscreening* ermöglichen, ist zugleich im Fluoreszenzmikroskop eine Einzelzellanalyse möglich.^{[166][163][167]} Zusätzlich ist die durchflusszytometrische Analyse der Calciumionenkonzentration möglich.^[168] Neben dem bereits erwähnten Transport des Farbstoffs aus der Zelle, muss bei der praktischen Durchführung die Zeitabhängigkeit des Signals berücksichtigt werden. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist unmittelbar nach Zugabe des Chemokins detektierbar und klingt bereits nach wenigen Sekunden wieder ab, was eine unmittelbar auf die Injektion folgende Messung der Fluoreszenz erfordert. Werden beispielsweise mehrere Kavitäten verwendet, muss die Aufnahme einer Basislinie, Injektion und Messung des Signals als Einheit erfolgen und die Kavitäten nacheinander auf diese Weise bearbeitet werden.

Neben ratiometrischen Indikatoren wie Fura-2 und Indo-1, stellen unter anderen Fluo-3, Calcium *Green-1*, Fura-*Red*, Calcium Orange und Rhod-2 nicht-ratiometrische Fluorophore dar. Die Konzentrationsänderung der zweiwertigen Kationen ist hierbei über die Änderung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Des Weiteren ist die Kombination zweier nicht-ratiometrischer Fluorophore zum Aufbau eines ratiometrischen Assays mit verbesserten Signal-zu-Rauschen-Verhältnis möglich.^{[169][170][168]}

2 Zielsetzung

Chemokine vermitteln als kleine sekretorische Proteine die gerichtete Migration von Immunzellen, wodurch sie an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen sowie akuten und chronisch inflammatorischen Erkrankungen beteiligt sind. Aufgrund dieser (patho)physiologischen Rolle stellt die Suche nach potentiellen Inhibitoren dieser inflammatorischen und teilweise angiogenetischen Proteine ein interessantes Forschungsfeld dar.

Das inflammatorische Chemokin CXCL8 besitzt eine angiogenetische, anti-apoptotische und proliferative Wirkung. Die durch Bindung an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 vermittelten Effekte werden durch eine Vielzahl, zum Teil noch nicht vollständig erforschte Regulationsmechanismen und Wechselwirkungen mit verschiedenen Stoffgruppen modifiziert. Ein Repertoire verschiedener Assays ist notwendig, um potentielle Inhibitoren und deren Einfluss auf die Wirkung des Chemokins zu erforschen. Die Wirkung eines Inhibitors kann hierbei durch die direkte Untersuchung der Rezeptor-Ligand Wechselwirkung mittels Bindungsstudien oder auf verschiedenen Stufen der hierdurch eingeleiteten Signaltransduktion mit Hilfe von Aktivitätsassays erfolgen. Zur Etablierung oben genannter Assays werden neben Chemokin, welches je nach Methode unter Umständen entsprechend markiert werden muss, Zellen benötigt, die die jeweiligen Rezeptoren exprimieren, wobei deren biologische Aktivität sichergestellt werden muss.

Die Verwendung neutrophiler Granulozyten ermöglicht die Untersuchung potentieller Inhibitoren mit endogen exprimierten Rezeptoren nahe am physiologischen System. Die Durchführung von Assays mit Primärzellen weist jedoch einige Nachteile auf. Primärzellen sind nicht kultivierbar und verlieren innerhalb weniger Stunden nach Isolierung ihre Aktivität. Neben dieser arbeitsintensiven Handhabung sind die Ergebnisse stark vom immunologischen Zustand des Spenders abhängig, was die Reproduzierbarkeit beeinträchtigt. Zur besseren Vergleichbarkeit, Reproduzierbarkeit und Durchführung soll im Rahmen dieser Arbeit eine immortalisierte Zelllinie mit den Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 transfiziert werden und die stabile Expression dieser über verschiedene immunologische Methoden bestätigt werden. Zum Nachweis der biologischen Aktivität der rekombinant exprimierten Proteine soll zusätzlich ein Aktivitätsassay etabliert werden und hinsichtlich seiner Verwendung als sekundärer Assay zur Charakterisierung von Inhibitoren getestet werden. Im Anschluss soll untersucht werden, ob eine Adaption des klassischen Radioligand-Bindungsassays auf einen auf Fluoreszenzpolarisationsmessungen basierenden Assay möglich ist, wie er für die Wechselwirkung kleiner Hormone und dazugehöriger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beschrieben ist. Hierzu soll eine Mutante des Chemokins, CXCL8S72C über eine Michael-Addition mit verschiedenen Fluorophoren markiert und der unterschiedlich, fluoreszent markierte Ligand (Tracer) hinsichtlich der spektroskopischen Eigenschaften untersucht werden. Zusätzlich soll eine Methode zur Präparation der für den Bindungsassay benötigten Plasmamembranfragmente etabliert werden.



3 Materialien

3.1 Geräte

Die zur Durchführung der experimentellen Arbeiten verwendeten Laborgeräte sowie deren Hersteller sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: **Laborgeräte sowie deren Hersteller.**

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
Horizontale Elektrophoreseapparatur	shiroGEL Mini	VWR International, Radnor, PA, USA
Autoklav	Tuttnauer 2540 EL	Systec GmbH LaborSystemtechnik, Wettenberg, DE
<i>semi-dry</i> Blotting System	Owl TM -HEP-1	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer, AK Prof. Dr. Kolmar, TU Darmstadt	BD Influx TM Cell Sorter	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Vertikale Elektrophoreseapparatur	Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten
Gefriertrocknungsanlage	Alpha-2-4LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, DE
Geldokumentation		INTAS [®] Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, USA
Geldokumentationsstation	LAS-3000	Fujifilm, Minato, Präfektur Tokio, JPN
Heizblock	ThermoMixer MHR 13	Ditabis, Pforzheim, DE
HPLC	Äkta Purifier Prominence UFLC	GE Healthcare Shimadzu, Kyoto, KYT, Kyoto, Präfektur Kyoto, JPN
Inkubator	MCO-10AIC	Panasonic Corporation, Kadoma, Präfektur Osaka, JPN
LC-Massenspektrometer, AK Prof. Dr. Kolmar, TU Darmstadt	LCMS 2020	Shimadzu, Kyoto, KYT, Kyoto, Präfektur Kyoto, JPN
Fluoreszenzmikroskop	Trinokularmikroskop IT 400	VWR International, Radnor, PA, USA
Durchlichtmikroskop	Leica TCS SP	Leica Microsystems, Mannheim, DE
Durchlichtmikroskop	Leica SP5	Leica Microsystems, Mannheim, DE

Tabelle 3.1: Laborgeräte sowie deren Hersteller.

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatten-Lesegerät mit Injektionsvorrichtung	Infinite [®] M1000	TECAN Group, Maennedorf, CH
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Infinite [®] F200	TECAN Group, Maennedorf, CH
pH-Meter	HI 221 Calibration Check Micro-processor	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, DE
Photometer	Genesys 10S UV-Vis	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetten	5 mL 200-1.000 µL 50-200 µL 20-100 µL 2-20 µL 1-10 µL 0,1-2 µL	Rainin Pipet Lite XLS Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettierhilfe	Pipetus [®]	Hirschmann [®] Laborgeräte GmbH & CO KG, Eberstadt, DE
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Präzisionswaage	SI-234	Denver-Instruments GmbH, Göttingen, DE
Reinstwasseranlage	MilliQ+	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Rührwerk	Eurostar digital	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG; Stauffen, DE
Inkubationsschüttler	KS4000 I control	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG; Stauffen, DE
Spannungsgerät	Power Source 300 v	VWR International, Radnor, PA, USA
Sterilbank	Biowizard Silver line blue series	Kojair, Helsinki, FI [®]
Stickstofftank	ARPEGE	Air Liquide Medical GmbH, Düsseldorf, DE
Thermocycler	MyCycler [™] Thermal Cycler	BIO-RAD Laboratories, Inc., Hercules, CA, Vereinigte Staaten
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5418	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin Electronics GmbH & CO KG, Berlin, DE
Ultrazentrifuge	Optima [™] LE-80k	Beckmann Coulter GmbH, Brea, CA, USA
Vortexer	Vortex Mixer 7-2020 VF2	Neolab [®] , Heidelberg, DE
Zentrifugen	Rotina 420R Centrifuge 5810R Megafuge1.0	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, DE Eppendorf AG, Hamburg, DE Heraeus Sepatech

3.2 Software

Zur Aufzeichnung und Auswertung der Versuchsergebnisse wird verschiedene, teils gerätespezifische, Software verwendet. In Tabelle 3.2 ist eine Übersicht dieser Programme zu sehen.

Tabelle 3.2: **Software sowie deren Hersteller**

Software	Anwendungsbereich	Hersteller
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung	Adobe Systems
LabSolutions	Chromatogramme	Shimadzu
Unicorn Control	Chromatogramme	GE Healthcare
Flowing 2	Histogramme	Perttu Terho
ChemBioDraw®	(bio)chemische Strukturformeln	Cambridgesoft
GraphPad Prism	Statistiksoftware, Auswertung von Bindungskurven	GraphPad Software, Inc.

3.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Kits und Reagenzien, Tabelle 3.4 die Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge.

Tabelle 3.3: **Chemikalien sowie deren Hersteller.**

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Roti® Garose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bovines Serumalbumin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
CF™ 633-maleimide	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
cOmplete Mini protease inhibitor tablets	Roche Life Science, Basel, CH
Coomassie® Brillant Blau G250	AppliChem, Gattersleben, DE
Dimethylformamid	Carlo Erba, Mailand, IT
Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Deoxycholat, Na-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
DyLight® 550 Maleimid	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNase I	AppliChem, Gattersleben, DE
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Tabelle 3.3: **Chemikalien sowie deren Hersteller.**

Chemikalie	Hersteller
Ethanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fluorescein-5-maleimid	AAT Bioquest [®] , Inc., Sunnyvale, CA, USA
Fura-2AM	AAT Bioquest [®] , Inc., Sunnyvale, CA, USA
Gentamycin G418	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glucose-monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
L-Glutamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Isopropanol	VWR International, Radnor, PA, USA
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Acros Organics, Fisher Scientific, Schwerte, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris(2-carboxyethyl)-phosphine, immobilized on agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kupfersulfat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Lymphoprep	Axis-Shield POC AS, Oslo, NO
Lysozym (Hühnereiweis)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat - Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat	Biomol, Hamburg, DE
Natriumhydroxid	Acros Organics, Fisher Scientific, Schwerte, DE
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Penicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphorsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Roti [®] -Lumin plus Lösung 1 und 2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Acros Organics, Fisher Scientific, Schwerte, DE
Trifluoressigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton-X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Trypanblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Tabelle 3.3: **Chemikalien sowie deren Hersteller.**

Chemikalie	Hersteller
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Tabelle 3.4: **Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.**

Material	Erläuterung	Hersteller
Coverslips	∅ 25 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht AG, Sondheim
FACS-Röhrchen	5 mL Polypropylen Round-Bottom tubes	BD Falcon TM
Kryo-Röhrchen	CryoPure Gefäß, 1,6 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotiterplatten	Corning [®] 3711, 384 Well Black with Clear Bottom Polystyrol Corning [®] 3573, 384 Well Flat Bottom Black Polystyrol Corning [®] 3675, 384 Well UV Microplate Performance Corning [®] 3540 Assay Plate 384 Well, no lid, low volume, non-treated, Black with clear bottom	Corning, NY, USA
Roti [®] PVDF	0,45µm Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
serologische Pipetten	25 mL 10 mL 5 mL 2 mL 1 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Sterilfilter	Whatman [®] 0,2 µm	Schleicher & Schuell, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
Zellkulturplatten	Cellstar [®] , TC-plate 6 well, sterile with lid, single packed Corning [®] 3526 Costar [®] 24 Well Cellstar [®] , TC-plate 96 well, sterile with lid, single packed Assay plate 96 well, with lid CellBindSurface Black with clear bottom	Greiner bio-one Corning, NY, USA Greiner bio-one Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen	TC-Flasche T25, Standard TC-Flasche T75, Standard	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zentrifugal- konzentratoren	Vivaspin20 3000 MWCO	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE

3.4 Biologisch aktive Substanzen

Tabelle 3.5: **Verwendete Chemokine.**

Name	Größe/kDa	Hersteller
CCL-2, (MCP-1: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)	8,7	Biologend®
CXCL12, (SDF-1 : <i>stromal cell-derived factor 1</i>)	8	Biologend®
CXCL8	8,4	Arbeitskreis Prof. Dr. Schmitz
CXCL8S72C	8,4	Arbeitskreis Prof. Dr. Schmitz

3.4.1 Antikörper

Mit Hilfe von Antikörpern können Proteine beispielsweise mittels Western Blot und Durchflusszytometrie spezifisch nachgewiesen werden. Die während dieser Arbeit eingesetzten Antikörper zur Immundetektion sind in den Tabellen 3.6 und 3.7 aufgelistet.

Tabelle 3.6: **Verwendete Primärantikörper.** Die jeweilige Verdünnung ist der Beschreibung der Experimente zu entnehmen, in welchen die Antikörper verwendet wurden.

Name	Erläuterung	Epitop	Fabrikant
<i>monoclonal</i> anti-Interleukin-8	Maus-IgG, monoklonal	nicht angegeben	Sigma-Aldrich
Anti-IL8 MAB	Kaninchen		Epitomics
Anti- <i>human</i> MCP-1	Maus, monoklonal	nicht angegeben	Peprotech
<i>Purified</i> anti- <i>human</i> MCP-1	Maus IgG1 _κ		Biologend®
<i>Purified</i> anti- <i>human</i> CD181 (CXCR1)	Maus IgG2b _κ	nicht angegeben	Biologend®
IL8RA (N-19) sc-989	Kaninchen-IgG, polyklonal	N-Terminus	Santa Cruz Biotechnology
Anti-CXCR1 Antikörper [501] (ab60254)	Maus	N-Terminus des humanen CXCR1	Abcam
IL8RB (5E8) sc-32780 Maus-IgG1	monoklonal	nicht angegeben	Santa Cruz Biotechnology
Anti-CXCR2 SAB1406027	polyklonal	vollständige Aminosäuresequenz	Sigma-Aldrich
FITC anti- <i>human</i> CD182 (CXCR2) <i>antibody</i>	Maus	nicht angegeben	Biologend®
FITC-Maus IgG1 _κ isotype ctrl	Maus	Isotypkontrolle	Biologend®
FITC anti- <i>human</i> CD181 (CXCR1) <i>antibody</i>	Maus-IgG2b _κ	nicht angegeben	Biologend®

Tabelle 3.6: **Verwendete Primärantikörper.** Die jeweilige Verdünnung ist der Beschreibung der Experimente zu entnehmen, in welchen die Antikörper verwendet wurden.

Name	Erläuterung	Epitop	Fabrikat
FITC Maus-IgG2bκ isotype ctrl	Maus	Isotypkontrolle	Biolegend®
Anti-CXCR4 antibody, Klon 1F8	Maus-IgG1κ, monoklonal		Sigma-Aldrich

Tabelle 3.7: **Verwendete Sekundärantikörper.** Die jeweilige Verdünnung ist der Beschreibung der Experimente zu entnehmen, in welchen die Antikörper verwendet wurden.

Name	Herkunft	Konjugat	Fabrikant
Anti-Maus HRP	Ziege, polyklonal	Meerrettich-Peroxidase	Carl Roth GmbH
Anti-Kaninchen HRP	Ziege, polyklonal	Meerrettich-Peroxidase	Carl Roth GmbH
Ziege anti-Maus IgG-HRP sc-2005	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Santa Cruz Biotechnologies
FITC Ziege anti-Maus IgG sc-2010	Ziege	Fluoresceinisothiocyanat	Santa Cruz Biotechnologies

3.4.2 Primer zur Sequenzierung

Tabelle 3.8: **Verwendete Primer.** Die benötigten Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form von der Firma MWG bezogen und in ddH₂O gelöst, sodass die Konzentration jeweils 100 pmol/μL betrug. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Primerbezeichnung	Sequenz	Anzahl der Basenpaare
T7 for	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	20
T7 rev	5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'	19

3.4.3 Enzyme

Die im Zuge dieser Arbeit eingesetzten Enzyme mit den entsprechenden Puffern sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: **Verwendete Enzyme.**

Enzym	Puffer	Hersteller
Taq DNA Polymerase	10 x Taq-Puffer	New England Biolabs®

3.4.4 Plasmide

Tabelle 3.10 zeigt eine Übersicht der zu Transformationen und Transfektionen eingesetzten Plasmide.

Tabelle 3.10: **Verwendete Plasmide.** Zusätzlich sind die Verwendung und Herkunft der Plasmide angegeben.

Plasmidbezeichnung	Verwendung	Herkunft
pET22b-CXCL8	Expression von CXCL8 nach Transformation in <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIL	Dissertation Dana Wiese
pET22b-CXCL8S72C	Proteinexpression nach Transformation in <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIL	Philipp Mühlhäuser, Vertiefungspraktikum
pcDNA3.1(+)/CXCR1	Transfektion, Expression von CXCR1	Missouri S & T cDNA Resource Center
pcDNA3.1(+)/CXCR2	Transfektion, Expression von CXCR2	Missouri S & T cDNA Resource Center

3.4.5 Transfektionsreagenzien

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurden verschiedene Transfektionsreagenzien getestet, um eine stabil transfizierte Zelllinie zu generieren. In Tabelle 3.11 sind die einzelnen Reagenzien mit den entsprechenden Herstellern aufgelistet.

Tabelle 3.11: **Verwendete Transfektionsreagenzien.**

Name	Zusatzreagenzien	Hersteller
Lipofectamin [®] LTX	Plus TM Reagent, Opti-MEM [®]	Invitrogen
ScreenFect DNA Transfection	Dilution Buffer	InCella
TurboFect Transfection Reagent	Opti-MEM [®]	Invitrogen

3.4.6 Größenstandards

Bei der Auftrennung von DNA und Proteinen mittels Gelelektrophorese wird gewöhnlich zur Analyse ein entsprechender Größenstandard eingesetzt.

Tabelle 3.12: **Verwendete Größenstandards.**

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
<i>BLUEplus prestained protein ladder</i>	Größenbestimmung von Proteinen	Biomol
<i>2-log DNA ladder (0.1-10 kb)</i>	DNA-Nachweis	New England Biolabs [®] , Inc.
<i>Quick-load 1 kb DNA ladder</i>	DNA-Nachweis	New England Biolabs [®] , Inc.

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Arbeiten

Zur Amplifizierung der zur Transfektion und Transformation nötigen Plasmide in dieser Arbeit wurden prokaryotische Zellkulturen (*E. coli* DH5 α) verwendet. Zudem dienen sie nach Transformation der Expression rekombinanter Proteine.

4.1.1 Anlegen von Glycerolstocks

Zur Lagerung prokaryotischer Zellkulturen können diese als Glycerolstock bei -80°C konserviert werden. Nach Pelletieren einer Übernachtskultur für 15 Minuten bei 2000 x g wird das entstandene Zellpellet in einem der Pelletgröße entsprechendem Volumen an steril filtriertem LB-Medium (gebrauchsfertiges Pulver, nach Angaben des Herstellers in ddH₂O gelöst und autoklaviert) mit 10 % Glycerol resuspendiert und bei -80°C konserviert.

4.1.2 Transformation und Ausplattieren

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA werden kompetente *E. coli* DH5 α verwendet, wogegen *E. coli* BL21(DE3)RIL zur Expression von Proteinen transformiert wird. Die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen werden schonend auf Eis aufgetaut und mit etwa 1 μ L Plasmid-DNA-Lösung versetzt. Die eingesetzte Menge an Nukleinsäure sollte zwischen 1 und 100 ng liegen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgt ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C. Die Bakteriensuspension wird zwei Minuten auf Eis gestellt und 1 mL mit Ampicillin (Endkonzentration: 60 μ g/mL) versetztes LB-Medium zugegeben. Nach einer Stunde bei 37°C und 190 rpm im Inkubationsschüttler werden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4600 x g pelletiert, 1 mL des Überstands abgenommen und die Zellen im restlichen Volumen resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte (10 g LB-Medium, 7,5 g Agar auf 500 mL H₂O und einer Endkonzentration von Ampicillin von 60 μ g/mL) steril ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag werden mit einer sterilen Pipettenspitze einzelne Kolonien gepickt, damit 5 mL ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft und aus der entstehenden Übernachtskultur wie unter 4.1.1 beschrieben, Glycerolstocks angelegt. Erfolgt die Transformation im Anschluss an eine Klonierung, werden die einzelnen Kolonien in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) analysiert. Bei Transformation mit kommerziell erworbenen Plasmiden wird auf eine nähere Analyse der Bakterienkolonien verzichtet.

4.1.3 Plasmidpräparation und Konzentrationsbestimmung

- GenEluteTM HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
- GenEluteTM HP Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich)

Zur Isolierung eines rekombinanten Plasmids aus transformierten Bakterienzellen wird je nach benötigter Menge an isoliertem Plasmid eine Mini- oder Midipräparation mit oben genannten Kits durchgeführt. Die Durchführung kann den jeweiligen Handbüchern des Herstellers entnommen werden. Die Elution erfolgt je nach Ansatz mit 30 µL oder 500 µL endotoxinfreiem Milli-Q-Wasser.

Die Plasmidkonzentration wird über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Hierzu wird eine 1:50 oder 1:100-Verdünnung der DNA-Lösung in PBS angesetzt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht hierbei 50 µg/mL doppelsträngiger DNA. Durch Bestimmung des Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm können Verunreinigungen der isolierten Nukleinsäure mit Proteinen und Alkohol ermittelt werden. Reine DNA ergibt einen Quotienten von 1,8.

4.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) einer Bakterienkolonie

Die PCR dient der Analyse einer nach Ausplattieren gewählten Bakterienkolonie auf den korrekten Einbau des Inserts in den verwendeten Vektor. Durch Zugabe passender Primer und Polymerase lassen sich Sequenzabschnitte der Plasmid-DNA amplifizieren und mittels Agarosegelelektrophorese hinsichtlich der erwarteten Basenpaaranzahl analysieren.

Eine Bakterienkolonie wird mit einer Pipettenspitze gepickt und in 30 µL ddH₂O resuspendiert. Hiervon wird 1 µL einem wie unten beschriebenen PCR-Ansatz zugesetzt. Weitere 5 µL werden antibiotika-haltigem LB-Medium zugegeben, um, wie unter 4.1.1 beschrieben, Bakterienvorräte anzulegen. Die LB-Agarplatten können bei 4°C gelagert werden, sodass jederzeit neue Bakterienklone gepickt werden können. Der hier verwendete PCR-Ansatz setzt sich aus zwei kurz vor Durchführung angesetzten Lösungen, Mastermix I und II, zusammen. Mastermix I enthält einfach konzentrierten Taq-Puffer sowie oben genannte Bakterien-suspension in ddH₂O. Mit ddH₂O wird auf ein Endvolumen von 25 µL aufgefüllt, dieser Mix zwei Minuten bei 96°C erhitzt und anschließend zu Mastermix II zugefügt. Dessen Zusammensetzung lautet wie folgt:

- 10 x Taq-Puffer(ohne MgCl ₂)	2,5	µL
- MgCl ₂	1,5	µL
- Primer, <i>forward</i>	0,5-1	µL
- Primer, <i>reverse</i>	0,5-1	µL
- dNTP	5	µL
- Taq-Polymerase	0,5	µL
- ddH ₂ O auf	x	µL
	25	µL Gesamtvolumen

Nach Zugabe des Mastermix I zu II folgen im PCR-Cycler nach zwei Minuten bei 37°C, 30 Zyklen zur Denaturierung, Annealing und Elongation. Hierzu wird jeweils für 45 s bei 96°C, 58°C und 72°C erhitzt. Abschließend wird die Probe einmalig für fünf Minuten bei 72°C erhitzt.

4.1.5 Agarosegelelektrophorese

In einer Agarosegelelektrophorese kann isolierte Plasmid-DNA hinsichtlich ihrer Größe und Struktur analysiert werden. Entsprechend der Anzahl an Basenpaaren der aufzutrennenden DNA werden unterschiedlich konzentrierte Gele verwendet (siehe Tabelle 4.1). Für die verwendete Elektrophoresekammer werden 40 mL

Tabelle 4.1: **Gelelektrophorese: Korrelation der Agarosekonzentration und der jeweils auftrennbare Größenbereich der Nukleinsäure (nach Angaben des Herstellers Promega, <https://www.promega.de/resources/pubhub/enotes/what-percentage-agarose-is-needed-to-sufficiently-resolve-my-dna-sample/>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 11:07).** Während dieser Arbeit wurde zur Plasmidanalyse ein 1 % oder 0,7 %iges Agarosegel verwendet. bp: Basenpaare

Agarosekonzentration (w/v) in TAE-Puffer	Größenbereich der zu analysierenden Nukleinsäure
0,5	1.000 - 30.000 bp
0,7	800 - 12.000 bp
1,0	500 - 10.000 bp
1,2	400 - 7.000 bp
1,5	200 - 3.000 bp
2,0	50 - 2.000 bp

Volumen benötigt, sodass ein Gel mit etwa 1 cm Dicke entsteht. Entsprechend der gewählten Konzentration wird die Agarose in einem Kolben abgewogen, das benötigte Volumen an TAE-Puffer (40 mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), 20 mM Essigsäure) zugefügt und in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt. Die durch das Erwärmen verursachten Volumenverluste werden mit Wasser ausgeglichen. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente werden ein bis zwei Tropfen der gebrauchsfertigen 0,025 %igen Ethidiumbromidlösung der noch flüssigen Lösung zugesetzt, die Gelkammer befüllt und das Gel aushärten gelassen. Je nach Größe des Gels wird eine Spannung von 60-80 V angelegt. Im Zuge dieser Arbeit wurden stets analytische Gele verwendet und ein Probenvolumen von 10 µL je Geltasche aufgetragen, wobei die zu analysierende Nukleinsäure nach einer Plasmidisolierung meist 1:10 mit Wasser verdünnt und mit 1 µL 10x DNA-Ladepuffer versetzt, aufgetragen wurde. Die Agarosegele müssen vollständig mit einfach konzentriertem TAE-Puffer bedeckt sein. Durch Fluoreszenz unter UV-Licht werden die einzelnen Fragmente mit Hilfe der Intas[®]Geldokumentation betrachtet und durch Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard identifiziert (siehe Tabelle 3.12).

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Häufig verwendete Puffer

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, PBS, stellt einen in diesem Abschnitt häufig verwendeten Puffer dar. Die Zusammensetzung wird zur besseren Übersicht bereits an dieser Stelle angegeben:

- PBS
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄
 - 2,7 mM KCl
 - 137 mM NaCl
 - pH 7,5, eingestellt mit HCl

4.2.2 Proteinexpression und Zellyse

Zur Expression rekombinanten CXCL8s wird der Stamm BL21(DE3)RIL der gram-negativen Bakterienart *Escherichia coli* genutzt, welcher mit je einem der zur Expression der jeweiligen Proteine nötigen Plasmide pET22b-CXCL8 oder pET22b-CXCL8S72C im Arbeitskreis transformiert wurde.

Proteinexpression

Am Vorabend der Expression werden viermal 40 mL ampicillinhaltiges LB-Medium (60 µg/mL) mit Bakterien des entsprechenden Glycerolstocks angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Zudem werden viermal 800 mL LB-Medium in 2 L-Kolben steril autoklaviert und mit Ampicillin auf eine Endkonzentration von 60 µg/mL versetzt. Zur Inokulation werden je 800 mL LB-Medium mit 10 mL der Übernachtskultur versetzt, bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6-1,0 bei 37°C und 160 rpm kultiviert und anschließend kurz auf Eis gekühlt. Die Induktion der Expression erfolgt durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) auf eine Endkonzentration von 0,1 mM. Die Bakteriensuspension wird bei 30°C und 160 rpm für drei Stunden inkubiert, bei 4500 x g und 4°C für 45 Minuten pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet kann bis zur Zellyse bei -20°C gelagert werden.

Zellyse

Zur Lyse der Bakterienzellen wird das Zellpellet auf Eis in 10 mL Lysispuffer (90 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,2 mg/mL Lysozym, 0,1 mg/mL DNase I, pH 7,5) mit Hilfe eines Rührfisches auf dem Magnetrührer resuspendiert. Zur Inhibition zelleigener Proteasen enthält dieser eine halbe Proteaseinhibitortablette auf 10 mL Lysispuffer. Anschließend wird das Zellysat eineinhalb Stunden auf Eis inkubiert, das Detergenz Triton X-100 zugegeben (0,5 % (w/v)) und dreimal für je 3 s sonifiziert. Nach Zugabe von weiteren 100 µL einer 10 mg/mL DNase I-Lösung folgt

eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Um das zum Zellaufschluss zugegebene Lysozym sowie andere Proteine durch Hitze fällung zu entfernen, wird das Lysat bei 70°C für zehn Minuten erhitzt. Dieser Schritt ist aufgrund der Hitze stabilität des zu exprimierenden CXCL8 möglich, welches somit in Lösung verbleibt. Das Zellysate wird bei 4500 x g und 4°C für 45 Minuten zentrifugiert, sodass ein klarer Überstand entsteht. Andernfalls wird die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wird durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert und mittels Kationenaustauschchromatographie, wie unter 4.2.4 beschrieben, aufgetrennt.

Chromatographie

4.2.3 Proteinquantifizierung

BCA-Assay

Das verwendete BCA-Reagenz wird vor jeder Durchführung frisch aus Lösungen beider Komponenten angesetzt. Hierzu werden Reagenz A (Bicinchoninsäure) und Reagenz B (Kupfersulfatlösung) im Verhältnis 50:1 gemischt und je Kavität einer transparenten 96-Well-Mikrotiterplatte (MTP) 95 µL vorgelegt. Es werden 5 µL Probe zugegeben, für 30 Minuten bei 37°C oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 560 nm gemessen. Als Standard wird bovines Serumalbumin verwendet. Da es sich um einen indirekten Nachweis handelt, wird die Standardreihe bei jeder Durchführung neu erstellt. Alle Proben werden als Triplikate angesetzt.

Proteinbestimmung über Absorptionsmessung bei 280 nm

Die Ergebnisse des unter 4.2.3 beschriebenen BCA-Assays sind, wie auch im Falle des weit verbreiteten Bradford-Assays, stark von den Eigenschaften des zu quantifizierenden Proteins abhängig. Aufgrund dessen wurde im Arbeitskreis die Absorption aromatischer Aminosäuren bei 280 nm als Grundlage zur Quantifizierung von CXCL8 genutzt.

Hierzu wurde aus frisch exprimiertem, mittels Umkehrphasenchromatographie entsalztem und gravimetrisch quantifiziertem CXCL8 von Ina Rink eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mg/mL zur Messung der Absorption bei 280 nm erstellt. Hierbei handelt es sich um eine direkte Methode, weshalb diese Kalibriergerade aus der Durchführung dreier unabhängiger Experimente universell eingesetzt werden kann. Die Messung erfolgt in UV-transparenten 384-Well-MTP mit einem Volumen von 18 µL je Kavität.

Quantifizierung eines fluoreszent markierten Proteins

Bei der Quantifizierung fluoreszent markierten Proteins muss beachtet werden, dass der verwendete Farbstoff neben seinem spezifischen Absorptionsmaximum ebenfalls eine Absorption bei 280 nm aufweist.

Dies würde das Ergebnis der unter 4.2.3 beschriebenen Quantifizierung verfälschen, weshalb die folgende auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz basierende Korrekturformel 4.1 angewendet werden muss:

$$c = \frac{A(\text{Konjugat})_{280} - A(\text{Konjugat})_{max} \times CF}{\frac{\epsilon}{M \times d}} \quad (4.1)$$

Die Konzentration, c , ergibt sich hier in mg/mL, A_{max} stellt die Absorption des Konjugats bei dessen Absorptionsmaximum dar, A_{280} die Absorption bei 280 nm und ϵ den molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins, für CXCL8 besitzt ϵ einen Wert von $7450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. M ist die Molmasse des konjugierten Proteins und d die Schichtdicke der gemessenen Proteinlösung. Der Korrekturfaktor, CF , stellt eine fluorophorspezifische Größe dar, kann den Herstellerangaben entnommen oder anhand der Absorptionen des unkonjugierten Fluorophors mittels Formel 4.2 berechnet werden:

$$CF = \frac{A(\text{Fluorophor})_{280}}{A(\text{Fluorophor})_{max}} \quad (4.2)$$

Des Weiteren wird zur Berechnung die Schichtdicke in cm der in einer Kavität der verwendeten 384-Well-MTP gemessenen Proteinlösung benötigt. Diese kann nach Angaben des Herstellers Tecan Group AG durch Messung der Absorption von Wasser bei 998 nm und 900 nm als Leerwert durch Formel 4.3 berechnet werden:

$$d = \frac{A_{998} - A_{900}}{A_{H_2O}} \quad (4.3)$$

A_{H_2O} beträgt 0,159/cm bei einer Wellenlänge von 998 nm und einer Schichtdicke von 1 cm. Sowohl im Fall der Absorptionsmessung bei 280 nm als auch bei der jeweiligen Exzitationswellenlänge des Fluorophors werden die Absorptionswerte des entsprechenden Puffers als Hintergrund subtrahiert. Hierzu muss beachtet werden, dass sich die Schichtdicke des als Referenz genutzten Puffers von jener der Proteinlösung bei gleichen Volumina aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenspannung und Form des Meniskus unterscheiden kann. Um bei beiden Lösungen, Puffer und Proteinlösung die gleiche Schichtdicke zu erhalten, muss vor allem bei hohen Proteinkonzentrationen oftmals ein im Vergleich zur Proteinlösung geringeres Volumen an Puffer pipettiert werden.

4.2.4 Chromatographie

Kationenaustauschchromatographie

Zur Auftrennung der wie unter 4.2.2 hergestellten Zellysate wird eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Da es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Chemokinen um kationische Proteine handelt, eignet sich diese Methode hervorragend, um das rekombinante Protein von endogenen, vorwiegend anionischen Proteinen der Bakterien abzutrennen. Während ein Großteil letzterer bereits aufgrund ihrer Ladung nicht an die Säule binden und mit dem Durchfluss verworfen werden, binden die positiv gelade-

nen Chemokine an die Säulenmatrix der verwendeten HiTrap_SPFF_5mL (GE Healthcare). Durch einen steigenden Salzgradienten kann das Chemokin als reine Fraktion eluiert werden.

Die Flussrate bei der hier angegebenen Säule beträgt 3 mL/min. Zu Beginn wird die Säule mit 1 Säulenvolumen Puffer A (90 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, pH 7,5) äquilibriert. Die Beladung erfolgt mit der Probenpumpe P960, wobei etwa 20 mL Puffer zur Vermeidung von Verlusten durch das Totvolumen der Pumpe nachgefüllt werden. Zur Elution nicht gebundener Proteine wird für drei Säulenvolumen mit Puffer A gespült, wonach ein linearer Gradient über 12 Säulenvolumen auf 30 % Puffer B (1,5 M NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, pH 7,5) folgt. Diese Salzkonzentration wird über weitere drei Säulenvolumen konstant gehalten, bevor die Säule mit vier Säulenvolumen 100 % Puffer B gespült und zum Abschluss mit drei Säulenvolumen Puffer A äquilibriert wird. Die eluierte Fraktion wird durch Zentrifugalkonzentratoren (Ultrafiltrationseinheiten zum Einmalgebrauch) mit einem Größenausschlussvolumen von 3000 Da eingengt und mittels Umkehrphasenchromatographie entsalzt.

Umkehrphasenchromatographie

Sowohl zur Auftrennung eines Konjugationsansatzes, wie unter 4.2.8 beschrieben, als auch zur Endreinigung eines mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigten Proteins wird eine Umkehrphasenchromatographie durchgeführt. Die Wechselwirkung zur stationären Phase beruht hierbei auf hydrophoben Wechselwirkungen. Bei Anstieg der Hydrophobizität des Eluenten können adsorbierte Proteine eluiert werden. Die Detektion erfolgt durch Messung der Absorption mit einem Photodiodenarray, kurz PDA. Durch Verwendung einer Wolfram- und Deuteriumlampe ist es möglich, Wellenlängen von 190-800 nm simultan aufzuzeichnen.

Alle Eluenten müssen vor Gebrauch gründlich im Ultraschallbad entgast werden. Die verwendete Säule, NUCLEOSIL®300-7 C8 von Machery Nagel, wird mit einer Flussrate von 2 mL/min für etwa 20 Minuten mit dem Starteluenten äquilibriert. Die Probe wird in jener Zusammensetzung der Eluenten gelöst, die der mobilen Phase zu Beginn des Laufs entspricht, und mit einer Hamiltonspritze injiziert. Die verwendeten Gradienten aus Eluent A (95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)) und Eluent B (5 % H₂O, 95 % Acetonitril, 0,1 % TFA) variieren je nach aufzutrennendem Reaktionsansatz, die Flußrate beträgt i. d. R. 1,5 mL/min.

Zur Reinigung des Reaktionsansatzes zur Konjugation von CXCL8S72C mit DylightTM550 Maleimid beginnt der Lauf mit 20 % Eluent B. Nach zehn Minuten folgt ein Gradient über 35 Minuten auf 50 % Eluent B, ein anschließendes Plateau für acht Minuten, der sofortige Anstieg auf 100 % Eluent B und nach weiteren acht Minuten ein Zurücksetzen der Säule auf 20 % Eluent B.

Im Unterschied zu diesem Programm wird zur Reinigung des mit CFTM633-Maleimid und Fluorescein-5-Maleimid die Säule bereits nach einem Plateau bei 50 % Eluent B wieder auf den Ausgangseluenten zurückgesetzt.

Zur Auftrennung der ersten Stufe zur Bildung von Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)-Maleimidopropionsäure sowie des Reaktionsansatzes des mit dem entstehenden Produkt konjugierten Proteins wird mit 0 % Eluent B über 15 Minuten begonnen. Es folgt ein Gradient auf 50 % bzw. 70 % Eluent B über 45 Minuten, ein Anstieg auf 100 % Eluent B innerhalb einer Minute und ein Plateau für neun Minuten. Der Gradient wird auf 0 %

Eluent B zurückgesetzt und die Säule für zehn Minuten reäquilibriert.

Die Fraktionen werden mittels LC-MS und/oder Western Blot charakterisiert und lyophilisiert.

4.2.5 SDS-Gelelektrophorese

Eine SDS-PAGE (*engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient der Analyse von Proteingemischen, wobei die Trennung des Proteingemischs auf einer Größenselektion beim Wandern durch ein Gel im elektrischen Feld beruht. Zusätzlich zu einer Denaturierung der Proteine durch das ionische Detergenz SDS können durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduktiv gespalten werden. Die hier durchgeführte Methode zur Visualisierung der einzelnen Proteinbanden erfolgt durch Anlagerung des Farbstoffs Coomassie Brillant Blau G-250 an die Seitenketten basischer Aminosäuren.

Probenvorbereitung

Es wurden sowohl unverdünnte Proben als auch entsprechend mit ddH₂O verdünnte Lösungen unterschiedlicher Proteinkonzentration mit einem Endvolumen von 20 μ L eingesetzt. Jeder Probe wird mit 5 μ L 5-fach denaturierendem Lämmli-Puffer versetzt. Die Zusammensetzung für diesen lautet wie folgt:

- denaturierender Lämmli-Puffer, 5 x
 - 0,31 M TRIS
 - 10 % (w/v) SDS
 - 50 % (v/v) Glycerin
 - 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol
 - 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Die Proben werden zur Denaturierung bei 95 °C, i. d. R. zehn Minuten, zur Monomerisierung der Rezeptoren 25 Minuten, erhitzt und anschließend auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Nicht benötigte Taschen werden ebenfalls mit einer entsprechend behandelten Wasserprobe beladen.

Präparation der Polyacrylamidgele und Gelelektrophorese

In Abhängigkeit der Größe aufzutrennender Proteine können Trenngele mit unterschiedlicher Porengröße hergestellt werden. Letztere korreliert mit dem Gehalt an (Bis-)Acrylamid und wird der Größe der zu analysierenden Proteine angepasst. Die Gelkammern werden nach Anleitung des Herstellers aufgebaut. Die Zusammensetzung der nach einigen Minuten nach Zusatz des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) und des Polymerisierungskatalysators N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zu einem Gel polymerisierenden Lösungen ist unter Tabelle 4.2 ersichtlich. Zum Nachweis der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird ein 10 %iges Gel gewählt, der Nachweis kleinerer Chemokine erfolgt mit Hilfe eines 18 %igen Trenngels. Die unterschiedlichen Gele werden beginnend mit dem Trenngel nacheinander angefertigt. Die Lösung des Trenngels wird nach Überführung in die hierfür vorgesehene Vorrichtung mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation der Gele wird der Alkohol sorgfältig entfernt, um zu vermeiden, dass sich

Tabelle 4.2: **Präparation der Sammel- und Trenngele.** Der gängige Gehalt an (Bis-)Acrylamid beträgt 10 %, kann jedoch je nach Größe der zu analysierenden Proteine variiert werden. Je SDS-PAGE werden etwa 4,5 mL für das Trenn- und 1,5 mL für das Sammelgel benötigt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf zwei Gele.

	Sammelgele	Trenngele	
	5 %	10 %	18 %
ddH ₂ O	3,32 mL	3,96 mL	1,29 mL
Acryl-/Bisacrylamid	0,99 mL	3,99 mL	6 mL
1,5 M TRIS, pH 8,8		3 mL	2,5 mL
0,5 M TRIS, pH 6,8	1,5 mL		
10 % SDS	60 µL	120 µL	100 µL
TEMED	6 µL	10 µL	10 µL
APS	120 µL	100 µL	100 µL

später zwischen den einzelnen Probenkammern Luftblasen bilden. Das Trenngel wird mit dem noch flüssigen Sammelgel überschichtet und letzteres mit einem Kamm zur Taschenbildung versehen. Sobald die Polymerisation vollständig ist, können die Gele in die Gelkammer eingebaut, mit SDS-Laufpuffer (25 mM TRIS, 193 mM Glycin, 3,5 mM SDS) überschichtet und mit den Proben beladen werden. Es wird je nach benötigter Auftrennung des Proteingemischs für 60 - 90 Minuten eine Spannung von 130 - 150 V angelegt.

4.2.6 Kolloidale Coomassie-Färbung

Um eine SDS-PAGE mit kolloidaler Coomassie-Lösung anzufärben und Proteinbanden in guter Auflösung zu erhalten, wird folgende Suspension hergestellt:

- 10 % (v/v) 85 %ige Phosphorsäure
- 20 % (v/v) Methanol
- 0,12 % (w/v) Coomassie G-250
- 10 % (w/v) Ammoniumsulfat

Nach Durchführung einer Gelelektrophorese (siehe 4.2.5) wird das Gel in dieser Suspension über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler inkubiert. Es folgen mehrere Waschstschritte mit ddH₂O, bis keine Verfärbung des Waschwassers mehr zu sehen und klar definierte Proteinbanden sichtbar sind.

4.2.7 Western Blot

Ein, wie unter 4.2.5 beschrieben, aufgetrenntes Proteingemisch kann im Anschluss an die Gelelektrophorese in einem Western Blot auf eine Trägermembran überführt werden. Die Übertragung der auf einem Polyacrylamidgel befindlichen, negativ geladenen Proteine auf die hier verwendete (Polyvinylidenfluorid) PDVF-Membran erfolgt durch Anlegen eines zum Gel senkrecht gerichteten elektrischen Feldes. Im Anschluss werden einzelne Proteinbanden mittels Antikörperfärbung spezifisch detektiert.

Semi-dry blotting

Zur Überführung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine PDVF-Membran werden der Reihe nach die Anode des Blottingapparates, fünf Filterpapiere, die Membran, das Gel, fünf weitere Filterpapiere und letztlich die Kathode aufeinander angeordnet. Zuvor wird die Membran in reinem Methanol äquilibriert und mit Wasser gewaschen. Sowohl Membran als auch Filterpapiere werden zudem gründlich mit Blotting-Puffer (48 mM TRIS, 39 mM Glycin, 10 % Methanol) befeuchtet. Luftblasen werden mit Hilfe eines Glasstabs beseitigt. Je Membran werden 95 mA für 45 Minuten angelegt und die Übertragung der Proteine anhand der farbig markierten Banden des Proteinstandards überprüft. Anschließend werden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C in je 10 mL Blocking-Puffer (5 % Magermilchpulver in PBS-T (0,1 % (v/v) Tween[®]20)) auf dem Laborschüttler inkubiert. Durch das Blocken werden die noch nicht mit Proteinen bedeckten Abschnitte der Membran mit Milchproteinen besetzt, um unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper zu reduzieren. Nach Entfernen des Blocking-Puffers wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit in PBS-T gelöstem Antikörper auf dem Laborschüttler inkubiert. Der Antikörper wird hierzu nach Angaben des Herstellers, in dieser Arbeit meist 1:500 oder 1:1000, verdünnt. Darauf folgen drei 10-minütige Waschschrte mit PBS-T, eine weitere Stunde Inkubation mit einem entsprechenden, 1:1000 verdünnten Sekundärantikörper und erneut drei jeweils 10-minütige Waschschrte mit PBS-T. Im Fall der hier eingesetzten Sekundärantikörper handelt es sich um mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper. Die Detektion erfolgt nach Zugabe des gebrauchsfertigen Sprühreagenz, Roti[®]-Lumin plus Lösung 1 und 2, welches das zur enzymkatalysierten Reaktion benötigte Substrat enthält. Die Chemolumineszenz wird in der Geldokumentationsstation LAS-3000 von Fujifilm detektiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Bearbeitungssoftware Adobe Photoshop, indem die Aufnahme der Chemolumineszenz exakt über die Weißlichtaufnahme gelegt und der Bereich des Proteinstandards in der oberen Ebene freigestellt wurde, sodass die relevanten Spuren beider Aufnahmen simultan zu sehen sind. Zusätzlich werden die Aufnahmen gegebenenfalls bezüglich Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Regeneration von Western Blot Membranen

Als *Stripping* (deutsch: ablösen) wird das Entfernen der Antikörper, welche bereits mit den auf einer Membran gebundenen Proteine assoziiert sind, bezeichnet. Dieses Vorgehen ermöglicht zwei aufeinander folgende Detektionen mit unterschiedlichen Antikörpern. Nach Durchführung einer Immundetektion wird die Membran zweimal für fünf bis zehn Minuten mit *Stripping*-Puffer (200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Tween[®]20) bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler inkubiert. Es folgen zwei Waschschrte mit PBS für je zehn Minuten, wonach zweimal fünf Minuten mit PBS-T gewaschen wird. Im Anschluss kann eine erneute Immundetektion wie bereits im vorherigen Abschnitt dargelegt, mit der Inkubation mit Blocking-Puffer begonnen werden.

TCA-Präzipitation

Zur Erhöhung der Konzentration einer Proteinlösung können die Proteine nach Sanchez, hier mit einigen Abweichungen durchgeführt, mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und in einem geringeren Volumen an einfach konzentriertem Lämmli-Puffer gelöst werden.^{[171] [172]}

Hierzu wird die zu präzipitierende Proteinlösung auf eine Endkonzentration von 20 % (v/v) TCA mit einer 100%igen (w/v) TCA-Lösung versetzt. Es folgt eine Inkubation für zehn bis 15 Minuten auf Eis (alternativ bei 4°C) und ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und etwa 15000 x g. Der Überstand wird abgenommen, das unter Umständen nicht sichtbare Proteinpellet zweimal mit eisgekühltem Aceton gewaschen und zur vollständigen Entfernung des Acetons bei 95°C für etwa fünf Minuten erhitzt. Das entstandene Pellet wird durch Zugabe von einfach konzentriertem Lämmli-Puffer gelöst und, wie unter 4.2.5 beschrieben, weiter behandelt. Verfärbt sich der im Lämmli-Puffer enthaltene pH-Indikator gelb, kann der pH-Wert durch Zugabe von Dämpfen einer gesättigten Ammoniaklösung ohne Änderung des Volumens der Proteinlösung erhöht werden.

4.2.8 Proteinkonjugation

Zur selektiven Markierung von CXCL8 wird eine im Arbeitskreis klonierte Mutante, CXCL8S72C, verwendet. Der zusätzliche Cysteinrest am C-Terminus des Proteins dient, wie unter 5.18 beschrieben, als Nukleophil in einer Michael-Addition mit Maleimid-funktionalisierten Fluorophoren. CXCL8S72C liegt aufgrund seines zusätzlichen Cysteinrestes und der intermolekularen Disulfidbrücken in Lösung als Dimer vor. Die Reduktion dieser Disulfidbrücken erfolgt mit auf Agarosepartikeln immobilisiertem Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP). Durch das milde Reduktionsmittel werden intramolekulare Disulfidbrücken nicht gespalten. Aufgrund der Immobilisierung kann das Reduktionsmittel leicht vom Reaktionsansatz abgetrennt werden und ist einfach zu handhaben.

Das zur Reduktion benötigte Volumen an suspendierten TCEP-Partikeln richtet sich nach der Beladung der Agarosepartikel. Je zu reduzierender Disulfidbrücke sollten nach Herstellerangabe (Sigma-Aldrich) drei Äquivalente TCEP eingesetzt werden, was drei Äquivalenten auf zwei Äquivalente CXCL8S72C entspricht. Das benötigte Volumen wird dreimal mit je 100 µL Waschpuffer (PBS-EDTA: PBS, 20 mM EDTA, pH 7,0) gewaschen. Die Suspension wird vorsichtig gemischt und bei 1000 x g eine Minute zentrifugiert. Das zu reduzierende Protein wird in Waschpuffer verdünnt zum TCEP-Harz gegeben und für 30 Minuten bei 800 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wird zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit der Lösung des Maleimid-Fluorophors versetzt. Zur Erhöhung der Ausbeute wird das TCEP-Harz noch einmal mit 100 - 200 µL Waschpuffer gewaschen und dem Reaktionsansatz zugeführt. Es werden je nach verwendetem Fluorophor mindestens vier Äquivalente der Markierungsreagenz eingesetzt. Es wird drei Stunden bei 800 rpm und Raumtemperatur inkubiert und das Reaktionsgemisch noch am selben Tag mittels Umkehrphasenchromatographie aufgetrennt. Die gesammelten Fraktionen werden sofort lyophilisiert, um eine Hydrolyse der entstandenen Thioetherbindung zu vermeiden.

4.3 Funktionalisierung eines Übergangsmetallkomplexes

Zur Kupplung des Übergangsmetallkomplexes **4** Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂) mit CXCL8S72C, wie unter 4.2.8 beschrieben, wird die zur Michael-Addition benötigte Maleimidgruppe durch den Linker β-Maleimidopropionsäure-NHS-Ester eingefügt.

Zehn Äquivalente des Linker werden zur Funktionalisierung in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in Niedrigsalz-PBS (35 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, pH 7,5) mit Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂) zusammengegeben. Der Anteil an DMSO im Reaktionsansatz beträgt letztlich etwa 20 % des Gesamtvolumens. Aufgrund des anfangs entstehenden Niederschlags wird der Reaktionsansatz zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt, sodass sich dieser löst. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei 25 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reinigung des funktionalisierten Komplexes erfolgt nach 4.2.4 mittels Umkehrphasenchromatographie.

4.4 Zellbiologische Methoden

Da es sich bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren um glykosylierte Membranproteine handelt, erfolgt die Expression in Säugerzellen. Hierzu werden außerhalb eines Organismus kultivierte Zellverbände, sogenannte Zellkulturen eingesetzt. Zellen mit der Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation bilden eine immortalisierte Zelllinie und können über längere Zeiträume kultiviert werden. Dagegen handelt es sich bei den hier ebenfalls verwendeten neutrophilen Granulozyten um Primärzellen, welche als differenzierte Zellen ein begrenztes Teilungsvermögen aufweisen und aufgrund dessen nach wenigen Zellteilungen absterben. Während dieser Arbeit wurde aufgrund der einfachen Handhabung vorrangig mit immortalisierten Zelllinien von humanen, embryonalen Nierenzellen, HEK293, gearbeitet. Der verwendete Zelltyp wurde nach der Entnahme aus dem Ursprungsorganismus durch Transfektion mit DNA des menschlichen Adenovirus-Typ-5 immortalisiert, weist ein adhärentes Wachstum auf und zeigt eine Verdopplungszeit von etwa 24 h.^[173] Die Zellen wurden vom Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Koch-Brandt, Institut für Pharmazie und Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz zur Verfügung gestellt.

Hank's buffered salt solution, HHBS, stellt einen für Zellassays gängigen Puffer dar. Seine Zusammensetzung lautet wie folgt:

- *Hank's buffered salt solution* mit Hepes (HHBS)
 - 137 mM NaCl
 - 5,4 mM KCl
 - 0,44 mM KH₂PO₄
 - 5,5 mM Glukose
 - 0,34 mM Na₂HPO₄
 - 0,8 mM MgSO₄
 - 1,26 mM CaCl₂
 - 4,16 mM NaHCO₃
 - 20,14 mM Hepes (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)

4.4.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung von HEK293-Zellkulturen lautet wie folgt:

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (einfach konzentriert): enthält 4,5 g/L Glukose, steril
- 10 % fetales Kälberserum (FKS)
- 2 mM L-Glutamin
- 100 U/mL Penicillin
- 100 µg/mL Streptomycin

Adhärente Kultivierung von HEK293-Zellen

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen werden stets unter der Sterilbank durchgeführt, wobei die hierbei eingesetzten Hilfsmittel, wie Gefäße und Pipetten, stets vor Gebrauch gründlich mit 70 %igem Ethanol oder 45 %igem Isopropanol desinfiziert werden. Die Kultivierung erfolgt in einem CO₂-Inkubator bei 5 % Kohlenstoffdioxid und 37°C. Zur Kultivierung der Zellen in einer 75 cm² großen Kulturflasche werden 15 mL Nährmedium, bei einer 25 cm²-Flasche 5 mL, verwendet. Dagegen werden Zellen zur Transfektion mit 2 mL Nährmedium in 6-Well-, mit 500 µL in 24-Well- und mit 150 µL in 96-Well-Platten kultiviert. Zur Kultivierung transfizierter Zellpopulationen wird diesen das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von 700 µg/mL zur Selektion zugefügt. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, wird während der Selektion alle zwei Tage ein Mediumwechsel mit frischem Antibiotikum durchgeführt. Die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 stabil exprimierenden Zellen werden mit 350 µg/mL Selektionsantibiotikum kultiviert.

4.4.2 Anlegen von Kryokonserven und Aussäen von Zellen

Zur Konservierung können konfluente Zellen als Kryokonserven bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert und jederzeit wieder neu kultiviert werden. Die Verwendung von reinem fetalem Kälberserum (FKS) gegenüber der Konservierung in Nährmedium erhöht die Lebensfähigkeit der Zellen. Die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert die Bildung von Eiskristallen, was einer Schädigung der Zellen beim Gefrieren entgegenwirkt. Konfluente Zellen werden, wie unter 4.4.3 erläutert, trypsiniert und bei 1000 x rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Das entstehende Zellpellet wird in reinem FKS mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert, wobei 1 mL je anzulegendem Aliquot benötigt wird. Die Zellsuspension wird aliquotiert, in einem Styroporbehälter schonend auf -20°C heruntergekühlt und am Folgetag in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Aussäen von Zellen

Zur erneuten Kultivierung konservierter Zellen stehen je nach Alter der Kultur zwei unterschiedliche Vorgehensweisen zur Verfügung. Kryostocks, die weniger als ein Jahr alt sind, werden in 10 mL Nährmedium aufgenommen und anschließend bei 1000 x rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird in einem der zu verwendeten Kulturflasche entsprechenden Volumen an Nährmedium resuspendiert und

ausgesät. Handelt es sich um ältere Zellkulturen, so wird die Zellsuspension mit Nährmedium auf ein Volumen von 10 mL aufgefüllt und in eine Kulturflasche überführt, sodass die Zellen anwachsen können. Am Folgetag werden die Populationen auf Adhärenz geprüft und ein Mediumwechsel durchgeführt. Beide Vorgehensweisen ermöglichen die Entfernung des das Zellwachstum negativ beeinflussenden DMSO, welches zur Konservierung jedoch unentbehrlich ist.

4.4.3 Passagieren von Zellen

Trypsinieren und Passagieren von adhärenenten HEK293-Zellen

Um adhärenente Zellen von einer Oberfläche zu lösen und Zellen zu vereinzeln, bedient man sich der Endopeptidase Trypsin. Werden Zellkulturen nur für eine kurze Zeitspanne mit der Serinprotease inkubiert, so findet lediglich eine proteolytische Spaltung extrazellulärer Proteine statt und die Zellen bleiben unbeschädigt. Das im Nährmedium enthaltene FKS enthält natürliche Proteaseinhibitoren, weshalb Zellkulturen vor dem Trypsinieren mit 10 mL PBS gewaschen werden, um einer Inhibierung durch FKS entgegenzuwirken. Zur Ablösung adhärenenter Zellen wird ein der Zellkulturflasche entsprechendes Volumen einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS) zugegeben, sodass ein dünner Flüssigkeitsfilm auf dem Zellrasen entsteht. Die Zellen werden bis zur sichtbaren Ablösung, etwa 10 - 20 Minuten, bei 37°C inkubiert, in Nährmedium resuspendiert und entsprechend der für Experimente benötigten Zellzahl gesplittet.

Ablösen von Zellen zur Analyse von Proteinen der Zelloberfläche

Zur Analyse auf der Zelloberfläche exprimierter Proteine mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie sowie zur Anfertigung von Membranpräparationen ist eine proteolytische Ablösung der Zellen mit Trypsin ungeeignet. Um intakte Oberflächenproteine wie die hier thematisierten Rezeptoren zu erhalten, wird PBS/EDTA (PBS, 0,5 mM) zur durchflusszytometrischen Analyse sowie zur Anfertigung von Membranpräparationen verwendet. Die Durchführung entspricht mit Ausnahme einer geringfügig längeren Wartezeit (bis zu 20 Minuten) bis zur sichtbaren Ablösung des Zellrasens der oben genannten mit Trypsin/EDTA.

Die Ablösung des Zellrasens zur konfokalen Mikroskopie wurde mit Accutase[®] *solution* durchgeführt. Zellen mit einer 50-80%igen Konfluenz werden zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Die enzymatische Aktivität wird durch Zugabe des Nährmediums gestoppt, worauf eine Zentrifugation von drei Minuten bei 1600 rpm folgt. Die benötigte Zellzahl wird auf 2D sterilen Coverslips kultiviert.

4.4.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wird die zu quantifizierende Zellpopulation, wie unter 4.4.3 geschildert, in einem der Größe der Kulturflasche entsprechendem Volumen an Nährmedium resuspendiert. 1 mL dieser Zellsuspension wird bei 1000 rpm pelletiert und in 1 mL PBS resuspendiert. Die Differenzierung lebender von abgestorbenen Zellen erfolgt mit Trypanblau, welches gebrauchsfertig erworben wird. Aufgrund der sinkenden Membranintegrität nekrotischer Zellen wird der Farbstoff von intrazellulären Proteinen komplexiert,

sodass diese Zellen durch Blaufärbung von lebenden unterschieden werden können. Hierzu wird die Zellsuspension 1:5 mit einer 0,5%igen Trypanblaulösung verdünnt. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer kann die Zellzahl dieser Verdünnung an einem Phasenkontrastmikroskop ermittelt werden. Eine Inkubationszeit ist nicht nötig. Zur Berechnung der Zellzahl bedient man sich folgender Formel 4.4:

$$\text{Zellzahl in einem Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \quad (4.4)$$

4.4.5 Transfektion und Selektion stabil transfizierter Zellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Unter Zusatz spezieller Transfektionsreagenzien kann Vektor-DNA bis in den Zellkern vordringen, wobei die Wirkung des hier eingesetzten Reagenz auf kationischen Polymeren basiert. Diese bilden mit DNA positiv geladene, stabile Komplexe aus, wodurch die negativ geladene DNA die ebenfalls negativ geladene Plasmamembran durchqueren kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Etablierung dieser Methode im Arbeitskreis verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet.

Zur Transfektion werden Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Unabhängig vom verwendeten Transfektionsreagenz werden 500 ng Plasmid-DNA je 24-Wellkavität und 500 μL eingesetzt. Bei Verwendung von Lipofectamin[®]LTX wird ein zuvor für den jeweiligen Zelltyp ermitteltes Volumen an Transfektionsreagenz (2-5 μL) in 50 μL Opti-MEM[®] verdünnt und mit 50 μL der ebenfalls in Opti-MEM[®] verdünnten Plasmid-DNA gemischt. Es wird für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 50 μL dieser Lösung zu jeder 24-Wellkavität gegeben.

Zur Transfektion mit Screenfect ist kein vorheriges Aussäen der Zellpopulation nötig. 2,4 μL Transfektionsreagenz in 60 μL *Dilution buffer* werden zu der in ebenfalls 60 μL desselben Puffers verdünnten Plasmid-DNA gegeben. Im Anschluss an eine 20 bis 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur werden 120 μL dieser Lösung mit 450 μL einer trypsinierten Zellsuspension vereint und in einer 24-Wellplatte ausgesät.

Die Transfektion mit TurboFect wurde im 6-Well-Format durchgeführt. Hierzu werden 2 μg Plasmid-DNA in 200 μL Opti-MEM[®] verdünnt, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 μL Transfektionsreagenz wird erneut für 20 Minuten inkubiert und der vollständige Ansatz zu den Zellen gegeben. Nach sechs Stunden nach Zugabe des Transfektionsgemischs erfolgt ein Mediumwechsel mit G418-haltigem Nährmedium.

Sobald sich Vitalität und Wachstum der entstandenen Mischkultur normalisiert haben, werden die Zellen zur Einzelklonselektion trypsiniert und eine Verdünnung der resuspendierten Zellen zur Bestimmung der Zellzahl nach 4.4.4 hergestellt. Nach Ermittlung dieser kann eine Zellsuspension definierter Zellzahl angesetzt und in einer 96-Well-Platte mit 100 μL Zellsuspension je Kavität etwa 2 Einzelklone ausgesät werden. Nach ein bis zwei Wochen können die einzelnen Wells auf angewachsene Zellen kontrolliert und Einzelklone selektiert werden. Man überführt die ausgewählten Zellpopulationen nach ausreichender Proliferation in 24-Well-Platten und kultiviert bis zu einer Zellkultur der Größe einer 10 cm-Platte. Es folgt eine Überprüfung

der Einzelklone hinsichtlich der speziellen Funktion, die die Zellen aufgrund der genomischen Veränderung aufweisen müssten, und eine Konservierung durch Anlegen von Kryokonserven wie unter 4.4.2.

4.4.6 Lyse eukaryotischer Zellen

Zur Analyse der in Säugerzellen exprimierten Proteine wird ein Western Blot durchgeführt. Hierzu werden aus noch adhärenenten Zellen Lysate angefertigt. Der hierfür benötigte RIPA-Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

- RIPA-Puffer
 - 150 mM NaCl
 - 20 mM TRIS
 - 5 mM EDTA
 - 0,5 % Deoxycholat, Natriumsalz
 - 0,1 % SDS
 - 1 % Triton-X-100
 - 1 Proteaseinhibitortablette je 10 mL Ansatz
 - pH 7,4

Lyse adhärenter Zellpopulationen

Zur Anfertigung von Zelllysaten wird eine Zellpopulation in einer Kavität einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Serumhaltige Medien zeichnen sich durch einen hohen Gehalt unterschiedlicher, für das Wachstum notwendiger Proteine aus, welche spätere präparative und analytische Vorgehensweisen jedoch negativ beeinflussen. Aufgrund dessen werden Zellpopulationen vor der Zugabe des Lysepuffers mit PBS gewaschen.

Durch Zugabe von 300 μ L RIPA-Puffer je Well werden die Zellen augenblicklich lysiert und können mit einem Schaber vom Boden des Kulturgefäßes gesammelt werden. Es folgt eine Inkubation auf dem Plattformschüttler für 30 Minuten auf Eis. Zelltrümmer und Membranfragmente werden in einer folgenden Zentrifugation bei 16.0000 x g abgetrennt und das proteinhaltige Zelllysate bei -20 °C konserviert. Um verschiedene Zellüberstände hinsichtlich der enthaltenen Menge an Rezeptor miteinander vergleichen zu können, muss die Zellanzahl und damit die Gesamtproteinmenge der einzelnen Proben untereinander übereinstimmen. Hierzu wird die Gesamtproteinmenge der angefertigten Zelllysate nach 4.2.3 bestimmt. Auf diese Weise ist durch entsprechende Verdünnung der Proteinlösungen gewährleistet, dass bei der darauf folgenden SDS-PAGE in jeder Probe dieselbe Gesamtproteinmenge enthalten ist.

4.4.7 Präparation von Plasmamembranen

Zur Durchführung von Bindungsversuchen mittels Fluoreszenzanisotropie werden Membranpräparationen mit leichten Änderungen nach Lee und Devis sowie Harris *et al.* angefertigt.^{[124] [174]}

Zehn mit CXCR1/2-transfizierten Zellen konfluent bewachsene 75 cm²-Kulturgefäße werden hierfür dreimal mit je 10 mL PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 750 µL PBS/EDTA-Lösung (PBS, 0,5 mM EDTA) je Kulturflasche etwa 15 bis 20 Minuten bei 37 °C bis zur sichtbaren Ablösung des Zellrausens inkubiert. Nach Resuspension der gesamten Zellpopulation in mindestens 10 mL des zur Kultivierung verwendeten Nährmediums wird bei 1000 rpm für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 2 mL eisgekühltem Homogenisierungspuffer (50 mM TRIS-Puffer, eine halbe Proteaseinhibitortablette auf 10 mL Puffer, pH 7,5) resuspendiert. Es folgen 20 Hübe mittels Potter-Elvehjem-Homogenisator, eingebaut in ein Rührwerk (Eurostar digital, IKA), wobei die Viskosität der Zellsuspension sichtbar abnimmt. Der Zellaufschluss erfolgt hierbei durch bei der Drehbewegung entstehende Scherkräfte, was eine sehr sanfte und damit zur Präparation von Zellorganellen gut geeignete Methode darstellt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wird die Suspension auf Eis gelagert. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgt durch Zentrifugation bei 4 °C für zehn Minuten bei 4500 x g. Der klare Überstand wird in ein Ultrazentrifugationsgefäß überführt und für 40 Minuten (Zeit zur Beschleunigung inklusive) bei 4 °C und 40.000 x g zentrifugiert. Bei Verwendung des Ti-70-Rotors der genutzten Beckmannzentrifuge entspricht dies 20.000 rpm. Das entstandene, farblose und gallertartige Pellet wird in Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitoren mit Hilfe eines Glas/Teflonhomogenisators gründlich resuspendiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Weist das Pellet farblich sichtbare Verunreinigungen auf, wird die resuspendierte Membranpräparation nochmals zur Entfernung dieser bei 4500 x g für fünf bis zehn Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet verworfen. Am Tag der Verwendung folgt als zusätzlicher Reinigungsschritt eine erneute Ultrazentrifugation. Das Pellet wird zur Durchführung von Bindungsversuchen in einem für den Versuch benötigten Volumen an Bindungspuffer (50 mM TRIS, 0,0005 % Tween[®]20) mit Hilfe eines Glas/Teflonhomogenisators resuspendiert und die Gesamtproteinkonzentration entsprechend 4.2.3 bestimmt. Als qualitativer Nachweis der Rezeptoren dient ein, wie unter 4.2.7 beschriebener, Western Blot.

4.4.8 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein immunologisches Verfahren zur quantitativen Analyse von Zellen. Durch einen speziellen Aufbau passieren einzelne Zellen einer Suspension verschiedene Laser. Durch Detektion des Streulichts können Aussagen über Größe (*forward scatter*, Streuung des Lichts im flachen Winkel) und Granularität (*side scatter*, Brechung des Lichts im rechten Winkel) der zu analysierenden Zellen getroffen werden. Durch Einsatz fluoreszent markierter Antikörper können einzelne Proteine - unter Verwendung unterschiedlicher Fluorophore auch simultan - quantitativ nachgewiesen werden.

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Rezeptorexpression auf HEK293-CXCR1 werden Zellen entsprechend 4.4.3 abgelöst und nach 4.4.4 die Zellzahl bestimmt. Je Ansatz werden 750.000 Zellen aliquotiert und viermal mit je 100 µL Waschpuffer (HHBS, 0,2 % Tween[®]20) gewaschen. Zentrifugationsschritte werden im Folgenden stets bei 400 x g für fünf Minuten und 4 °C durchgeführt. Zum Blocken unspezifischer Wechselwirkungen der Antikörper mit der Zelloberfläche folgt eine Inkubation in 100 µL 5 % HHBS-BSA

je Ansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Es wird, wie oben beschrieben, viermal mit Waschpuffer gewaschen. Die Zellen werden mit 100 μL des entsprechenden Antikörpers in 0,5 % BSA in HHBS für 75 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert und erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Bei Verwendung eines nichtmarkierten Primärantikörpers wird für 45 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss an die üblichen Waschschrte nochmal 45 Minuten mit dem passenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Zur Messung werden die Zellen in etwa 200 μL HHBS resuspendiert und die Suspension in spezielle FACS-Röhrchen überführt. Die Größe der Düse beträgt 100 μm , wobei der sogenannte *sheath pressure*, jene Größe, welche beschreibt, mit welchem Druck die Trägerflüssigkeit durch das Durchflusssystem geleitet wird, sowie die Tropfenfrequenz nach Angaben des Herstellers bei der Laserausrichtung vor jeder Durchführung mit Hilfe spezieller fluoreszierender Beads eingestellt werden, sodass die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten unabhängiger Experimente vergleichbar sind. Es wurde die Fluoreszenzintensität bei der Wellenlänge des jeweiligen Antikörpers von 100.000 Zellen (Ereignissen) jeder Probe gemessen. Die eingesetzten Konzentrationen der einzelnen Antikörper können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 4.3: **Konzentration der verwendeten Antikörperlösungen in der Durchflusszytometrie.** Die genaue Beschreibung der einzelnen Antikörper ist Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Name	Konzentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$
Anti-CXCR1 Antikörper [501] (ab60254)	10
FITC anti-human CD181 (CXCR1) <i>antibody</i>	7,5
FITC <i>mouse-IgG_{2b}</i>	7,5
FITC anti-human CD182 (CXCR2) <i>antibody</i>	7,5
FITC <i>mouse IgG₁</i>	7,5
FITC goat anti-mouse IgG sc2010	5

4.4.9 Konfokale Laser-Raster Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie ist eine weitere Methode des immunologischen Nachweises der exprimierten Proteine und wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis von PD. Dr. Meckel, *Membrane Dynamics* Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt, von Sarah Albrecht durchgeführt.^[175] Durch einen speziellen Aufbau unter Verwendung von Lochblenden im Beleuchtungs- und Abbildungsstrahlengang ist es möglich, die Zellen optisch in konfokale Schärfenebenen zu zerlegen.^[176]

Die, wie unter 4.4.3 beschrieben, auf Coverslips kultivierten Zellen werden mit PBS gewaschen und mit PFA/PBS (4% Paraformaldehyd in PBS) für 20 Minuten fixiert. Es folgt eine Permeabilisierung für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 0,2%igen Lösung an Triton-X-100 in PBS und einem Waschschrte mit PBS. Unspezifische Bindungsstellen werden für 45 Minuten mit einer 1%igen Lösung an BSA in PBS geblockt. Die Inkubation mit den 1:100 in PBS verdünnten, fluoreszent markierten Antikörpern erfolgt für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die hier verwendeten Antikörper entsprechen jenen der bei durchflusszytometrischen Messungen eingesetzten. Nach drei Waschschrten für jeweils fünf Minuten mit PBS gefolgt von zweimaligem Spülen mit PBS für jeweils fünf Minuten wird einmal mit deionisiertem Wasser für fünf Minuten gespült. Bis zur weiteren Durchführung werden die Proben bei 4°C gelagert.

Die mikroskopischen Aufnahmen werden am Leica TCS SP und Leica SP5 unter Verwendung von Öl-Immersionsobjektiven mit Vergrößerungen von 40 x und 60 x und 20 x Wasser-Immersionen durchgeführt. Es werden sowohl Fluoreszenzaufnahmen als auch Durchlichtbilder erstellt. Weitere Angaben wie die Belichtungsdauer sind in den jeweiligen Abbildungsunterschriften angegeben.

4.5 Aktivitäts- und Bindungsassays

Die Expression biologisch aktiver Rezeptoren wird in unterschiedlichen Aktivitäts- und Bindungsassays geprüft.

4.5.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten aus Spenderblut

Die Isolierung dieser Primärzellen erfolgt aus sogenannten *buffy coats*, bezogen vom Blutspendezentrum des DRK in Frankfurt und wurde von Ina Rink durchgeführt.

Gleiche Volumina an *buffy coat*, PBS und 6 %iger Dextranlösung in H₂O werden zusammengegeben, das Gemisch bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, wobei sich ein Großteil der Erythrozyten absetzt. Der Überstand wird anschließend zehn Minuten bei 240 x g und 15°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet aus Blutzellen wird mit PBS gründlich gewaschen, um Serumproteine zu entfernen, und in 10 mL PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf 30 mL LymphoprepTM (Axis-Shield PoC) gegeben und ohne Bremse bei 4°C und 600 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Die weiße Mittelschicht des entstehenden Dichtegradienten enthält die Monozyten und wird vorsichtig entfernt. Das rote Pellet wird mit PBS gewaschen und in 5 mL PBS resuspendiert. Es folgt ein hypotonischer Schock für 30 s durch Zugabe von 25 mL destilliertem Wasser, wonach 17,2 mL einer 3,6 %igen Natriumchloridlösung zugegeben werden. Die Zellsuspension wird erneut für zehn Minuten bei 240 x g zentrifugiert und das aus überwiegend neutrophilen Granulozyten bestehende Pellet mit 30 mL PBS gewaschen. Zur Durchführung eines Transwell-Assays werden die Zellen in Chemotaxispuffer (0,2% BSA in RPMI-Medium) resuspendiert, im Calcium-Assay wird eine Zellsuspension in HHBS angefertigt.

4.5.2 Calcium-Assay

Nach Aktivierung der G α_i -gekuppelten Signalkaskade, wie unter 1.4.2 beschrieben, kann ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Verwendung des fluoreszenten Calciumchelators - Fura-2AM - detektiert werden.

Zur Durchführung des Assays mit adhärennten Zellen in seiner endgültigen Form werden am Vortag je 80.000 Zellen in die Kavität einer *96 Flat black clear bottom Cell Bind-MTP* [Corning] ausgesät. Die adhärennten Zellen werden mit 100 μ L HHBS gewaschen und mit demselben Volumen einer 2 μ M Fura-2AM-Lösung in HHBS überschichtet. Nach einer Inkubation von 30/45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wird erneut mit 100 μ L HHBS gewaschen und dasselbe Volumen HHBS vorgelegt. Zur Durchführung mit neutrophilen Granulozyten werden die Kavitäten zuvor mit einer Lösung von Poly-L-Lysin in

PBS, 50 µg/mL, für etwa 30 Minuten bei 37°C oder eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Nach Waschen der Kavitäten mit PBS werden diese mit jeweils 250.000 Zellen in 100 µL HHBS befüllt. Als Suspensionszellen werden die mit einer 4 µM Lösung Fura-2AM inkubierten neutrophilen Granulozyten (30/45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln) für zehn Minuten bei 4°C und 240 x g zentrifugiert, ein Waschschriff entfällt. Unabhängig von der Zellart werden je Kavität 50 µL Proteinlösung mit einer Geschwindigkeit von 100 µL/s automatisch am Tecan M1000 injiziert und die Emission bei 510 nm über einen Zeitraum von 80 s bei Raumtemperatur gemessen. Die Anregung erfolgt im Wechsel bei 340 und 380 nm. Durch Verwendung der beiden Injektoren ist es möglich, zwei Lösungen zu injizieren. Die Konzentration an CXCL8 in HHBS-BSA in der Injektionslösung beträgt 30 nM, sodass die Konzentration nach Zugabe zu den Zellen 10 nM beträgt. Zur Bestätigung möglicher Inhibitoren, die an das Chemokin binden, werden die zu untersuchenden Substanzen mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Protein in HHBS-BSA vorinkubiert. Als Negativkontrolle dient 1 % BSA in HHBS.

4.5.3 Transwell-Assay

Die Untersuchung der durch ein Chemokin ausgelösten, gerichteten Migration kann in einem Chemotaxis-Assay im Transwell-Format (kurz Transwell-Assay) durchgeführt werden. Die hierzu verwendete Boyden-Kammer besteht aus einem mit Chemokinlösung befüllten Reservoir, in das ein die Zellsuspension enthaltendes Insert eingesetzt wird. Beide Kammerteile sind durch eine poröse Membran miteinander verbunden, durch die die Zellen in Richtung des unteren Reservoirs mit dem Chemokin wandern.

Ein Transwell-Assay mit transfizierten HEK293-Zellen wurde von Ina Rink und Stephanie Eckes etabliert und durchgeführt. Die adhärenente Zellpopulation wird, wie unter 4.4.3 beschrieben, Die jeweilige Verdünnung ist der Beschreibung der Experimente zu entnehmen, in welchen die Antikörper verwendet wurden. mittels PBS/EDTA abgelöst und die Zellsuspension auf 10^6 Zellen/mL eingestellt. Es werden jeweils 50 µL dieser Zellsuspension (entspricht $5 \cdot 10^4$ Zellen/Kavität) in ein Insert gegeben. Für die Negativkontrolle wird das untere Reservoir mit 150 µL Chemotaxispuffer (0,2 % BSA in RPMI-Medium) befüllt. Als Positivkontrolle wird der Chemotaxispuffer zusätzlich mit Chemoattraktant versetzt, wobei für CXCL8 eine Endkonzentration von 100 ng/mL eingesetzt wird. Potentielle Inhibitoren, bzw. zur Etablierung des Assays ein gegen das Chemokin gerichteter Antikörper, werden zusätzlich zur Chemokinlösung gegeben. Die Chemokin-Inhibitorlösung wird vor der Durchführung des Assays mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Eine weitere Kontrolle imitiert eine vollständige Migration der Zellen, sodass sich 100 % der Zellen im unteren Reservoir befinden, was der Normalisierung des Assays dient. Hierzu wird das Insert nicht befüllt und die untere Kammer mit 100 µL Chemotaxispuffer und 50 µL Zellsuspension befüllt. Nach Befüllung aller Reservoirs wird für drei Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und im Anschluss die Zahl migrierter Zellen im unteren Reservoir durch Zugabe von Resazurin ermittelt. Der nicht fluoreszierende, blaue Farbstoff wird von vitalen Zellen in einer Redoxreaktion zu einem fluoreszierenden Farbstoff, Resorufin, umgesetzt.^[177] Hierzu werden die im Insert verbliebenen Zellen mit Hilfe eines Papiertuchs entfernt und das Insert mit 50 µL Medium gewaschen. Es werden 10 µL einer 0,15 mg/mL Lösung des in PBS gelösten Farbstoffs ins untere Reservoir gegeben, sodass die Endkonzentration 0,01 mg/mL beträgt. Im Fall von adhärenenten Zellen wird keine vollständige Migration in das untere Reservoir beobachtet, da

die Zellen aufgrund ihres adhärenen Charakters in der Membran zwischen den beiden Kompartimenten verbleiben, sodass das Insert unbefüllt erneut eingesetzt und für weitere drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wird. Im Anschluss wird am Tecan M1000 die Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 535 nm und Emission bei 585 nm bestimmt.

4.5.4 Fluoreszenzanisotropiemessungen

Die Wechselwirkung eines kleineren, fluoreszent markierten Moleküls mit einem unmarkierten, größeren Bindungspartner kann durch Detektion der Fluoreszenzanisotropie dargestellt werden, wobei die gemessene Anisotropie ein gewichtetes Mittel aus der Fluoreszenzanisotropie von freiem und gebundenem Liganden darstellt.

Im Zuge der Etablierung der Messung der Fluoreszenzanisotropie wurden verschiedene Versuchsparameter wie beispielsweise das verwendete Volumen je Kavität oder die Eigenschaften der eingesetzten Mikrotiterplatten getestet. An dieser Stelle wird die optimierte Durchführung erläutert. Falls abweichend, sind die genauen Bedingungen der einzelnen Experimente bei den jeweiligen Diagrammen im Ergebnisteil angegeben.

Zu Beginn wird eine Stammlösung der den Rezeptor darstellenden Komponente in Bindungspuffer (50 mM TRIS, 0,0005% Tween[®]20) angesetzt, eine 1:2-verdünnte Konzentrationsreihe erstellt und aliquotiert, sodass je nach Versuchsaufbau mindestens zwei Konzentrationsreihen entstehen. Um auf detektierbare Hintergrundsignale, beispielsweise durch die Autofluoreszenz biologischer Proben, zu prüfen, wird eine dieser Konzentrationsreihen der Rezeptorlösung mit Tracer und eine mit demselben Volumen an Bindungspuffer versetzt. Die mit Puffer versetzte Verdünnungsreihe dient als Leerwert zur Berechnung der Fluoreszenzanisotropie, wobei von jedem Probensignal das entsprechende Puffersignal subtrahiert wird (im Weiteren als Hintergrundkorrektur nach Harris *et al.* bezeichnet).^[174] Zum Vergleich unterschiedlicher Tracer werden entsprechend weitere Aliquote der Konzentrationsreihen erstellt. Zusätzlich werden alle Messungen als Replikate durchgeführt, wobei anfangs eine entsprechende Anzahl an 1:2-Verdünnungsreihen angesetzt wird, die anschließend wie beschrieben, aliquotiert werden. Im Folgenden werden jeweils 15 µL der Konzentrationsreihen in eine schwarze MTP mit transparentem Boden (*Assay Plate, 384 Well, low volume, non-treated, black with clear bottom*) vorgelegt. Nach Zugabe von 5 µL Bindungspuffer oder Tracerlösung wird die Platte bei 4500 x g kurz zentrifugiert und vor der Messung bei 37°C im Mikrotiterplatten-Lesegerät inkubiert, um zwischen allen Messungen eine einheitliche Temperatur zu gewährleisten. Zur Vermeidung von Verdunstungseffekten während der Dauer des Pipettierens wird die MTP auf Eis gelagert und während der Inkubationszeiten mit Folie abgeklebt. Vor und nach Entfernen dieser Folie wird ebenfalls bei 4500 x g zentrifugiert, wobei es genügt, die Zentrifugation nach Erreichen der Umdrehungszahl wieder zu beenden. Die Messung erfolgt zu verschiedenen Zeitpunkten und wird am Tecan Infinite M1000 und F200 bei den dem jeweiligen Fluorophor entsprechenden Wellenlängen durchgeführt. Zur Kontrolle möglicher Fluoreszenzlöschungs- oder Verstärkungseffekte nach Bindung des Tracers wird neben der Fluoreszenzanisotropie die Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben gemessen.



5 Ergebnisse

Zum Screening und zur Identifizierung von Inhibitoren werden sowohl biologisch aktive Rezeptoren als auch (markierter) Ligand benötigt. Daher bestand ein Ziel dieser Arbeit in der Etablierung einer immortalisierten Zelllinie, welche jeweils einen der Rezeptoren des Chemokins CXCL8, CXCR1 und CXCR2, stabil exprimiert. Die Durchführung von Bindungsversuchen sollte mit Membranpräparationen erfolgen, was eine transiente Expression der Rezeptoren aufgrund der benötigten Menge an vitalen Zellen ausschließt. Des Weiteren sollte zur Analyse der selektierten Zellklone ein Aktivitätsassay etabliert werden. Ein weiteres Ziel bestand in der spezifischen Konjugation einer Mutante des Liganden, CXCL8S72C, mit verschiedenen maleimid-funktionalisierten Fluorophoren. Letztlich sollten die erhaltenen Komponenten hinsichtlich ihrer Eignung in Fluoreszenzanisotropiemessungen verglichen und in ersten Versuchen zum Aufbau eines hierauf basierenden Assays zusammengefügt werden.

5.1 Nachweis der Rezeptorexpression

5.1.1 Transfektion und Charakterisierung von HEK293-Zellen zur Expression von CXCR1 und CXCR2

Zur Etablierung von immortalisierten Zelllinien, die entweder humanen CXCR1 oder humanen CXCR2 stabil exprimieren, werden Wildtypzellen der adhärenen Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney*) mit Expressionsvektoren transfiziert, welche die - für die genannten Rezeptoren codierende - cDNA tragen. Die Amplifikation der zur Transfektion eingesetzten, kommerziell erworbenen Plasmide (pcDNA3.1(+)/CXCR1 und /CXCR2) erfolgte in bakteriellen Zellen, weshalb das Plasmid eine zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterienkolonien benötigte Sequenz, hier jene der Ampicillin-Resistenz, trägt. Zudem besitzen die hier verwendeten Plasmide den Cytomegalovirus (CMV) Promotor zur Proteinexpression in Säugerzellen und das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen. Durch Letzteres wurde die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen durch Zugabe des zur Gruppe der Aminoglykoside gehörenden Antibiotikums Geneticin (G418) möglich. G418 wirkt durch eine Hemmung der Polypeptidsynthese sowohl auf Prokaryoten als auch Eukaryoten zytostatisch.^{[178][179]} Das genannte Resistenzgen führt zur Synthese des Enzyms Aminoglykosid-Phosphotransferase (APT), durch welche das Antibiotikum phosphoryliert wird, was zu einem Verlust der Wirkung führt.^{[180][178]}

Um die zur Transfektion benötigten Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden *E. coli* DH5 α mit pcDNA3.1(+)/CXCR1, pcDNA3.1(+)/CXCR2 oder dem Leervektor pcDNA3.1(+) transformiert. Die präparierten Plasmide wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und die Konzentration durch Messung der Absorption bestimmt. Die Konzentration des Plasmids pcDNA3.1(+)/CXCR1 betrug 247 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und der Quotient der Absorptionen 1,6 (260/280 nm). Die Konzentration von pcDNA3.1(+)/CXCR2 wurde mit 210 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und einer Reinheit von 1,97 (260/280 nm) bestimmt und jene des Leervektors pcDNA3.1(+) mit 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und einem Quotienten von 1,93. Als adhärenente Zelllinie wurden HEK293-Zellen gewählt, welche als Kryokonserven zur eigenen Kultivierung freundlicherweise vom Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Koch-Brandt (Institut für Biochemie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz) zur Verfügung gestellt

wurden. Bezüglich der zur Selektion benötigten, optimalen Konzentration an G418 sind in der Literatur für diese Zelllinie unterschiedliche Konzentrationen (400-800 µg/mL) zu finden.^{[181][182][183][184]} Zur Auswahl einer zur Selektion geeigneten Konzentration und, um die Wirkung des Antibiotikums auf die hier zu transfizierenden Zellen sicherzustellen, welche durch das Vorhandensein von P-Glykoproteinen und anderen, das Antibiotikum aus der Zelle befördernden, Efflux-Transportern (*multidrug-resistance protein*) in der Plasmamembran gestört werden könnte, wurden verschiedene Konzentrationen an G418 bezüglich der Wirkung auf HEK293-Zellen verglichen. Hierzu wurde eine konfluente Zellpopulation 1:4 gesplittet und in Doppelbestimmung bei Antibiotikakonzentrationen von 500, 600, 800, 900 und 1000 µg/mL sowie ohne Zusatz von G418 als Kontrolle kultiviert und die Vitalität und Proliferation der Zellen täglich visuell unter dem Mikroskop verglichen. Nach Angabe der Firma Applichem teilen sich Zellen in Anwesenheit einer letalen Dosis an G418 noch ein bis zweimal. Für HEK-Zellen sind unterschiedliche Verdopplungszeiten im Bereich von ein bis zwei Tagen bekannt (Celeromics: 48 Stunden (<http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/Hek%20293%20cells.php>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 14:11), Thermo Scientific: etwa 28 Stunden (https://extranet.fisher.co.uk/webfiles/fr/Pjointes/Documentation/NUN042_EN%20CCG_BioLite_Brochure_EuropeEng1010LR.pdf, zuletzt aufgerufen: 12.01.2016, 14:17), ATCC: Suspensionszelllinie HEK-293.2sus (ATCC®CRL-1573.3): etwa 34 Stunden (http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.3.aspx?geo_country=de#specifications, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 14:24)), sodass erste Anzeichen der Wirkung des Antibiotikums nach etwa drei bis vier Tagen erwartet wurden. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nahm die Zelldichte nach dreitägiger Inkubation mit steigender Konzentration des Antibiotikums ab. Zudem waren bei den höchsten Konzentrationen, wie zu erwarten, überwiegend abgelöste, kugelförmige Zellen zu beobachten. Da die Wirkung des Antibiotikums bei den in der Literatur angegebenen Konzentrationen somit bestätigt wurde, wurde zur Transfektion und anschließender Selektion die gängige G418-Konzentration von 700 µg/mL gewählt. Zur Etablierung dieser Methode im Arbeitskreis wurde die Transfektion mit verschiedenen Transfektionsreagenzien durchgeführt. Lipofectamin®LTX wurde nach Herstellerangaben in verschiedenen Konzentrationen getestet (1-5 µL je Transfektionsansatz), zeigte jedoch in allen Fällen eine hohe Toxizität. Die Transfektionsreagenzien ScreenFect und TurboFect ergaben dagegen ähnliche Resultate bezüglich der Zellviabilität bei Kultivierung in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums und wurden zur Transfektion weiterverwendet. Eine Erhöhung der Plasmid-DNA-Menge von den empfohlenen und üblichen 2 µg auf 4 µg und 5 µg je 6-Well-kavität zeigte nahezu keinen Unterschied bezüglich der Zellviabilität nach Transfektion in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums, sodass angenommen wurde, dass die Transfektion bereits bei dieser geringsten Menge erfolgreich war und die Menge von 2 µg je 6-Well-Kavität beibehalten wurde.

Zur Bestätigung der Transfektion im Allgemeinen wurde ein Western Blot der transienten Expression exemplarisch gegen CXCR2 durchgeführt, welcher im Zuge dieser Arbeit im Arbeitskreis unter Verwendung von Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpern etabliert wurde (Abbildung 5.1). Hierzu wurden konfluent bewachsene Kavitäten einer 6-Wellplatte zwei Tage nach Transfektion lysiert. Demnach handelt es sich hierbei um eine Expression basierend auf epichromosomalen Expressionsplasmiden. CXCR1 besteht laut Proteindatenbank aus 350 Aminosäuren und ist an zwei Stellen N-glykosyliert, CXCR2 ist aus 360 Aminosäuren aufgebaut, wobei eine N-Glykosylierung angegeben wird (<http://www.uniprot.org/uniprot/P25024>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 16:13; <http://www.uniprot.org/uniprot/P25025>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016,

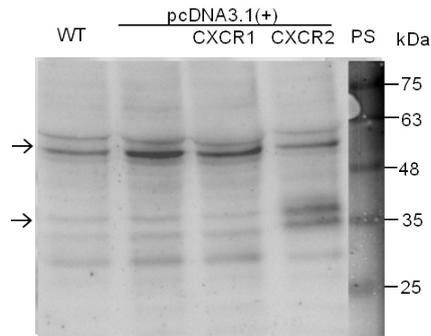


Abbildung 5.1: **Western Blot-Analyse der transienten Expression von CXCR2 in HEK293, welche mit pcDNA3.1(+)/CXCR1 und /CXCR2 sowie dem Leervektor transfiziert wurden.** Denaturierende 10 %ige SDS-PAGE, aufgetragene Proteinmenge 47 µg je Probe, Primärantikörper: IL8RB (5E8) sc-32780 mouse-IgG1 [Santa Cruz Biotechnologies], 400 ng/mL; Sekundärantikörper: goat anti- mouse IgG-HRP sc-2005 [Santa Cruz Biotechnologies], 200 ng/mL, WT: Wildtypzellen HEK293. Neben der chemolumineszenten Aufnahme der Proteinbanden ist der im Weißlicht aufgenommene Proteinstandard (PS) zu sehen. Durch exakte Überlagerung der beiden, in verschiedenen Modi erhaltenen Aufnahmen wurde der Proteinstandard auf der jeweiligen Membran mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop abgebildet. Die Pfeile kennzeichnen die relevanten Proteinbanden.

16:19). Die Größe der beiden Rezeptoren beträgt ca. 40 kDa (vgl. Missouri S & T cDNA Resource Center: CXCR1: 39,8 kDa; CXCR2: 40,8 kDa und Angaben der Proteindatenbank: CXCR1: 39,791 kDa, <http://www.uniprot.org/uniprot/P25024>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 16:13 und CXCR2: 40,759 kDa, <http://www.uniprot.org/uniprot/P25025>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 16:19), wobei hierzu aufgrund einer Homo- und Heterodimerisierung sowie Oligomerisierung unterschiedliche Angaben in der Literatur zu finden sind.^{[56] [55]} So ist nach dem Antikörperhersteller Abcam für CXCR1 ein Molekulargewicht von 40 kDa angegeben (Datenblatt, <http://www.abcam.com/cxcr1-antibody-501-ab60254.html>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 14:52), während sowohl Santa Cruz Biotechnologies (<http://datasheets.scbt.com/sc-989.pdf>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 14:59) als auch Biologend (<http://www.biologend.com/pe-anti-human-cd181-cxcr1-antibody-3002.html>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 15:04) eine erwartete Größe von 70 kDa bzw. 67 - 70 kDa nennen. Für CXCR2 sind bei der Western Blot-Analyse Größen von 40,8 kDa (mit einer spezifischen Bande bei 39,6 kDa (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sab1406027?lang=en®ion=US>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 15:19)), 45 kDa (Santa Cruz Biotechnologies, <http://datasheets.scbt.com/sc-32780.pdf>, zuletzt aufgerufen: 12.03.2016, 15:07) und 67 - 70 kDa (Biologend, <http://www.biologend.com/pe-anti-human-cd182-cxcr2-antibody-3009.html>, zuletzt aufgerufen 12.03.2016, 15:05) angegeben. Beim Vergleich der unterschiedlich transfizierten Zellen wird die Expression des CXCR2 als Doppelbande oberhalb der 35 kDa-Bande des Proteinstandards nicht nur bei den mit pcDNA3.1(+) transfizierten sondern mit einer viel schwächeren Signalstärke bei allen Zelllysaten sichtbar. Zusätzlich ist eine weitere Doppelbande unterhalb der 63 kDa-Bande zu sehen, welche im Fall der mit pcDNA3.1(+) und pcDNA3.1(+)/CXCR1 transfizierten Zellen am deutlichsten ist und somit keinen Nachweis der Transfektion darstellt. Dieser Blot zeigt zudem durch die bei Wildtypzellen ebenfalls auftretenden Signale, dass der Antikörper Kreuzreaktionen zu endogenen Proteinen aufweist. Alternativ könnten diese schwachen Banden als endogene Expression des Rezeptors in HEK293-Zellen interpretiert werden, wodurch

die Transfektion lediglich zu einer verstärkten Expression und somit einer intensiveren 35 kDa-Bande geführt hätte. Die Tatsache, dass nur schwache Banden detektiert wurden, verdeutlicht die Problematik des Nachweises von Membranproteinen mittels Western Blot. Sowohl die Proteinexpression, ersichtlich durch die im Vergleich zu den Lysaten der Kontrollzellen deutlich stärkere Bande oberhalb des 35 kDa-Standards, als auch die Zellviabilität in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums deuteten auf eine erfolgreiche Transfektion hin, sodass die folgenden Transfektionen - mit pcDNA3.1(+)/CXCR1 oder pcDNA3.1(+)/CXCR2 - stabil durchgeführt wurden. Nach Normalisierung der Zellproliferation in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums wurden von den jeweils einen der Rezeptoren exprimierenden Mischkulturen Einzelklone selektiert. Nach Erreichen stabiler Zellpopulationen erfolgte der Nachweis der Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse, wobei die jeweils mit einem der Rezeptoren transfizierten Einzelklone mit dem entsprechenden Antikörper zu sehen sind (Abbildung 5.2). Die Western Blots der CXCR2-transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu jenen der CXCR1-transfizierten Zellen weniger deutliche Ergebnisse nach der Behandlung mit dem gegen CXCR2 gerichteten Antikörper. Trotz des hohen Hintergrunds wurde eine stärkere Doppelbande unterhalb der 63 kDa Bande detektiert. In einem zweiten Blot mit weiteren Einzelklonen ist dieses Signal bei allen Lysatproben leicht nach oben in Höhe der 75 kDa verschoben. Der verwendete monoklonale Antikörper gegen CXCR2 der Firma Biologend ist vorwiegend für durchflusszytometrische und mikroskopische Methoden vorgesehen, was in einer schlechteren Bindung an das Epitop resultieren kann, falls keine vollständige Renaturierung der Proteine nach der SDS-PAGE stattfindet. Um diese Problematik bei den pcDNA3.1(+)/CXCR1 transfizierten Zellen zu vermeiden, wurden die folgenden Analysen dieser Einzelklone zusätzlich mit einem polyklonalen Primärantikörper durchgeführt, welcher durch die Erkennung mehrerer Epitope zu einer Signalverstärkung führen kann, allerdings auch einen höheren Hintergrund aufweist. Bei Detektion der Proteinbanden mit dem monoklonalen Antikörper gegen CXCR1 der Firma Biologend wurde sowohl eine deutliche Doppelbande auf Höhe der 63 kDa-Bande des Proteinstandards als auch ein Signal bei etwa 40 kDa sichtbar. Im Fall des polyklonalen Antikörpers konnte zusätzlich zur Bande bei etwa 40 kDa ein weiteres Signal zwischen 48 kDa und 63 kDa detektiert werden. Bei allen lysierten Einzelklonen, sowohl bei den CXCR1- als auch CXCR2-transfizierten Zellen, konnten der Größe der Rezeptoren entsprechende Banden detektiert werden. Die Anwendung in weiteren Experimenten wurde auf eine Auswahl dieser Einzelklone beschränkt, wobei der höheren Signalstärke entsprechend im Folgenden mit den Einzelklonen HEK293/CXCR1-A7, -C11 und -B8 sowie HEK293/CXCR2-IIH8 weitergearbeitet (in Abbildung 5.2 markiert) wurde. Die weiteren in Abbildung 5.2 markierten Klone stellen jene Zellklone dar, welche alternativ in Zukunft vielversprechende Kandidaten darstellen könnten.

Da beide verwendeten Antikörper gegen CXCR1 vergleichbare Ergebnisse lieferten, wurde die Transfektion vorerst als erfolgreich bewertet. In Kombination mit Abbildung 5.1 ist jedoch ersichtlich, dass durch diese Methode keine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich der Stärke der Rezeptorexpression gezogen werden konnte. Zur weiteren Western-Blot-Analyse wurden Lysate einer Auswahl der genannten CXCR1-Einzelklone mit jenen weiterer Kontrollzellen verglichen (Abbildung 5.3). CHO-Zellen¹, welche im Calcium-Assay nicht durch CXCL8 zu stimulieren sind (vgl. 5.11), sollten als Negativkontrolle dienen. Als Positivkontrolle wurden neben neutrophilen Granulozyten (NG), welche beide Rezeptoren endogen

¹ vom Arbeitskreis von Herr Prof. Dr. Kolmar, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, zur Verfügung gestellt

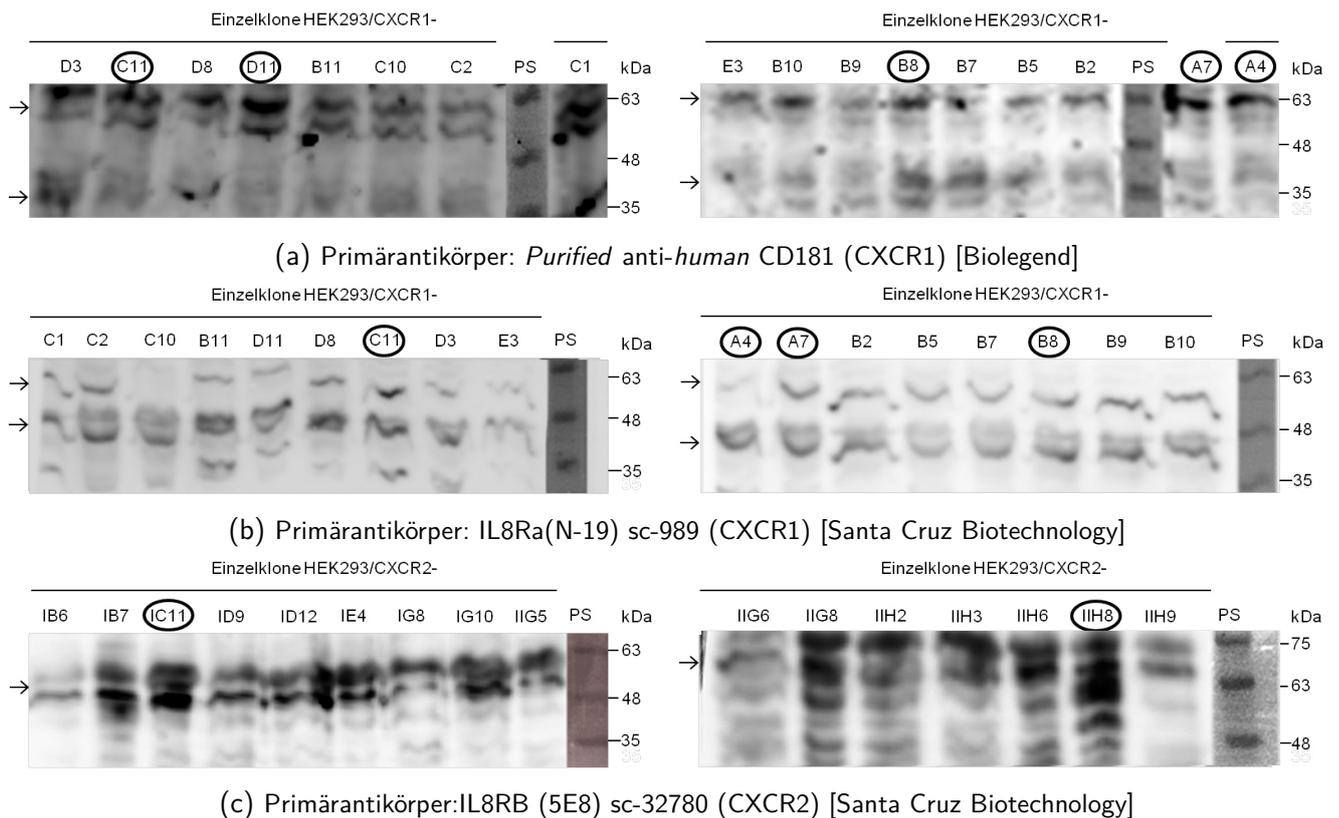


Abbildung 5.2: **Western Blot Analyse der Zelllysate verschiedener Einzelklone von HEK293/CXCR1 und CXCR2.** Denaturierende 10 %ige SDS-PAGE, aufgetragene Proteinmenge a), b): etwa 60 μg je Probe, c) 35 μg , a) *Purified anti-human CD181 (CXCR1)* [Biolegend] 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b) (IL8Ra(N-19) Sc989 [Santa Cruz Biotechnology] etwa 70 ng/mL , c) IL8RB (5E8) sc-32780 [Santa Cruz Biotechnology] 400 ng/mL , Sekundärantikörper: Anti-mouse HRP [Carl Roth GmbH], 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Die chemolumineszente Aufnahme der Proteinbanden wurde mit jener des Proteinstandards (PS) im Weißlicht mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop überlagert. Die Pfeile kennzeichnen jene Proteinbanden, welche auf die Rezeptoren zurückgeführt wurden, wohingegen die eingekreisten Einzelklone (z. B.: HEK293/CXCR1-C11, HEK293/CXCR2-IIH8) aufgrund intensiverer Signale und somit scheinbar starker Expression markiert wurden.

exprimieren, und mit EGFP-CXCR1-transfizierten HEK293, welche hierfür vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Jean-Luc Galzi, Ph.D.,² zur Verfügung gestellt wurden, auch Zelllysate der Epithelzelllinie HT29³ verwendet, in welchen die Expression von CXCR1 von Sturm *et al.* mittels RT-PCR und FACS-Analysen nachgewiesen worden war.^{[51] [48]} Die Western Blot-Analyse dieser Lysate konnte die Expression von CXCR1 weder bestätigen noch widerlegen. Trotz der Durchführung verschiedener, auf Granulozyten abgestimmter Lyseprotokolle und Durchführung einer TCA-Präzipitation zur Erhöhung der Proteinmenge, konnten mit keinem der verwendeten Antikörper spezifische Banden bei Lysaten aus neutrophilen Granulozyten detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Problematik ist vermutlich auf die hohen Proteinmengen in den Granula zurückzuführen, was sowohl die Zellyse als auch den spezifischen Nachweis der Proteine zu erschweren scheint. Zusätzlich exprimieren diese Immunzellen gegen den Fc-Teil von Antikörpern gerichtete

² Forschungszentrum der ESBS, Universität Straßburg/Frankreich

³ vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Kolmar, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, zur Verfügung gestellt

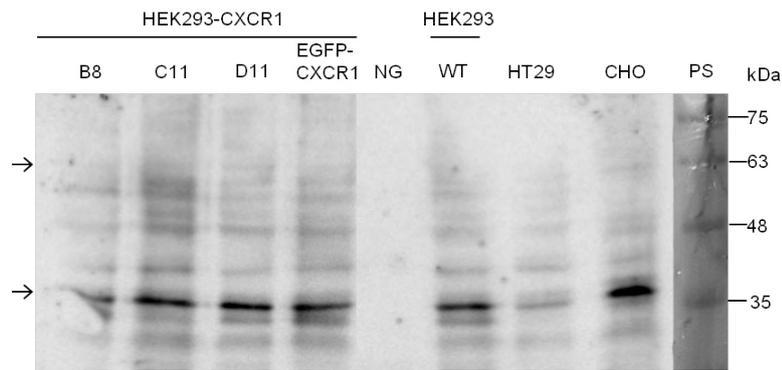


Abbildung 5.3: **Western Blot-Analyse verschiedener Zelllinien zum Nachweis der Proteinexpression von CXCR1.** Denaturierende 10 %ige SDS-PAGE, aufgetragene Proteinmenge 36 μg , Primärantikörper: Anti-CXCR1 Antikörper ([501] ab60254 [Abcam]), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sekundärantikörper: Anti-mouse HRP [Carl Roth GmbH], 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, WT: Wildtypzellen HEK293, NG: neutrophile Granulozyten. Die chemolumineszente Aufnahme der Proteinbanden wurde mit jener des Proteinstandards (PS) im Weißlicht mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop überlagert. Die Pfeile kennzeichnen jene Bereiche, in welchen bei vorherigen Western Blots entsprechend der Monomer- und Dimerbanden Proteinbanden zu erwarten sind.

Rezeptoren, den FC γ RII und III, welche an die konstante Region von Immunglobulinen binden.^[185] Ebenso konnte die erwartete Expression des CXCR1 in HT29-Lysaten nicht eindeutig nachgewiesen werden.^[51] Des weiteren eigneten sich CHO-Zellen nicht als Positivkontrolle, da hier eine, sogar intensivere, Bande in Höhe der erwarteten Rezeptorbande (etwa 35 kDa) detektiert werden konnte. Diese erscheint im Vergleich zu den Proteinbanden der anderen Zellysate zu größeren Molekulargewichten verschoben, was sich jedoch bei Betrachtung der nicht geraden Lauffront relativieren könnte. Stattdessen ist bei allen HEK293-Zellen, einschließlich der Wildtypzellen, sowie jener, die das Fusionsprotein EGFP-CXCR1 exprimieren, oberhalb der 35 kDa-Bande des Standards ein Proteinsignal zu sehen, bei welchem es sich jedoch nicht um den gesuchten rekombinanten Rezeptor handeln konnte, da das Fusionsprotein CXCR1-EGFP ein Molekulargewicht von etwa 65 kDa besitzt. Da eine Bande dieser Größe jedoch wiederum nicht sichtbar ist, beeinflusst EGFP mit einer Größe von 27 kDa gegenüber etwa 40 kDa des Rezeptors vermutlich die Bindung des Antikörpers. Einzige Erklärung für das auch hier beobachtete, einheitliche Bandenmuster bei allen Zellen wäre wiederum die endogene Expression der Rezeptoren in HEK293. Zusammenfassend eignete sich die Zelllinie HEK293/CXCR1-EGFP trotz durchflusszytometrisch nachgewiesenen EGFPs nicht als Positivkontrolle im Western Blot. Aufgrund der hohen Hintergrundsignale sowie der ebenfalls bei nicht-transfizierten Zellen vorhandenen Banden konnte die rekombinante Expression der Rezeptoren mittels Western Blot nicht eindeutig nachgewiesen werden. Neben der bekannten Oligomerisierung der Rezeptoren konnten eine endogene Expression oder Kreuzreaktion der Antikörper zu anderen Proteinen nicht ausgeschlossen werden.^{[55] [56]} Aufgrund dessen wurden ausgewählte Einzelklone zur erneuten Kontrolle in einem weiteren Western Blot sowohl gegen CXCR1 als auch gegen CXCR2 und CXCR4 mit dem Wildtyp der verwendeten Zellen als Negativkontrolle untersucht, um eine Wechselwirkung der Antikörper zu diesem ausschließen zu können (vgl. Abbildung 5.4). Bei CXCR4 handelt es sich um den Rezeptor des Chemokins CXCL12, dessen endogene Expression in HEK293 publiziert wurde.^[186] Wie deutlich zu sehen ist, zeigten die Lysate nicht-transfizierter HEK293 mit allen Antikörpern ein ähnliches Bandenmuster wie Lysate der transfizierten Zellen. Die Oli-

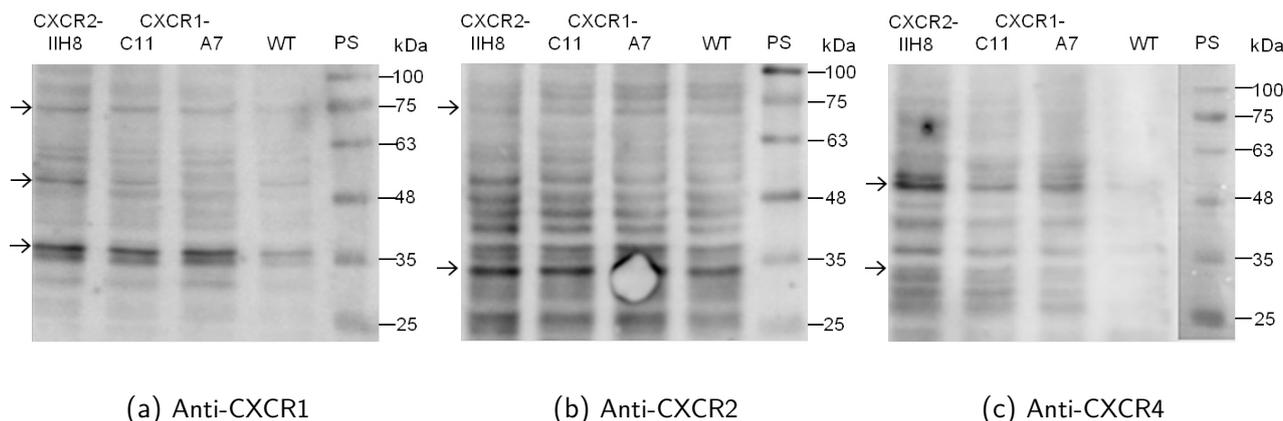


Abbildung 5.4: **Western Blot-Analyse der Lysate transfizierter Einzelklone, HEK293/CXCR1 und CXCR2, sowie der entsprechenden Wildtypzellen, HEK293 mit Antikörpern gegen CXCR1, CXCR2 und CXCR4.** Denaturierende, 10 %ige SDS-PAGE, Gesamtproteinmenge je Probe: 60 µg, a) Anti-CXCR1 ([501] ab60254 [Abcam]), 1 µg/mL, b) IL8RB (5E8) sc-32780 [Santa Cruz Biotechnologies] 25 ng/mL, c) Anti-CXCR4 *antibody*, Klon 1F8 [Sigma-Adrich] 2,5 µg/mL, Sekundäntikörper: *Anti-mouse* HRP [Carl Roth GmbH] 1 µg/mL. Die chemolumineszente Aufnahme der Proteinbanden wurde mit jener des Proteinstandards (PS) im Weißlicht mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop überlagert. Die Pfeile kennzeichnen die intensivsten und auf die Rezeptoren zurückzuführenden Proteinbanden.

gomerisierung dieses Rezeptors mit CXCR1 sowie Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper stellten eine mögliche Erklärung für die Ähnlichkeiten der Bandenmuster bei unterschiedlich transfizierten Zellkulturen dar. Bei Inkubation der Lysate mit dem gegen CXCR1 gerichteten Antikörper (Abcam) ist bei allen Einzelklonen und weniger intensiv bei den Wildtypzellen etwas über 35 kDa eine deutliche Bande zu erkennen, welche der Rezeptorgröße von etwa 40 kDa entspricht. Eine zweite Proteinbande ist bei 75 kDa schwach zu erkennen und auch eine dritte, deutlichere Bande konnte hier ebenfalls, jedoch in weitaus geringerem Ausmaß wie bereits in den Abbildungen 5.2 und 5.1 beobachtet, in Höhe der 48 kDa Bande des Standards detektiert werden. Der gegen CXCR2 gerichtete Antikörper zeigt, wie bereits in Abbildung 5.2 zu sehen, mehrere Banden im Bereich von 35 kDa bis 48 kDa, jedoch mit einer intensiven Bande unterhalb von 35 kDa. Bei Verwendung des Antikörpers gegen CXCR4 können neben einer markanten Bande oberhalb von 48 kDa weitere, schwache Banden um 35 kDa beobachtet werden. Im Fall der Wildtypzellen deutet die schwache Intensität der gesamten Spur auf eine ungleichmäßige Benetzung der PVDF-Membran mit Antikörperlösung hin. Die scheinbar geringere Bandenintensität der CXCR1-transfizierten Zellen im Vergleich zu HEK293/CXCR2-IIH8 entspricht dieser Vermutung.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Western Blot-Analyse der Zellysate zwei Schlussfolgerungen zu: Handelt es sich bei den reproduzierbar detektierten Banden um die Rezeptoren, muss von einer endogenen Expression von CXCR1 und CXCR2 in HEK293 ausgegangen werden, da die Lysate der transfizierten Einzelklone im Western Blot das gleiche Bandenmuster wie die Wildtypzellen aufweisen. Ist eine solche endogene Expression auszuschließen, würde es sich dagegen bei allen Proteinbanden um Kreuzreaktionen zu endogenen Proteinen handeln, womit keiner der Rezeptoren nachgewiesen wäre.

Da bei Western Blot-Analysen von Lysaten alle Proteine einer Zelle detektiert werden, in dieser Arbeit jedoch nur Membranproteine relevant sind, wurde sowohl ein Protokoll (nach Bai *et al.*) zur Präparation von

HEK293-Zellysaten zur Extraktion von GPCRs als auch verschiedene Methoden zur Präparation von Plasmamembranen getestet, wobei die Detektion der Rezeptoren in einer solchen Membranpräparation durch ihre Anreicherung gegenüber zytosolischen Proteinen verbessert werden sollte.^[187] Insgesamt wurden fünf verschiedene Methoden im Western Blot verglichen, welche sich hauptsächlich bezüglich des Puffers sowie den hierfür gängigen Pufferzusätzen unterschieden. Tabelle 5.1 zeigt hierzu eine Übersicht. Lediglich bei der

Tabelle 5.1: Verschiedene Protokolle zur Durchführung von Membranpräparationen und Lysaten zum Nachweis der Rezeptoren im Western-Blot.

Pufferbestandteile	Literatur
20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 6 mM MgCl ₂	[188]
10 mM TRIS, 0,1 mM EDTA	[56]
150 mM NaCl, 0,5 % Nonidet P-40, 10 mM TRIS, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 100 mM Iodacetamid	[187]
50 mM TRIS-HCl, Proteaseinhibitor-Cocktail	[124]
50 mM TRIS, 5 mM MgCl ₂	[174]

in Anlehnung an Lee und Devis sowie Harris *et al.* durchgeführten Plasmamembranpräparation konnten detektierbare Banden im Western Blot erhalten werden.^{[124][174]} Da der bei diesem Protokoll verwendete Potter-Elvehjem-Homogenisator noch nicht zur Verfügung stand⁴, wurden die zuvor genannten Präparationen manuell homogenisiert, was unter Umständen den Erfolg der Durchführungen - beispielsweise aufgrund eines unzureichenden Aufschlusses - negativ beeinflusste und eine Erklärung für nicht detektierbare Proteinbanden im Western Blot darstellt (Ergebnis nicht gezeigt). Neben der Präparation der Plasmamembran wurde eine Solubilisierung der Rezeptoren durchgeführt, bei welcher die Phasentrennung von Triton-X-114 oberhalb des Cloudpoint der Separation von integralen Membranproteinen und löslichen Proteinen dient. Bei dieser Präparationsmethode konnte die Monomerbande des CXCR1 oberhalb des 35 kDa-Standards mit schwacher Intensität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).^[189] Im Hinblick auf die Durchführung von Bindungsversuchen wurde diese Rezeptorsolubilisierung jedoch nicht weiter optimiert, sondern die erfolgreiche Methode zur Durchführung einer Membranpräparation (20 Hübe einer Zellsuspension in 50 mM TRIS-Puffer mit 0,0005 % Tween mit genanntem Homogenisator) weiter verfolgt (vgl. Methoden: 4.4.7). Abbildung 5.5a zeigt den Western Blot der so erhaltenen Membranpräparation mit einem Anti-CXCR4 Antikörper. Es sind schwache Signale zwischen 25 kDa und 35 kDa und bei etwa 40 kDa sowie eine deutliche Bande unterhalb des 63 kDa-Standards zu sehen. Letztere Bande findet sich neben einer zweiten, etwa gleich intensiven Bande bei etwa 40 kDa auch im Western Blot mit dem gegen CXCR1 gerichteten Antikörper (Abbildung 5.5b). Diese Ergebnisse weisen auf eine Heterodimerisierung des Rezeptors CXCR1 mit CXCR4 hin. Bei Inkubation mit dem gegen CXCR1 gerichteten Antikörper der Firma Abcam ist die Zahl von Kreuzreaktionen im Vergleich zu jenem der anderen gegen diesen Rezeptor gerichteten Antikörper (Biolegend, Santa Cruz Biotechnologies) deutlich geringer, sodass dieser Antikörper, mit welchem zudem eine bessere Reproduzierbarkeit erzielt werden konnte, in weiteren Experimenten genutzt wurde (vgl. 5.1,

⁴ freundlicherweise zur Durchführung von Membranpräparationen vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Dencher zur Verfügung gestellt

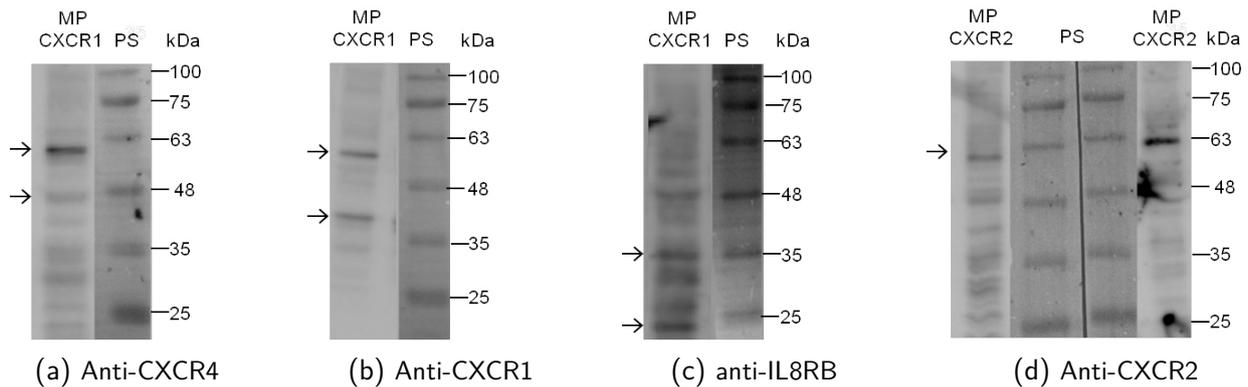


Abbildung 5.5: **Western Blot-Analyse der Membranpräparation HEK293/CXCR1-C11 gegen CXCR1, CXCR2 und CXCR4 sowie HEK293/CXCR2-IIH8 gegen CXCR2** verwendete Primärantikörper a) Anti-CXCR4 *antibody*, Klon 1F8b [Sigma-Aldrich], 2,5 µg/mL, b) Anti-CXCR1 Antikörper ([501] ab60254 [Abcam]) 1 µg/mL, c) anti-IL8RB (5E8) sc-32780 [Santa Cruz Biotechnology] 25 ng/mL d) CXCR2 [Sigma-Aldrich] 1 µg/mL, Sekundärantikörper: Anti-*mouse* HRP [Carl Roth GmbH], 1 µg/mL, denaturierende, 10%ige SDS-PAGE, Gesamtproteinmenge je Probe: 60 µg. d) zeigt eine Membranpräparation unter zwei verschiedenen Blockinglösungen (d links und a - c: Milchmix (zum Verzehr geeignetes Magermilchpulver mit Magermilchpulver [Carl Roth] 1:1), rechts: reines Magermilchpulver [Carl-Roth]). Die chemolumineszente Aufnahme der Proteinbanden wurde mit jener des Proteinstandards (PS) im Weißlicht mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop überlagert.

5.2 und 5.4). Bei der Detektion mit dem gegen CXCR2 gerichteten Antikörper in Abbildung 5.5c sind schwache Banden in Höhe des 48 kDa-Standards und mehrere Banden unterhalb des 35 kDa-Standards sichtbar. Allgemein sind die Banden in diesem Blot in einem Bereich unterhalb der Größe des Monomers, sodass bei den beiden intensiveren Banden bei 35 kDa und 25 kDa von unspezifischen Wechselwirkungen ausgegangen wurde. Abbildung 5.5d zeigt die Membranpräparation von HEK293/CXCR2-IIH8 mit dem zugehörigen Antikörper (Sigma-Aldrich). Dieser zeigt nur eine deutliche Bande unterhalb der 63 kDa-Bande des Standards sowie eine Vielzahl schwacher Banden mit geringerem Molekulargewicht (links).

Allgemein ist die Zahl detektierter Banden aller Western Blots mit Membranpräparationen bei identischer Durchführung geringer als bei der Analyse von Zellysaten, allerdings sind noch immer unspezifische Proteinbanden sichtbar, sodass die Blockingmethode zur Reduktion dieser Kreuzreaktionen variiert wurde und neben Magermilchpulver verschiedener Herkunft (verzehrbares Lebensmittel gegen jenes speziell zur Anwendung im Labor) auch BSA zum Blocken unspezifischer Wechselwirkungen in Betracht gezogen wurde. Dabei zeigte eine 5%ige Lösung von BSA in TBS-T keine Vorteile gegenüber Milchpulver der Firma Carl-Roth. Eine weitere Möglichkeit, das Blocken unspezifischer Wechselwirkungen durch Trocknen der Membran für eine Stunde bei 37°C im Anschluss an das Blotting nach Angaben des Herstellers Carl-Roth, reduzierte die Zahl unspezifischer Wechselwirkungen deutlich, eignete sich jedoch nicht für geringe Proteinmengen, wie sie im Fall des Nachweises von Membranproteinen zur Verfügung stehen. Im Vergleich der Inkubation eines Western-Blots der Membranpräparation HEK293/CXCR2-IIH8 mit 5%igem Magermilchpulver der Firma Carl-Roth in PBS-T mit einer ebenfalls 5%igen 1:1-Mischung aus kommerziell erhältlichen, verzehrbaren Magermilchpulver aus der Lebensmittelindustrie und ersterem, zeigte das reine Magermilchpulver (Carl Roth) deutlich weniger unspezifische Banden (vgl. Abbildung 5.5d), weshalb letzt-

lich 5 %iges Milchpulver der Firma Carl-Roth in PBS-T verwendet wurde. Anhand dieses Blots mit nahezu keiner unspezifischen Wechselwirkung des Antikörpers wird zudem klar, dass die Proteinbande unterhalb des 63 ka-Standards auf CXCR2 zurückzuführen ist.

Zur vollständigen Bestätigung der Rezeptorexpression in den transfizierten Zellen wurden ausgewählte Einzelklone, HEK293/CXCR1-C11, HEK293/CXCR1-A7 und HEK293/CXCR2-IIH8, mit fluoreszent markierten Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht (vgl. auch die Bachelorarbeit von Lisa Ilkhani, welche diese Ergebnisse im Rahmen ihrer Arbeit optimiert und reproduziert hat).^[190] Zum Einen wurde hierbei zur Detektion des CXCR1 der bereits im Western Blot eingesetzte Primärantikörper mit entsprechendem FITC-markiertem Sekundärantikörper zum anderen ein FITC-markierter Primärantikörper mit zugehöriger Isotypkontrolle eingesetzt (vgl. Abbildung 5.6 und 5.7a). Der Nachweis von CXCR2 erfolgte mit einem FITC-markierten Primärantikörper und zugehöriger Isotypkontrolle (vgl. 5.7b).

Die Inkubation der Zelllinien HEK293/CXCR1-A7 und HEK293 mit dem im Western-Blot genutzten

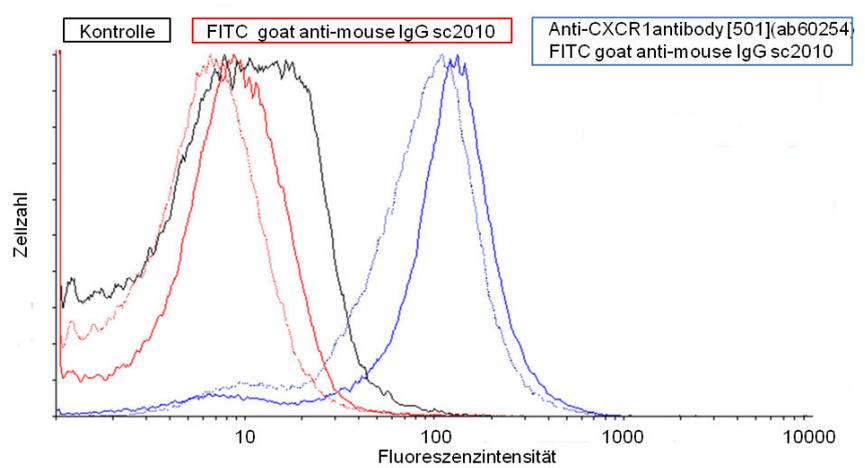
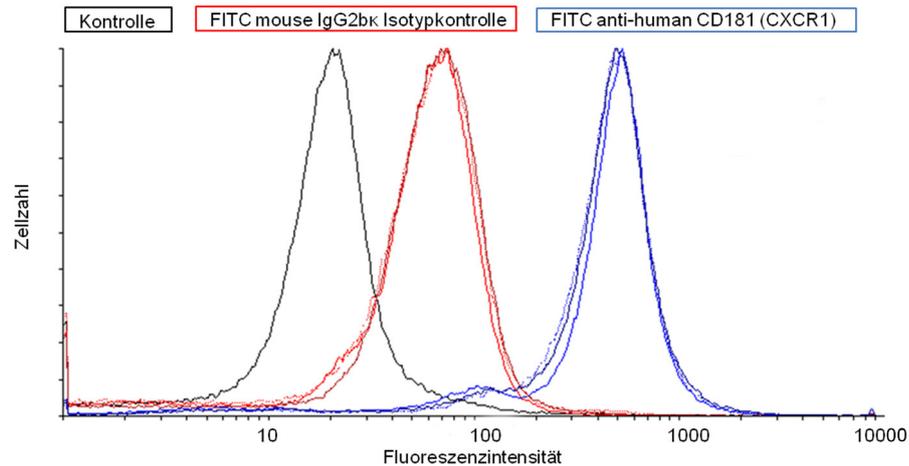
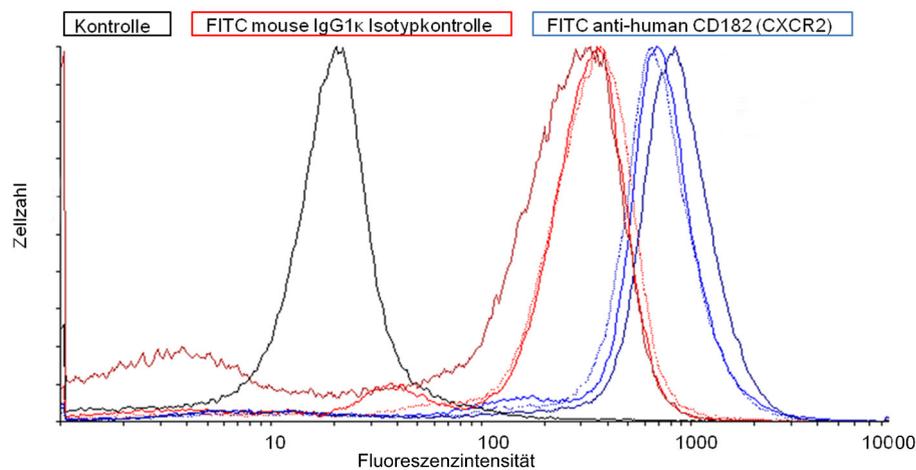


Abbildung 5.6: **Durchflusszytometrische Analyse des transfizierten Einzelklons HEK293/CXCR1-A7 und nicht-transfizierter HEK293 zum Nachweis des CXCR1.** Es wurden 100.000 Ereignisse (Zellen) jeder Probe aufgenommen und die Hauptpopulation mit Hilfe der Auswertungssoftware Flowing ausgewählt. Nach Zusammenstellen der hierbei erstellten Kurven jeder Zellprobe war eine Skalierung der Y-Achse mit dieser Software nicht mehr möglich. HEK293/CXCR1-A7 (durchgezogene Linie), HEK293,WT (gepunktet), Primärantikörper: Anti-CXCR1 Antikörper ([501] ab60254 [Abcam]), (10 µg/mL), Sekundärantikörper: FITC *goat anti-mouse*. Laser: 488,nm, Filter: 530/540 nm

Primärantikörper (Abcam) und einem fluoreszent markierten Sekundärantikörper zeigte eine geringere Fluoreszenzintensität bei den Wildtypzellen im Vergleich zu den transfizierten Zellen (vgl. Abbildung 5.6). Dieser Unterschied war jedoch ebenfalls bei der Inkubation mit dem Sekundärantikörper ohne Primärantikörper zu beobachten, weshalb er nicht als Hinweis auf eine geringfügig stärkere Expression des Rezeptors in den transfizierten Zellen gedeutet werden kann. Der Vergleich der nur mit Sekundärantikörper inkubierten Zellen mit jenen der Primär- und Sekundärantikörper enthaltenden Proben sowie der Kontrolle (unbehandelte Zellen) zeigte dagegen deutlich, dass der Sekundärantikörper keine Wechselwirkung mit der Zelloberfläche eingeht. Der Nachweis des CXCR1 mit einem fluoreszent markierten Primärantikörper entspricht den in Abbildung 5.6 dargestellten Ergebnissen (vgl. Abbildung 5.7a). Alle drei Zelllinien (Wildtyp, HEK293/CXCR1-C11, HEK293/CXCR2-IIH8) zeigten nach Inkubation mit dem gegen CXCR1



(a) Nachweis CXCR1: HEK293/CXCR1-C11 (dunkel), HEK293/CXCR2-IIH8 (hell), HEK293,WT (gestrichelt)



(b) Nachweis CXCR2: HEK293/CXCR1-C11 (dunkel), HEK293/CXCR2-IIH8 (hell), HEK293,WT (gestrichelt)

Abbildung 5.7: **Durchflusszytometrische Analyse der transfizierten Einzelklone HEK293/CXCR1-C11, -A7 und HEK293/CXCR2-IIH8 sowie nicht-transfizierter HEK293.** Es wurden 100.000 Ereignisse (Zellen) jeder Probe aufgenommen und die Hauptpopulation mit Hilfe der Auswertungssoftware Flowing ausgewählt. Nach Zusammenstellen der hierbei erstellten Kurven jeder Zellprobe war eine Skalierung der Y-Achse mit dieser Software nicht mehr möglich. IgG sc-2010 [Santa Cruz Biotechnologies] (5 µg/mL); 5.7a: HEK293/CXCR1-C11: Primärantikörper FITC anti-*human* CD181 (CXCR1) *antibody*, Isotypkontrolle: FITC *mouse*-IgG2b_κ isotype ctrl (7,5 µg/mL), [Biolegend®]); 5.7b: Primärantikörper: FITC anti-*human* CD182 (CXCR2) *antibody*, Isotypkontrolle: FITC *mouse* IgG1_κ isotype ctrl, (7,5 µg/mL), [Biolegend®]); Laser: 488 nm; Filter: 530/540 nm

gerichteten Antikörper die gleiche Fluoreszenzintensität, wobei sich diese signifikant von jener der mit der Isotypkontrolle inkubierten Zelllinien unterscheidet. Eine unspezifische Wechselwirkung des konstanten IgG-Teils (IgG2b_κ) des Antikörpers war allerdings vorhanden, was durch die im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Kontrolle (unbehandelte Zellen) höheren Fluoreszenz der Isotypkontrollen deutlich wird. Diese Ergebnisse der Inkubation der Zelllinien mit dem fluoreszent markierten Primärantikörper (FITC anti-*human* CD181 (CXCR1) [Biolegend]) konnten mit HEK293/CXCR1-A7 ebenfalls reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Da die Inkubation mit zwei verschiedenen Antikörpern die Expression des CXCR1

auf der Zelloberfläche aller Zelllinien zu bestätigen schien, wurden Kreuzreaktionen wie bereits bei der Auswertung der Western-Blot-Analyse für möglich aber unwahrscheinlich gehalten.

Der Nachweis des CXCR2 in Abbildung 5.7b führte zu den gleichen Schlussfolgerungen bezüglich der Expression des CXCR2 in allen drei getesteten Zelllinien. Auffällig ist hierbei im Unterschied zu Abbildung 5.7a, dass der konstante IgG-Teil (IgG1_κ) des Antikörpers stärker mit der Zelloberfläche wechselwirkte als IgG2b_κ des gegen CXCR1 gerichteten Antikörpers. Wie bereits in Abbildung 5.6 zu sehen, schienen sich die Zelllinien nach der Inkubation mit fluoreszent markiertem Antikörper nur geringfügig zu unterscheiden. Hierbei war für HEK293/CXCR1-C11, welcher CXCR2 nicht exprimieren sollte, jedoch die größte Fluoreszenzintensität zu sehen, wohingegen jene der Wildtypzellen jener der HEK293/CXCR2 entsprach.

Obwohl FACS (*fluorescence activated cell sorting*) eine sensitivere Methode darstellt, zeigten diese Ergebnisse ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen transfizierten und Wildtypzellen (vgl. Abbildungen 5.6 und 5.7).

Zur Bestätigung der erhaltenen Resultate sollten die immungefärbten Zellen zusätzlich im Konfokalmikroskop untersucht werden. In Abbildung 5.8 sind die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie⁵ zum Nachweis der Expression des CXCR1 dargestellt. HEK293/CXCR1-C11 zeigte eine gleichmäßige Verteilung der hohen Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation mit FITC anti-*human* CD181, während bei HEK293/CXCR1-A7 keine höhere Fluoreszenz im Vergleich zu den nicht transfizierten HEK293 und den mit pcDNA3.1(+)/CXCR2 transfizierten Zellen zu erkennen ist. Lediglich vereinzelt konnten bei sehr wenigen Zellen geringfügig höhere Fluoreszenzintensitäten detektiert werden, bei welcher es sich um Fluoreszenz aus Vesikeln handeln könnte, die möglicherweise vom Antikörper schlechter erreicht wurden. Um dies genauer zu analysieren, müssten Messungen mit verschiedenen Z-Ebenen durchgeführt werden. Unter dieser Annahme würde der Rezeptor exprimiert werden, hätte jedoch die Zelloberfläche noch nicht erreicht. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es sich bei diesen leicht höheren Signalen um Kreuzfärbungen handelt, sodass die Expression bei HEK293/CXCR1-A7 in dieser Aufnahme nicht bestätigt werden konnte. Abbildung 5.9 zeigen die entsprechenden Aufnahmen nach Inkubation mit dem gegen CXCR2 gerichteten Antikörper. HEK293/CXCR1-C11 und -A7 zeigten keine Fluoreszenzintensität im Gegensatz zu HEK293/CXCR2-IIH8, welcher stark fluoreszierte. Während der in Abbildung 5.8d durchgeführte Nachweis der Expression von CXCR1 auf HEK293/CXCR1-C11 eine relativ gleichmäßige Expression bei allen Zellen zeigte, sind die in Abbildung 5.9d bezüglich CXCR2 positiven HEK2937/CXCR2-IIH8 hinsichtlich der Intensität ungleichmäßiger gefärbt. Die im Vergleich intensiver fluoreszierenden Zellen deuteten auf eine Überexpression des CXCR2 hin, sodass diese Zelllinie trotz der durchgeführten Einzelklonselektion keine gleichmäßige Expression des CXCR2 aufweist. Die bei HEK293 und HEK293/CXCR1 leicht höhere Hintergrundfluoreszenz sowie die stärkere Fluoreszenzintensität der HEK293/CXCR2-IIH8 im Vergleich zu HEK394/CXCR1-C11 beim Nachweis des CXCR1 ist auf die doppelt so hoch eingesetzte Antikörperkonzentration des FITC anti-*human* CD182 im Vergleich zum FITC anti-*human* CD181 zurückzuführen (vgl. Abbildung 5.8d). Die Hintergrundfluoreszenz war bei transfizierten Zellen nach Inkubation mit dem jeweils entgegengesetzten Antikörper nur geringfügig höher im Vergleich zu den jeweiligen Aufnahmen der Wildtypzellen. Demnach können Kreuzreaktionen der Antikörper zum jeweils anderen Rezeptor weitestgehend

⁵ durchgeführt von Sarah Albrecht in Kooperation mit dem Arbeitskreis von PD. Dr. Meckel, *Membrane Dynamics* Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt

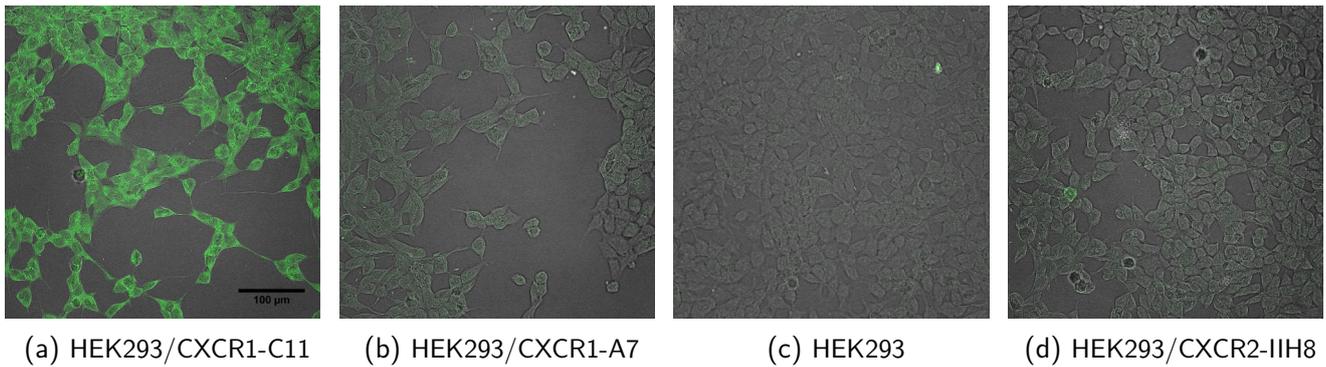


Abbildung 5.8: **Analyse der CXCR1-Expression in verschiedenen HEK293-Zelllinien mittels konfokaler Mikroskopie.** Es ist eine Überlagerung des Fluoreszenzkanals mit den invertierten Durchlichtbildern zu sehen. FITC anti-*human* CD181 [Biolegend], 0,5 µg/mL; Exzitationswellenlänge: 488 nm, Emissionswellenlänge: 520 nm; Laserleistung: 80 %, AOTF output power: 27,8 %, PMT Gain: 50 V (bei den Durchlichtaufnahmen: 200 V), Offset: 50; Objektiv: HCX PL APO CS, 40x oil, NA= 1.3; Mikroskop: Leica TCS SP5

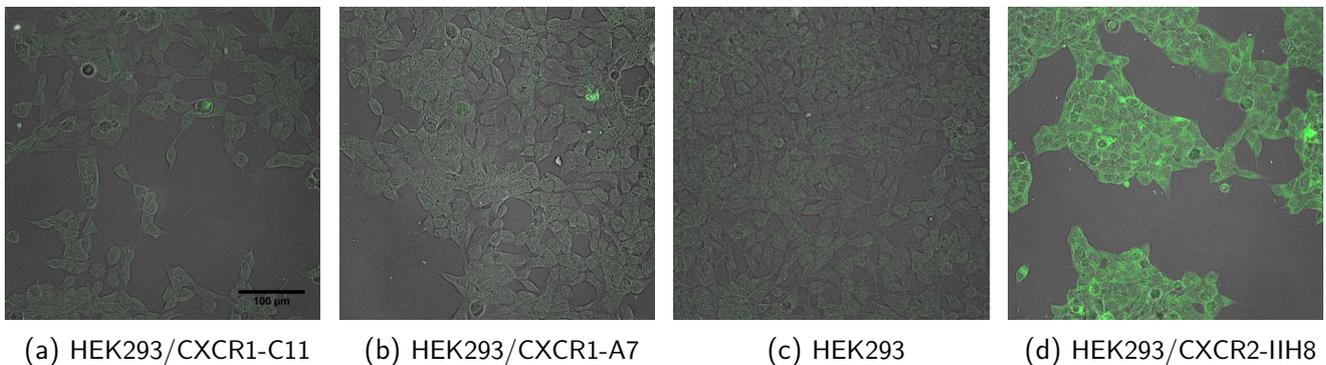


Abbildung 5.9: **Analyse der CXCR2-Expression in verschiedenen HEK293-Zelllinien mittels konfokaler Mikroskopie.** Es ist eine Überlagerung des Fluoreszenzkanals mit den invertierten Durchlichtbildern zu sehen. FITC anti-*human* CD182 [Biolegend], 1 µg/mL; Exzitationswellenlänge: 488 nm, Emissionswellenlänge: 520 nm; Laserleistung: 80 %, AOTF output power: 27,8 %, PMT Gain: 50 V (bei den Durchlichtaufnahmen: 200 V), Offset: 50; Objektiv: HCX PL APO CS, 40x oil, NA= 1.3; Mikroskop: Leica TCS SP5

ausgeschlossen werden. Sowohl bei 5.8d als auch 5.9d wird bei Betrachtung der jeweils positiven Zelllinien (HEK293/CXCR1-C11 und HEK293/CXCR2-IIH8) deutlich, dass sich die Fluoreszenzintensität nicht auf die Zellmembranen begrenzt, sondern vielmehr auf die gesamte Zelle verteilt ist, wobei die Zellkerne als dunkle Bereiche sichtbar werden. Demnach sind die Rezeptoren nicht auf die Zellmembran begrenzt, sondern können auch innerhalb der Zelle, während des Transports an die Zelloberfläche oder als Folge einer Internalisierung nachgewiesen werden. Bei nur vereinzelt sehr hellen und Stellen hoher Fluoreszenz handelt es sich um Artefakte.

Anhand dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den mit anderen immunologischen Nachweisen erhaltenen Ergebnissen bezüglich der Expression der Rezeptoren in Wildtypzellen um falsch-positive Ergebnisse handelt, was einer endogenen Expression der Rezeptoren in HEK293 widerspricht. Die falsch-positiven Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind aufgrund der geringeren Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle im Vergleich zu den spezifischen Antikörpern auf eine unspezifische Wechselwirkung des va-

riablen und somit gegen die Rezeptoren gerichteten Teils der Antikörper zurückzuführen.

Die Kombination der Ergebnisse der Western Blot-Analyse der angefertigten Membranpräparationen und der konfokalen Mikroskopie bestätigten schließlich auf immunologischer Ebene die Transfektion und stabile Expression der Rezeptoren und ließ zusätzlich eine Differenzierung der Einzelklone bezüglich der Rezeptorexpression zu. Insbesondere HEK293/CXCR1-C11 wurde hierbei als eine den CXCR1 stark exprimierende Zelllinie identifiziert, wohingegen bei HEK293/CXCR1-A7 anhand der Mikroskopieaufnahmen keine oder eine nur sehr schwache Expression zeigte. Diese Einstufung beruhte allerdings lediglich auf diesem als letzten angefertigten immunologischen Nachweis, weshalb auch letztgenannter Einzelklon vereinzelt zum Vergleich verwendet wurde.

5.2 Etablierung eines Aktivitätsassays zur Bestätigung der biologischen Aktivität der rekombinant exprimierten Rezeptoren

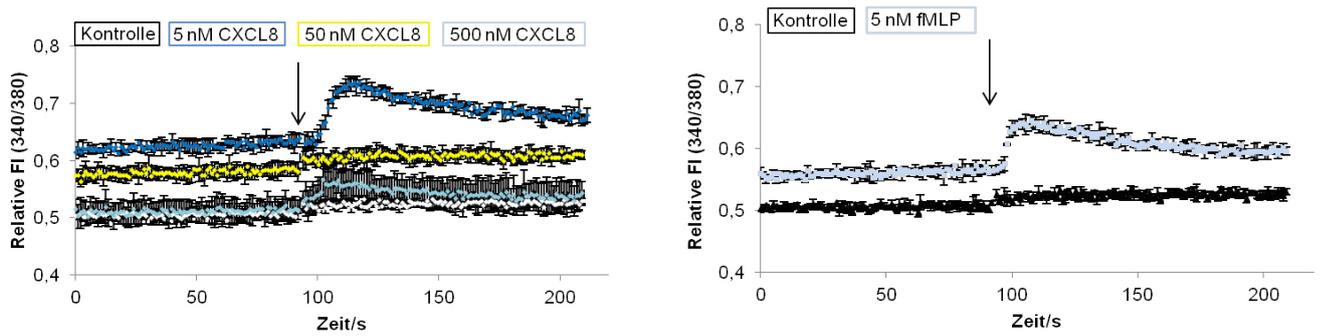
Zusätzlich zu einem Nachweis der Expression der Rezeptoren mit immunologischen Methoden sollte in Aktivitätsassays deren biologische Aktivität geprüft werden. Hierzu wurde ein Calcium-Assay etabliert, bei welchem der durch Ligandenbindung ausgelöste Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration fluorimetrisch durch den Farbstoff Fura-2 detektiert wird. Wie unter 1.4.2 ausführlich erläutert, ändert sich das Exzitationsspektrum dieses Fluorophors durch die Komplexbildung mit zweiwertigen Ionen. Wird die Emission bei 510 nm bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) gemessen, so spiegelt der aus beiden Fluoreszenzintensitäten gebildete Quotient die Konzentration an Calciumionen wider, da die Emission nach der Anregung bei 340 nm durch die Ca^{2+} -Komplexbildung steigt, während jene durch die Anregung bei 380 nm sinkt.^{[163][160]}

Zur Etablierung dieses Assays wurden das im Arbeitskreis exprimierte CXCL8 sowie neutrophile Granulozyten verwendet, welche CXCR1 und CXCR2 endogen exprimieren.^[48] Aufgrund der arbeitsreichen Präparation dieser primären Zellart und der großen Abhängigkeit der Ergebnisse von den jeweiligen Spendern, sollte der Assay im Anschluss auf adhärente Zelllinien übertragen werden. Hierzu dienten die mit pcDNA31.(+)/CXCR1 oder /CXCR2 transfizierten HEK293, anhand welcher verschiedene Parameter optimiert wurden. Zugleich sollte der optimierte Assay der Bestätigung der Expression biologisch aktiver Rezeptoren in diesen Zelllinien dienen und die Anwendung des Assays zur Bestätigung von Inhibitoren des Chemokins CXCL8 eingesetzt werden.

5.2.1 Etablierung eines Calcium-Assays mit neutrophilen Granulozyten

Zur Durchführung von Aktivitätsassays mit Primärzellen werden diese unmittelbar vor dem Calcium-Assay frisch aus *buffy coats* isoliert. Nach der Inkubation mit Fura-2AM wird die Zellsuspension in eine 96-Wellplatte aliquotiert, die Basislinie aufgenommen und die Injektionslösungen automatisch zugegeben. CXCL8 ist *in vivo* und *in vitro* im unteren nanomolaren Bereich biologisch aktiv, sodass eine fünf nanomolare Endkonzentration an CXCL8 eingesetzt wurde.^{[33][39]} Zum Vergleich wurden zusätzlich zwei höhere Konzentrationen, 50 und 500 nM, gewählt. Als Positivkontrolle der Detektion des Calciumionenanstiegs wurde neben den hier untersuchten Ligand-Rezeptorpaaren CXCL8/CXCR1 und CXCR2 zudem

das bakterielle Tripeptid fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), ein Agonist des Formyl-Peptid-Rezeptors, genutzt. Dessen Aktivierung durch fMLP führt in humanen neutrophilen Granulozyten ebenfalls zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.^[191] Der gemessene Calciumanstieg in neutrophilen Granulozyten nach der Aktivierung durch CXCL8 ist in Abbildung 5.10a dargestellt, Abbildung 5.10b zeigt die durch fMLP ausgelöste Erhöhung der zytosolischen Calciumionenkonzentration. Es wird

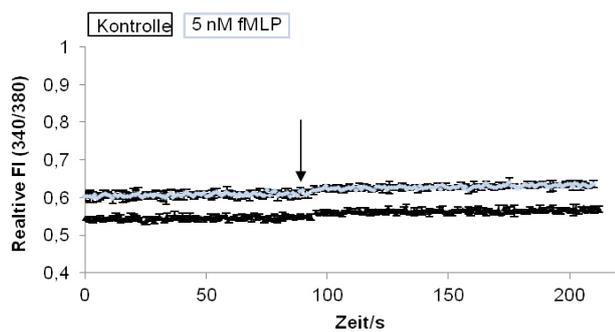


(a) Stimulierung von neutrophilen Granulozyten mit CXCL8 (b) Stimulierung von neutrophilen Granulozyten mit fMLP

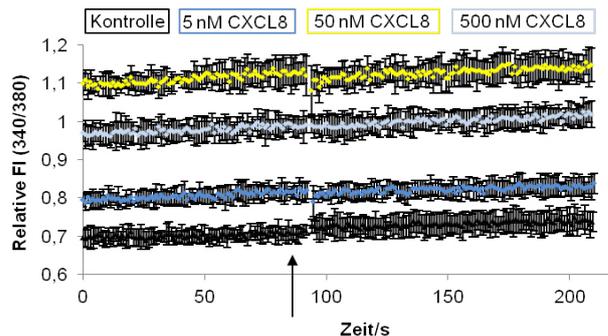
Abbildung 5.10: **Bestätigung der Etablierung des Calcium-Assays mit frisch isolierten neutrophilen Granulozyten.** Es wurden 200 aufeinander folgende Messungen in Abständen von etwa 1 s mit 250.000 Zellen in 100 μ L HHBS je 96-Wellkavität und einem Injektionsvolumen von 50 μ L aufgenommen. Der Pfeil kennzeichnet den Injektionszeitpunkt bei der 90. Messung. Als Kontrolle wurde HHBS injiziert. Es ist eine Durchführung in Dreifachbestimmung zu sehen, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. FI: Fluoreszenzintensität

deutlich, dass ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration unter den hier beschriebenen Bedingungen detektierbar ist und das im Arbeitskreis exprimierte CXCL8 neutrophile Granulozyten wie erwartet stimuliert. Der Injektionspuffer, HHBS, rief keine signifikante Änderung des Quotienten der emittierten Fluoreszenz hervor. Die der physiologischen Konzentration von CXCL8 entsprechende Konzentration von 5 nM resultierte in der höchsten Signalstärke, welche jener der Positivkontrolle fMLP (Abbildung 5.10b) glich, gefolgt von dem Signal bei 500 nM. Die mittlere Konzentration von 50 nM CXCL8 führte dagegen zu keinem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, was wiederholt beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 5.13a).

Nach Verwendung von fMLP als Positivkontrolle wurde der Assay mit CHO-Zellen als Negativkontrolle durchgeführt, welche erst nach entsprechender Transfektion auf dieses Tripeptid reagieren und somit keine Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zu beobachten sein dürfte.^[192] Abbildung 5.11 zeigt hierbei jeweils eine Durchführung für verschiedene CXCL8-Konzentrationen in Doppel- bzw. für fMLP in Dreifachbestimmung. Weder bei einer Injektion von fMLP noch von CXCL8 konnte hier ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration detektiert werden, wobei diese Ergebnisse durch unabhängige Wiederholungen bestätigt wurden.



(a) Stimulierung von CHO-Zellen mit fMLP



(b) Stimulierung von CHO-Zellen mit CXCL8

Abbildung 5.11: **Calcium-Assay mit CHO-Zellen als Negativkontrolle.** Es wurden 200 aufeinander folgende Messungen in Abständen von etwa 1 s aufgenommen, der Pfeil kennzeichnet den Injektionszeitpunkt bei der 90. Messung. Als Kontrolle wird HHBS injiziert. Es ist eine Durchführung a) mit fMLP in Dreifachbestimmung mit 125.000 am Vortrag ausgesäten Zellen und b) mit CXCL8 in Doppelbestimmung mit 80.000 am Vortrag ausgesäten Zellen je 96-Wellkavität gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. FI: Fluoreszenzintensität

5.2.2 Optimierung und Durchführung des Calcium-Assays mit transfizierten HEK293-Zelllinien

Erste Versuche wurden, wie in *Chemokine Protocols* von Buser und Proudfoot beschrieben, in Krebs-Ringer-Puffer durchgeführt.^[193] Mit den hier zu untersuchenden HEK293/CXCR1-Zellen (Mischkultur) konnte jedoch nach Zugabe von CXCL8 am Tecan Infinite[®]M1000 kein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Analog zur Durchführung des „ScreenQuestTM Ratiometric Fura-2 NW Calcium Assay Kits“ der Firma AAT Bioquest wurde HHBS als Assaypuffer gewählt und der Waschschrift zwischen Beladung mit Fura-2AM und der Injektion des Chemokins weggelassen (Daten nicht gezeigt). Zur Erhöhung der dynamischen Breite wurden im Rahmen der Optimierung verschiedene Wege zur Reduktion von Hintergrundsignalen getestet. Eine Möglichkeit hierzu bestand in der Optimierung der Z-Position am Tecan Infinite[®]M1000, was zur Fokussierung der Messung auf die Zellebene führte.^[143] Hintergrundsignale können beispielsweise durch die Passage des emittierten Lichts durch die die Zellen berschichtende Lösung entstehen, sodass als weitere Option die Fluoreszenzintensität von unten durch den transparenten Boden der schwarzen MTP anstatt von oben durch die die Zellen berschichtende Pufferlösung gemessen wurde. Diese Änderung resultierte in einer Erhöhung der dynamischen Breite.

Bei den Durchführungen mit allen getesteten Zellarten ist die unterschiedliche Basislinie des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten auffallend. Dieser stieg mit voranschreitender Zeit innerhalb einer Durchführung an, sodass die letzten Injektionen die höchste Basislinie aufwiesen. Dies ist vermutlich auf einen Austritt des Farbstoffs aus den Zellen zurückzuführen. Um die einzelnen Injektionen trotz der unterschiedlichen Basislinien besser miteinander vergleichen zu können, wurden die erhaltenen Graphen normalisiert. Hierzu wurde jeweils der Mittelwert der relativen Fluoreszenzintensität aus den 89 Messpunkten vor der Zugabe des Chemokins gebildet. Um auf den kleinsten Quotienten zu normieren, wurde jeweils die Differenz dieses ausgewählten Quotienten und der höher liegenden gebildet und diese Differenz von den jeweiligen, höher liegenden Kurven subtrahiert.

Zur genaueren Analyse der Veränderung dieses Quotienten über die Zeit wurden HEK293/CXCR1-A7 mit zwei verschiedenen Konzentrationen, 2 μM und 4 μM , an Fura-2AM inkubiert. Des Weiteren wurde nach Inkubation mit der geringeren Farbstoffkonzentration ein Waschschritt mit HHBS eingefügt und eine weitere Zellpopulation nach der Inkubation mit selbiger Fura-2AM-Konzentration auf Eis gelagert, um den vermuteten, aktiven Transport des Farbstoffs aus der Zelle zu unterbinden. Abbildung 5.12 zeigt das Ergebnis dieses Vorversuchs zur Optimierung der Farbstoffbeladung, welcher in Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Wie deutlich zu sehen ist, stieg der aus den Fluoreszenzintensitäten der beiden Anre-

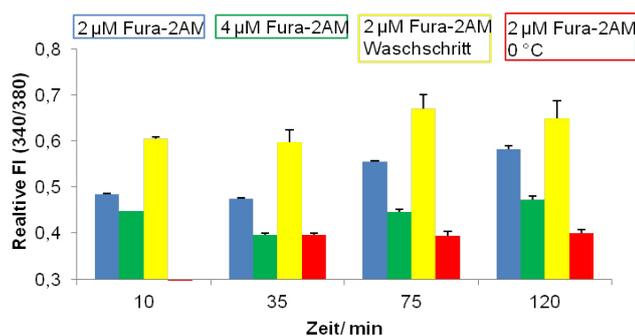


Abbildung 5.12: **Zeitabhängige Veränderung der Basislinie (Quotient der Fluoreszenzintensitäten der Anregung bei 340 nm und 380 nm)** Inkubation mit 2 μM (blau) und 4 μM (grün) Fura-2AM im Vergleich, Inkubation mit 2 μM Fura-2AM und einem Waschschritt mit HHBS (gelb) und Inkubation mit 2 μM Fura-2AM, zwischen den Messpunkten auf Eis gelagert (rot); Es erfolgte keine Injektion. FI: Fluoreszenzintensität

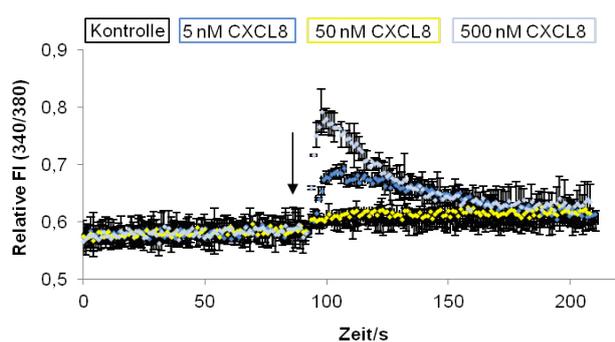
gungswellenlängen ermittelte Quotient ohne Zugabe einer Injektionslösung mit der Zeit an. Dieser Anstieg war bei einer Inkubation mit 2 μM Fura-2AM gefolgt von 4 μM am deutlichsten und konnte bei den auf Eis gelagerten Zellen nicht beobachtet werden (die Messung bei zehn Minuten wurde für diese Probe nicht durchgeführt). Letztgenannte Probe wies zudem den geringsten Quotienten auf, während nach einem Waschschritt der höchste Wert beobachtet wurde. Die Inkubation mit einer 4 $\mu\text{molaren}$ Lösung (grün) wies einen kleineren Quotienten als jene mit einer 2 $\mu\text{molaren}$ Fura-2-Lösung (blau), welche der im ursprünglich gewählten Protokoll nach Buser und Proudfoot und weiterer Literatur angegebenen Konzentration entspricht, auf.^{[193] [194]}

Im Gegensatz zur Durchführung mit neutrophilen Granulozyten analog zum oben genannten Assaykit (AAT Bioquest), wurde ein Waschschritt nach der Beladung der adhären Zellen mit Farbstoff eingefügt, da ein positiver Einfluss auf die dynamische Breite vermutet wurde. Eine Kühlung der Mikrotiterplatte während der Messungen im Tecan Infinite[®]M1000 ist nicht möglich, hätte diesen Beobachtungen zufolge jedoch gewährleistet, dass die Basislinie aller Zellproben bei dem gleichen Wert des Quotienten beginnen würde. Einer Injektion der Protein- und Pufferlösungen bei diesen niedrigen Temperaturen sprach jedoch die Tatsache dagegen, dass die Zellen eine möglichst hohe biologische Aktivität zeigen sollten, wobei davon auszugehen war, dass diese mit sinkender Temperatur abnimmt. Aufgrund all dieser Überlegungen wurde entschieden, die Messung bei Raumtemperatur durchzuführen, um bei ausreichender Zellaktivität eine möglichst geringe Erhöhung der Basislinie zwischen den einzelnen Zellproben während der gesamten Messdauer am Tecan Infinite[®]M1000 zu erhalten. Bezüglich der zur Beladung der Zellen mit Fura-2AM benötigten Konzentration wurde anhand der Fluoreszenzintensitäten bei der Anregung mit den beiden

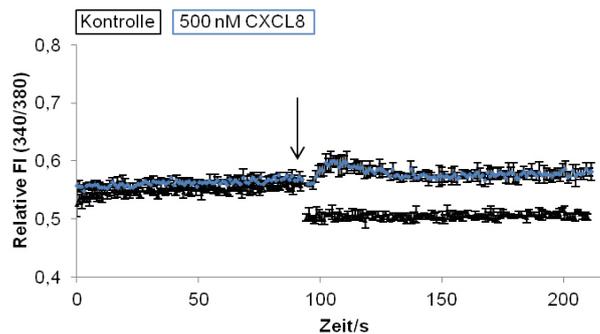
Wellenlängen (340 nm und 380 nm) die geringere Konzentration als ausreichend bewertet (Daten nicht gezeigt), da die Veränderung der Basislinie über die Zeit innerhalb der ersten 30 Minuten, dem zur Messung meist ausreichenden Zeitraum, vergleichbar war. Während erste Experimente mit adhärennten Zellen auf diese Weise normalisiert wurden (vgl. Abbildung 5.13a), konnte dieses Problem der unterschiedlichen Basislinien im Zuge der Assayoptimierung durch eine Reduzierung der Anzahl der Messungen von 200 auf 60 (80) (Injektion nach der 20. Messung) und somit einer deutlichen Verkürzung der Zeitspanne zwischen erster und letzter Injektion behoben werden. Zudem wurde die in der verwendeten Software „i-control“TM erstellte Methode geändert, sodass die miteinander zu vergleichenden Injektionslösungen im Wechsel zugegeben wurden. Bei Versuchen, welche die Injektion von mehr als zwei Lösungen erforderten, wurden entsprechend mehrere Mikrotiterplatten verwendet, sodass die zum Vorbereiten der Injektoren benötigte Zeit weder einen Einfluss auf die Zeit zwischen den einzelnen Injektionen noch die Zeitspanne zwischen erster und letzter Injektion hatte.

In Abbildung 5.13a ist das Ergebnis der Übertragung des mit Suspensionzellen erfolgreich durchgeführten Assays auf die adhärennten, transfizierten Zellen am Beispiel des HEK293/CXCR1-A7 zu sehen. Es wurden auch die bereits getesteten Konzentrationen an CXCL8 verglichen. Im Gegensatz zu dem in Abbildung 5.10a gezeigten Versuch mit neutrophilen Granulozyten führte eine Erhöhung der Chemokinkonzentration bei mit pcDNA3.1(+)/CXCR1 transfizierten HEK293-Zellen zu einer größeren Signalintensität. Auch hier konnte nach der Injektion einer 50 nanomolaren im Gegensatz zur 5 und 500 nanomolaren CXCL8-Lösung keine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration detektiert werden. Der geringe Anstieg der Basislinie bei der Zugabe der 50 nanomolaren Lösung war bei der Injektion des Puffers HHBS ebenfalls zu sehen und konnte aus diesem Grund nicht als Signal gewertet werden. Mit einer Differenz von etwa 0,2 in der relativen Fluoreszenzintensität stellt dieses Signal in Anbetracht der bei konfokaler Mikroskopie nicht bestätigten Expression des CXCR1 in diesem Einzelklon ein unerwartet hohes Signal dar. Somit widerspricht dieses Ergebnis diesem immunologischen Nachweis der Rezeptorexpression.

Der Versuch mit verschiedenen CXCL8-Konzentrationen wurde mit insgesamt fünf HEK293/CXCR1-Einzelklonen (A7, C11, D11, D3 und B8) durchgeführt. Ein quantitativer Vergleich der biologischen Aktivität der einzelnen Klone war nicht möglich, da das Calciumsignal der einzelnen Klone bei insgesamt drei Wiederholungen stark variierte. Abbildung 5.13b zeigt exemplarisch die Stimulierung des Einzelklons HEK293/CXCR2-IIH8 mit 500 nM CXCL8, welche in einem kleinen Peak resultierte. Dieser unterscheidet sich jedoch eindeutig von der Zugabe des Puffers HHBS, bei welcher aufgrund von Mischungs/Verdünnungseffekten die Intensitäten zu niedrigeren Quotienten hin versetzt sind. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurden verschiedene Parameter getestet. Dazu gehörten als Größen, welche die Durchmischung beeinflussen, Injektionsvolumen und -geschwindigkeit, DMEM als alternativer Assaypuffer sowie die Temperatur bei der Durchführung am Tecan Infinite[®]M1000. Zusätzlich wurden verschiedene Zellzahlen (40.000, 80.000 und 160.000 Zellen) eingesetzt, da ein Einfluss der Konfluenz auf die Zellphysiologie, beispielsweise durch ein verändertes Nährstoffangebot publiziert ist.^[143] (Die Angabe der Konfluenz ist eine sehr subjektive Größe, da sie visuell im Mikroskop bei Betrachtung des Zellrasens ermittelt wird. Aus diesem Grund werden hier Zellzahlen angegeben, wobei die hier in der Regel ausgesäte und anhand einer angefertigten Wachstumskurve ausgewählte Zellzahl von 80.000 Zellen je 96-Well-Kavität am Folgetag in einem dicht gewachsenen Zellrasen resultierte.) Bei keinem der erwähnten Variationen konnte



(a) HEK293/CXCR1-A7



(b) HEK293/CXCR2-IIH8

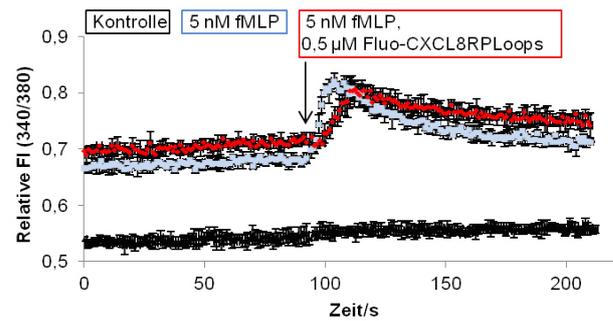
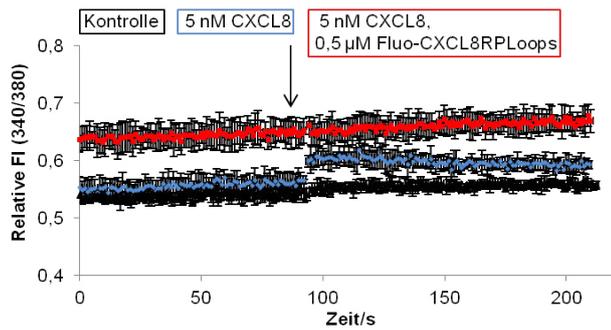
Abbildung 5.13: **Calcium-Assay der Einzelklone HEK293/CXCR2-IIH8 und HEK293/CXCR1-A7.** Es wurden 200 aufeinander folgende Messungen in Abständen von etwa 1 s aufgenommen, der Pfeil kennzeichnet den Injektionszeitpunkt bei der 90. Messung. Als Kontrolle wurde HHBS injiziert. Es ist eine Durchführung a) in Doppelbestimmung und b) in Dreifachbestimmung mit 80.000- am Vortrag ausgesäten - Zellen je 96-Wellkavität gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. FI: Fluoreszenzintensität

ein deutlicher Zusammenhang zwischen Parameter und Signalstärke oder eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

5.2.3 Anwendung des Calcium-Assay zur Bestätigung von Inhibitoren des Chemokins CXCL8 und der Spezifität des in transfizierten HEK293-Zellen ausgelösten Signals

Um die Anwendung des Calcium-Assays zur Bestätigung von Inhibitoren des CXCL8 zu prüfen, sollte das in neutrophilen Granulozyten durch die Zugabe des Chemokins ausgelöste Signal mit der fluoreszent markierten Variante des von Dorothea Helmer synthetisierten Inhibitorpeptids Fluo-CXCL8-RPLoops inhibiert werden, welches unter anderem in einem Transwell-Assay und Bindungsassays untersucht worden war.^[110] Zugleich diene dieser Versuchsaufbau dem Beweis, dass die detektierte Änderung der Calciumionenkonzentration auf die spezifische Wechselwirkung von CXCL8 mit seinen Rezeptoren zurückzuführen war. Bei der Injektion des mit dem Inhibitorpeptid vorinkubierten CXCL8 konnte kein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration detektiert werden, wodurch die inhibitorische Wirkung des CXCL8-RPLoops bestätigt wurde (vgl. Abbildung 5.14a). Um die Spezifität dieses Inhibitorpeptids zu beweisen, wurde das als Positivkontrolle genutzte fMLP genutzt. Durch Abbildung 5.14b, welche die Injektion von fMLP sowie einer Mischung aus fMLP mit Fluo-CXCL8-RPLoops zeigt, wird deutlich, dass die inhibitorische Wirkung auf die Wechselwirkung des Peptids mit CXCL8 zurückzuführen ist, da das durch fMLP ausgelöste Signal nicht beeinflusst wird. Die gezeigten Resultate wurden in weiteren Experimenten mit frisch isolierten neutrophilen Granulozyten wiederholt, wobei das Ergebnis aufgrund der großen Abhängigkeit von den Blutspendern stark variierte und nicht immer ein eindeutiger Anstieg der Calciumkonzentration beobachtet wurde, entsprachen jedoch den im Arbeitskreis erhaltenen Ergebnissen.^[110]

Zur besseren Stabilität des Assays wurde der beschriebene, in neutrophilen Granulozyten bestätigte, Ver-



(a) Stimulierung von neutrophilen Granulozyten mit CXCL8 (b) Stimulierung von neutrophilen Granulozyten mit fMLP

Abbildung 5.14: **Inhibierung des durch CXCL8 ausgelösten Anstiegs der zytosolischen Calciumkonzentration in neutrophilen Granulozyten mit Fluo-CXCL8-RPLoops.** Es wurden 200 aufeinander folgende Messungen in Abständen von etwa 1 s mit 250.000 Zellen je 96-Wellkavität und einem Injektionsvolumen von 50 μ L, aufgenommen. Der Pfeil kennzeichnet den Injektionszeitpunkt bei der 90. Messung. Als Kontrolle wurde HHBS injiziert. Die Ligand-Inhibitorlösungen wurden mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Es ist eine Durchführung in Dreifachbestimmung zu sehen, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. FI: Fluoreszenzintensität

such zur Inhibierung des durch CXCL8 ausgelösten Signals mit HEK293/CXCR1-C11 wiederholt. In diesem Anwendungsbeispiel sollte erneut die biologische Aktivität der in HEK293-Zellen rekombinant exprimierten Rezeptoren gezeigt werden. Bei dem bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten CXCL8 war die Konzentration mittels BCA-Assay bestimmt worden. Diese Methode wurde zwischenzeitlich im Arbeitskreis optimiert. Die durch Absorptionsmessung bei 280 nm ermittelte Proteinkonzentration ergab bis zu etwa fünffach höhere CXCL8-Konzentrationen. Demnach hatten die zuvor eingesetzten Injektionslösungen entsprechend höhere Konzentrationen als die hier angegebenen. Als Positivkontrolle der Inhibierung des durch CXCL8 ausgelösten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration in HEK293/CXCR1 diente ein gegen das Chemokin CXCL8 gerichteter Antikörper. Abbildung 5.15a zeigt die Stimulierung von HEK293/CXCR1-C11 mit 10 nM CXCL8 sowie mit einer Mischung aus CXCL8 und dem Antikörper Anti-Interleukin-8 (Sigma Aldrich). Diese Konzentration war demnach geringer als die zuvor in Assays eingesetzten, allerdings handelte es sich hierbei um eine in Aktivitätsassays übliche Größenordnung, sodass die Konzentration hoch genug hätte sein müssen, um die Zellen zu aktivieren. Mit 10 nM CXCL8 konnte jedoch entgegen dieser Annahme kein detektierbarer Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration hervorgerufen werden, sodass kein Unterschied zwischen der Injektion des Liganden, des Liganden mit Inhibitor (Anti-Interleukin-8) oder des reinen Puffers HHBS zu sehen ist. Nach Erhöhung der Chemokinkonzentration auf 100 nM konnte ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration detektiert werden (vgl. Abbildung 5.15c). Die Vorinkubation des Chemokins mit dem Antikörper resultierte allerdings nicht in dem erwarteten geringeren Signal, sondern zeigte einen geringfügig höheren Anstieg des Quotienten. Die Inhibierung des durch das Chemokin ausgelösten Signals durch Vorinkubation mit diesem, gegen CXCL8 gerichteten Antikörper war in anderen Aktivitätsassays (vgl. Transwellassay in Abbildung 5.16) jedoch unter Zusatz von BSA im Puffer bereits nachgewiesen worden. In vielen Aktivitätsassays mit Zellen wird dieses Protein zugesetzt, welches unspezifische Wechselwirkungen des Chemokins zur Zelloberfläche und Gefäßwänden reduzieren soll, sodass dieser

Pufferzusatz auch auf die Durchführung des Calcium-Assays übertragen wurde, um die Anwendung des Calcium-Assays in Inhibitorversuchen zu optimieren. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen an BSA (0,2-1%) getestet und mit zunehmender BSA-Konzentration eine Steigerung der Signalstärke bei gleichbleibender CXCL8-Konzentration sowie eine immer deutlichere Inhibierung durch Anti-CXCL8 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Um den Puffer, welcher die adhärenzte Zellpopulation überschichtet, jenem der Injektionslösung anzupassen, wurde diesem ebenfalls BSA zugesetzt. Diese Zugabe wurde jedoch aufgrund der durch die Injektion ausgelösten Bildung von Luftblasen im Well, welche die Messung negativ beeinflussten, wieder verworfen und die Zellen weiterhin mit reinem HHBS überschichtet. Die Zugabe von BSA in den zu injizierenden Assaypuffer HHBS in einer Konzentration von 1% (w/v) ermöglichte die vollständige Inhibierung des von CXCL8 ausgelösten Signals durch den gegen CXCL8 gerichteten Antikörper (5.15c und 5.15d). Die Injektion des HHBS/BSA-Puffers in Abbildung 5.15c zeigt zudem, dass BSA selbst keinen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumionenkonzentration besitzt. Die gezeigten Ergebnisse konnten bei Wiederholung der Experimente reproduziert werden.

Zusammenfassend konnte die inhibitorische Wirkung des CXCL8-RPLoops sowohl in neutrophilen Granulozyten als auch in transfizierten HEK293/CXCR1-C11 durch den etablierten Calcium-Assay bestätigt werden. Auch die Expression von biologisch aktiven Rezeptoren in den transfizierten HEK293 konnte erneut nachgewiesen werden, da sich der durch CXCL8 ausgelöste Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration sowohl durch den gegen CXCL8 gerichteten Antikörper als auch das Inhibitorpeptid CXCL8-RPLoops inhibieren ließ. Wie bereits bei den immunologischen Nachweisen eigneten sich HEK293-Wildtyp-Zellen nicht als Negativkontrolle, da eine endogene Expression der Rezeptoren unter Berücksichtigung aller Ergebnisse (FACS, Western-Blot-Analyse) nicht ausgeschlossen werden konnte. Dementsprechend konnte in einigen Durchführungen nach Stimulierung mit den genannten Konzentrationen an CXCL8 (5 nM, 10 nM, 500 nM) ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden. Andere, als Negativkontrolle genutzte Zellen, CHO, zeigten durchgängig in allen Durchführungen keinen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration durch CXCL8, was in Kombination mit den durchgeführten Positivkontrollen für eine erfolgreiche Etablierung des Assays spricht.

Als Maß der Qualität eines Assays kann der in 1.4 erläuterte, von Zhang *et al.* beschriebene, Z' -Faktor berechnet werden.^[136] Nach der langwierigen Optimierungsarbeit mit stetig verbesserten experimentellen Bedingungen wurden hierfür am Ende der Arbeit zwei Assays mit HEK293/CXCR1-C11 betrachtet, die unter optimalen Bedingungen in Vierfachbestimmung mit HHBS als Negativkontrolle und CXCL8 als Positivkontrolle durchgeführt wurden. Hierzu wurden die Mittelwerte aus jeweils zehn Messpunkten innerhalb der Maxima der betrachteten acht Graphen gebildet. Aus diesen acht Werten der Positivkontrolle wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Zur Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung der Negativkontrolle (HHBS) wurde analog verfahren, wobei zehn Messpunkte den oben verwendeten Zeitpunkten entsprachen. Die Berechnung aus insgesamt acht Kavitäten aus zwei unabhängigen Experimenten ergab einen Z' -Faktor -1,86, was zeigt, dass sich die Verteilung der Signale der Positiv- und Negativkontrollen zu sehr überschneiden. Werden die beiden unabhängigen Experimente einzeln betrachtet, ergeben sich Werte von 0,52 und -2,6, woraus deutlich wird, dass die Unterschiede sowohl zwischen unabhängigen Experimenten als auch innerhalb eines Experiments noch zu stark schwanken. So zeigt das erste Experi-

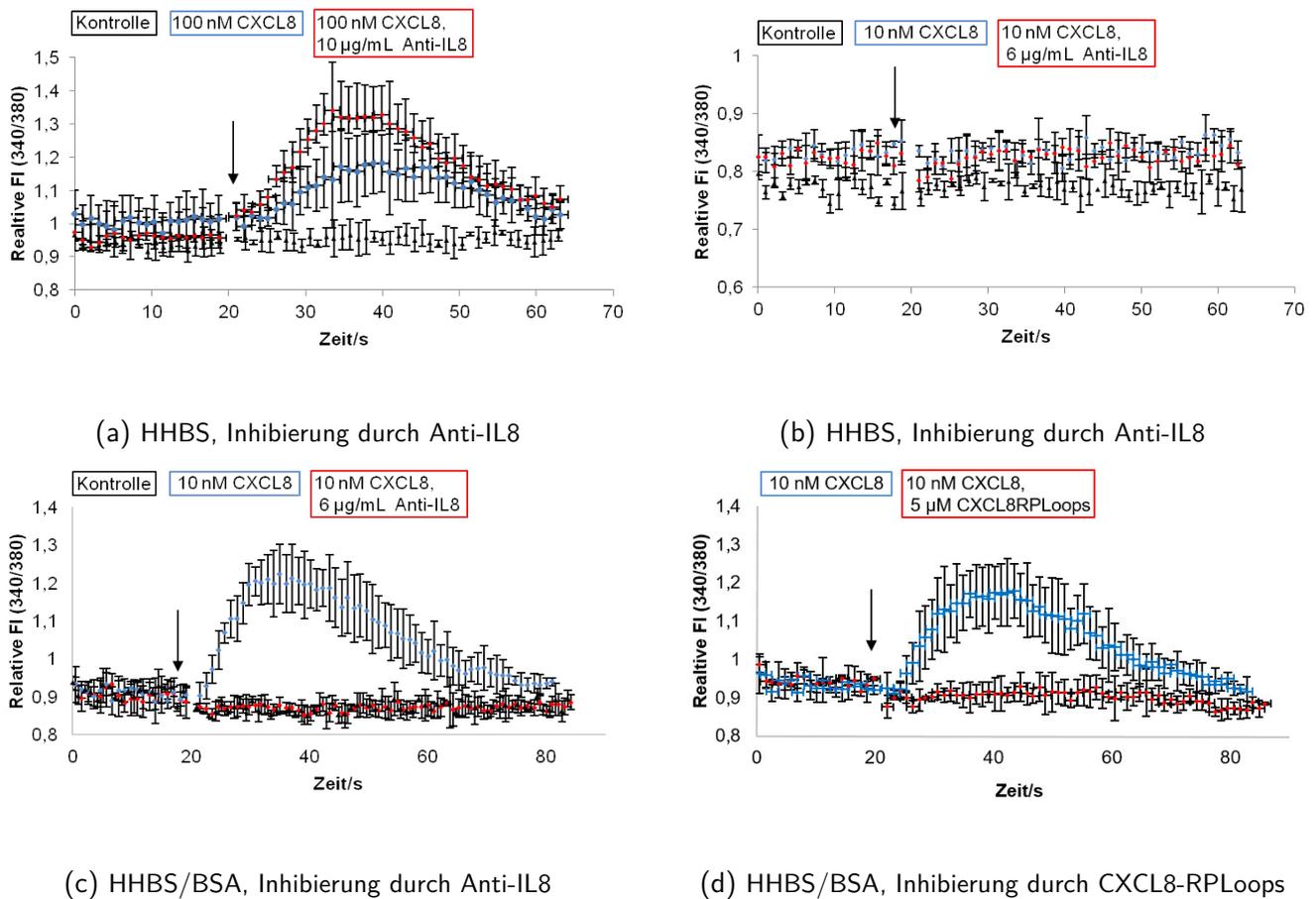


Abbildung 5.15: **Calcium-Assay der Einzelklone HEK293/CXCR1-C11 mit und ohne Zusatz von BSA in HHBS.** Es wurden 80 aufeinander folgende Messungen in Abständen von etwa 1s aufgenommen, der Pfeil kennzeichnet den Injektionszeitpunkt bei der 20. Messung. Die Ligand-Inhibitorlösungen wurden mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in HHBS, 1% BSA (w/v), vorinkubiert. Antikörper: *monoclonal* anti-Interleukin-8 [Sigma-Aldrich]. Es ist eine Durchführung in Dreifachbestimmung (a) und b)) und in Vierfachbestimmung (c) und d)) Kontrolle in Doppelbestimmung) mit 80.000 - am Vortag ausgesäten - Zellen in 100 µL HHBS je 96-Wellkavität gezeigt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. FI: Fluoreszenzintensität.

ment mit 0,52 einen brauchbaren Assay, während letzteres einen sehr schlechten Assay präsentiert. Wird die Positivkontrolle dieses Datensatzes (CXCL8) mit dem durch einen Antikörper inhibierten Signal der gleichen zwei Experimente verglichen, so ergibt sich bei zwei unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung ein Z-Faktor von 0,18, was ebenfalls einen Assay darstellt, welcher keine quantitativen Aussagen, sondern lediglich Ja/Nein-Antworten zulässt. Diese statistische Bewertung des Assays verdeutlicht, wie so keine quantifizierbaren Vergleiche der einzelnen Klone oder die Aufnahme einer Dosis-Wirkungs-Kurve möglich waren. Zusammenfassend konnte mit dem Calcium-Assay ein Aktivitätsassay etabliert und zur Bestätigung eines potentiellen Inhibitors eingesetzt werden.

5.2.4 Verwendung der transfizierten HEK293-Zellen in Aktivitätsassays

Die transfizierten HEK293 (HEK293/CXCR1-C11 und -B8) wurden weiterhin von Ina Rink und Stephanie Eckes zur Etablierung eines Chemotaxis-Assays im Transwell-Format genutzt. Die Ergebnisse dieses Assays zeigen die gleichen Tendenzen wie die gezeigten Resultate des Calcium-Assays und sind am Beispiel von HEK293/CXCR1-B8 in Abbildung 5.16 zu sehen. Es ist die relative Migration dargestellt, wobei die

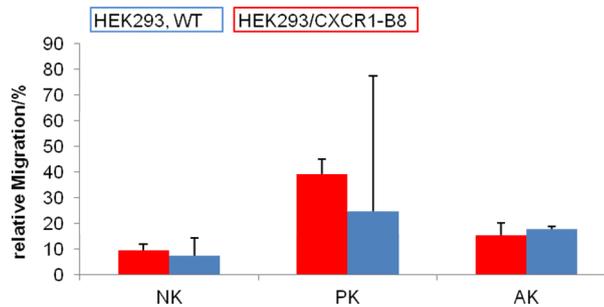


Abbildung 5.16: **Transwell-Assay mit transfizierten und Wildtyp-HEK293.** PK: Positivkontrolle (100 ng/mL, 12 nM CXCL8), NK: Zellmigration ohne Chemoattraktant, AK: Inhibition der durch CXCL8 ausgelösten Zellmigration durch Vorinkubation des Chemokins mit 6 µg/mL Anti-IL8 [Sigma Aldrich]. Es ist der Mittelwert einer Dreifachbestimmung mit der Standardabweichung zu sehen.

absoluten Werte auf eine vollständige Migration der Zellen, demnach die Gesamtzellzahl pro Kavität, normiert wurden. Bezüglich der Negativkontrolle ist, wie erwartet, kein Unterschied zwischen Wildtypzellen und dem ausgewählten Einzelklon HEK293/CXCR1-B8 zu sehen. Dagegen zeigt die Positivkontrolle der transfizierten Zellen eine deutliche Zunahme auf etwa 40 % Zellmigration, welche bei den Wildtypzellen im Mittel ausbleibt, jedoch aufgrund des großen Fehlers (Standardabweichung) dieser Einfachbestimmung keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Diese durch CXCL8 induzierte Migration konnte durch Zugabe des gegen CXCL8 gerichteten Antikörpers (Anti-Interleukin-8, [Sigma-Aldrich]) inhibiert werden, sodass nur noch etwa 15 % der Zellen migrierten. Im Vergleich der Wildtypzellen mit den transfizierten Zellen ist kein Unterschied der mit Antikörper inhibierten Proben zu sehen.

Die Expression biologisch aktiver Rezeptoren konnte demnach auch mit dem hier etablierten Chemotaxisassay nachgewiesen werden. Weitere Anwendungen der transfizierten Zelllinien im Arbeitskreis stellten ein von Ina Rink etablierter Agarose-Spotassay dar. Zusätzlich wurden die CXCR1 exprimierenden Zelllinien ebenfalls von Ina Rink und Maximilian Hungsberg zur Etablierung eines Aktinpolymerisationsassays genutzt. Letztlich steht durch die erfolgreiche Transfektion eine stabile Zelllinie zur Identifizierung von Inhibitoren des Chemokins CXCL8 zur Verfügung, mit welcher bereits drei Aktivitätsassays im Arbeitskreis etabliert werden konnten.

5.3 Konjugation von CXCL8 mit Fluorophoren

Die rekombinante Expression des Liganden von CXCR1 und CXCR2, CXCL8, sowie von dessen Mutante, CXCL8S72C, wurde im Arbeitskreis bereits erfolgreich etabliert. Zur Expression von CXCL8S72C wurden *E. coli* BL21(DE3)RIL frisch mit dem Plasmid pET22b-CXCL8S72C transformiert, eine Kolonie-PCR durchgeführt und diese mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Expression und Reinigung der Proteine wurden mit leichten Abwandlungen, nach dem Standardprotokoll wie unter 4.2.2 beschrieben, durchgeführt.^[195] Ein exemplarisches Chromatogramm eines Kationenaustauscherlaufs des Zellysats aus 1,6 L Bakteriensuspension ist in Abbildung 5.17 zu sehen. Die aus diesem Lauf erhaltene Proteinmenge betrug 2,4 mg. Im Anschluss wurde nach dem ursprünglichen Protokoll eine Größenausschlusschromatographie zum Ent-

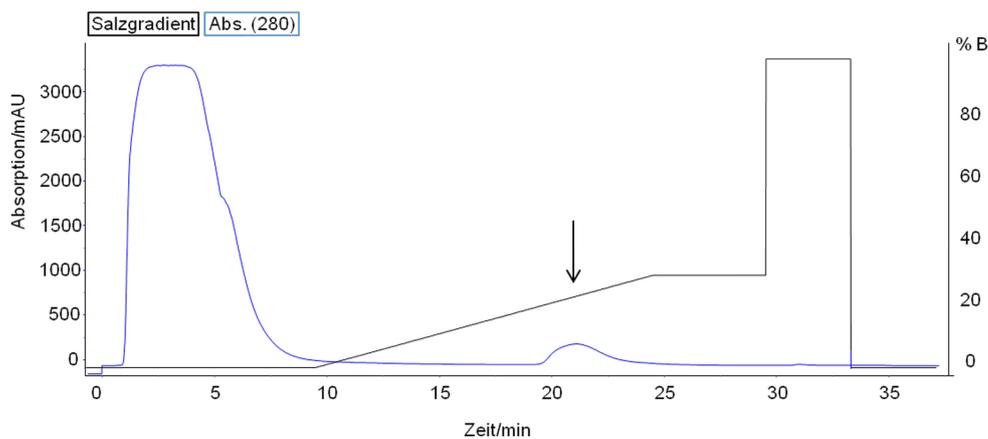


Abbildung 5.17: **Chromatogramm der Reinigung von CXCL8S72C aus einem bakteriellen Zellysats mittels Kationenaustauschchromatographie.** Puffer A (90 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄), Puffer B (1,5 M NaCl, 40 mM Na₂HPO₄), HiTrap_SPFF_5mL. Der Pfeil kennzeichnet die Elutionsfraktion des Chemokins bei einer Retentionszeit von 21 Minuten.

salzen durchgeführt, wozu eine vorherige Konzentrierung der Elutionsfraktion des Kationenaustauscherlaufs mittels Affinitätschromatographie (Heparinsäule) nötig war. Die im Anschluss an die Kationenaustauschchromatographie durchgeführten Reinigungsschritte wurden in folgenden Durchführungen durch Einengen der Proteinlösung mittels Zentrifugalkonzentratoren (Ultrafiltrationseinheiten zum Einmalgebrauch) ersetzt. Die Proteinkonzentration wurde anfangs im BCA-Assay mit einem ähnlichen Protein, Lysozym, als Standard durchgeführt. Dieses besitzt mit 14,3 kDa ein zu Chemokinen ähnliches Molekulargewicht und ist mit einem PI von elf ebenfalls positiv geladen.^[196] Im Folgenden wurde aufgrund starker Abweichungen zu gravimetrischen Bestimmungen jedoch von Ina Rink mit mehreren Chargen an salzfreiem und zusätzlich über Umkehrphasenchromatographie gereinigtem CXCL8 eine auf der Absorptionsmessung bei 280 nm basierende Kalibriergerade erstellt, so dass die Konzentration direkt photometrisch ermittelt werden konnte. Die von Inglese *et al.* erstmals beschriebene Mutante CXCL8S72C besitzt anstelle eines Serinrestes einen zusätzlichen Cysteinrest am C-Terminus, was keine Auswirkungen auf die Wechselwirkung zu den Rezeptoren des Chemokins hat. Ziel dieser Modifizierung stellte die Fluoreszenzmarkierung des Proteins mit Iodacetamidderivaten dar.^[122] In unserer Arbeitsgruppe wurde diese Mutante erstmals zur Reaktion mit maleimid-funktionalisierten Fluorophoren genutzt.^[110] Der Mechanismus dieser Michael-Addition, in welcher die eingefügte Sulfhydrylgruppe des CXCL8S72C als Nukleophil fungiert, ist in Abbildung 5.18 dargestellt.

CXCL8S72C wurde im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen maleimid-funktionalisierten Fluoropho-

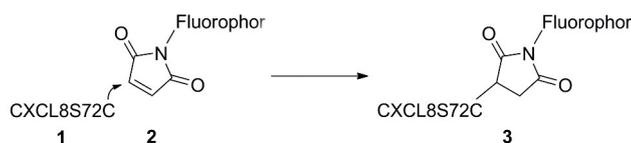


Abbildung 5.18: **Reaktionsschema einer Michael-Addition.** Das zusätzliche Cystein in CXCL8S72C **1** greift als Nukleophil an der Maleimidgruppe des funktionalisierten Farbstoffs **2** an.

ren konjugiert und ihre Anwendbarkeit in Bindungsassays getestet. Fluorescein-5-Maleimid wurde aufgrund seiner großen Quantenausbeute (0,93 für das Dianion) als erster Reaktionspartner gewählt.^[197] Die umkehrphasenchromatographische Reinigung des Reaktionsansatzes (Ansatzgröße: 0,24 μ mol (2 mg) CXCL8S72C) ist in Abbildung 5.19a zu sehen. Mit einer Retentionszeit von 25 Minuten ist das größte Signal bei bei-

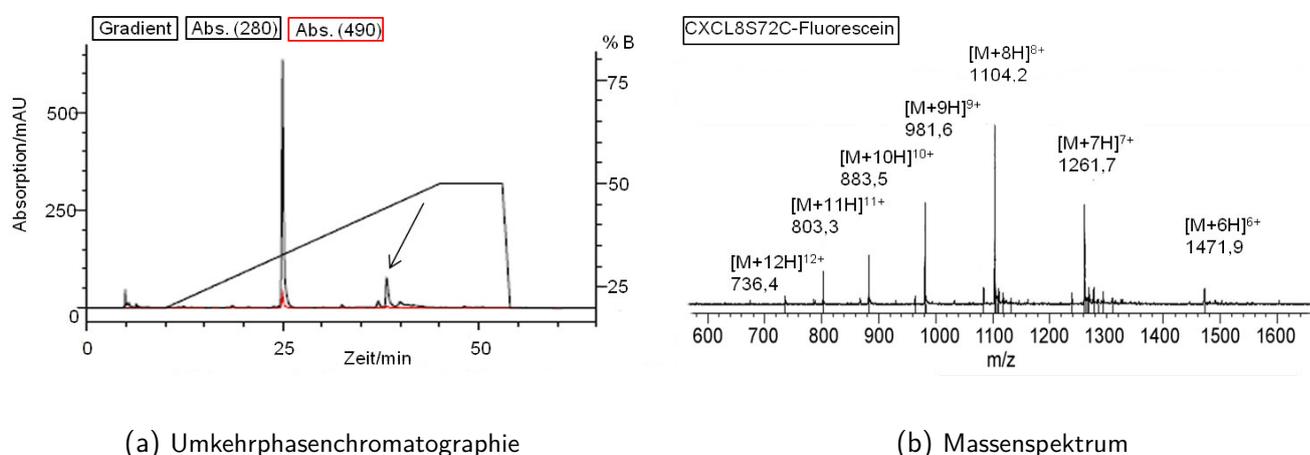
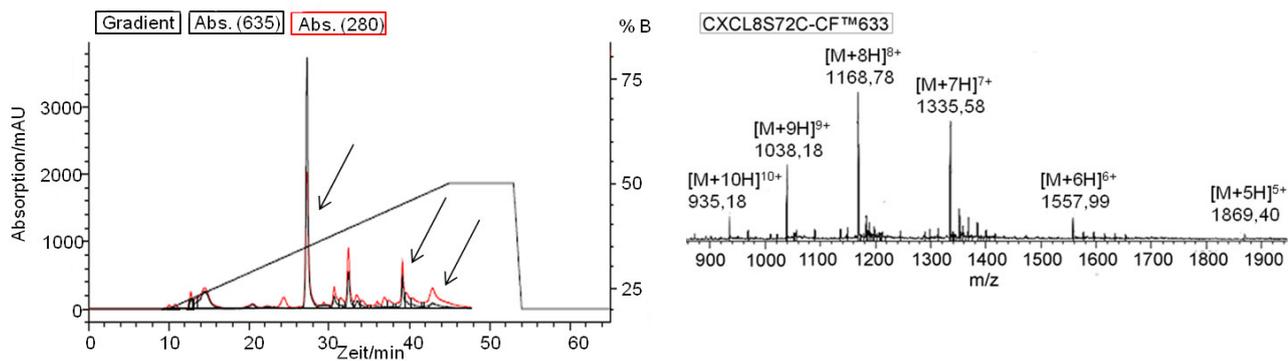


Abbildung 5.19: **Reinigung und Nachweis von CXCL8S72C-Fluorescein.** a) Umkehrphasenchromatographie, R_T : Retentionszeit, Eluent A: 95 % H_2O , 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA, Eluent B: 5 % H_2O , 95 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), NUCLEOSIL[®]300-7 C8 von Machery Nagel, Flußrate: 2 mL/min. Der Pfeil kennzeichnet die Elutionsfraktion des Chemokins bei einer Retentionszeit von 38 Minuten und etwa 48 % Eluent B (47 % Acetonitril) b) Massenspektrum (aufgenommen von Mitarbeitern des Arbeitskreis von Herr Prof. Dr. Kolmar, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt) von CXCL8S72C-Fluorescein (berechnetes Molekulargewicht 8829 g/mol, anhand des Massenspektrums (LC/MS) gemessen: 8825 g/mol)

den Absorptionswellenlängen (280 nm und 490 nm) zu sehen. Aufgrund des etwa vierfachen Überschusses des Farbstoffes zur Menge an CXCL8S72C wurde angenommen, dass es sich hierbei um überschüssiges Fluorescein-5-Maleimid handelt. Nach massenspektrometrischer Analyse wurde die Elutionsfraktion bei 38 Minuten als CXCL8S72C-Fluorescein identifiziert, sodass eine weitere Analyse der restlichen Fraktionen nicht mehr benötigt wurde. Die Konzentration des Proteinkonjugats wurde nach 4.2.3 mit einem *correction factor*, (CF) von 0,300 bestimmt, wodurch sich eine Ausbeute von 85 % ergibt. Aufgrund der zumeist im grünen und blauen Kanal auftretenden Autofluoreszenz biologischer Proben wurden zur Konjugation außerdem zwei bei größeren Wellenlängen fluoreszierende Farbstoffe, CFTM633-Maleimid und DyLight[®]550 Maleimid gewählt.^[198] Abbildung 5.20a zeigt das Chromatogramm des Reaktionsansatzes von CXCL8S72C mit Ersterem. Die aus der Auftrennung des Reaktionsansatzes resultierenden Fraktionen bei 27, 39 und



(a) Umkehrphasenchromatographie

(b) Massenspektrum

Abbildung 5.20: **Reinigung und Nachweis von CXCL8S72C-CFTM633.** a) R_T : Retentionszeit, Eluent A: 95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA, Eluent B: 5 % H₂O, 95 % Acetonitril, 0,1 % TFA, NUCLEOSIL[®]300-7 C8 von Machery Nagel, Flußrate: 2 mL/min. Die Pfeile kennzeichnen die Elutionsfraktion des Chemokins bei einer Retentionszeit von 39 Minuten und 45 % Eluent B (etwa 43 % Acetonitril), bei 27 Minuten die des freien Farbstoffs und bei 43 Minuten die des Dimers des Edukts CXCL8S72C. b) Massenspektrum (aufgenommen von Mitarbeitern des Arbeitskreis von Herr Prof. Dr. Kolmar, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt) von CXCL8S72C-CFTM633: berechnetes Molekulargewicht 9345 g/mol, gemessene: 9340 g/mol.)

43 Minuten absorbieren sowohl bei 280 nm als auch 635 nm und wurden mittels LC-MS näher analysiert. Die Fraktion mit einer Retentionszeit von 27 Minuten ergab eine Masse von 940 Da, jene bei 39 Minuten von 9340 Da und bei 43 Minuten von 16800 Da. Somit stellt die mittlere Fraktion das fluoreszent markierte Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 9345 Da dar. Das dazugehörige Massenspektrum ist in Abbildung 5.20b gezeigt, Abbildung 5.21 stellt die Massenspektren der Fraktionen bei 43 und 27, Minuten dar. Die Fraktion bei 43 Minuten wurde als Dimer des Edukts CXCL8S72C (M: 8400 Da) und jene bei 27 Minuten als der reine Farbstoff (M: 945 Da) identifiziert. Die Ausbeute der Kupplung des Proteins mit CFTM633-Maleimid betrug 28 %. Die Konzentration des konjugierten Proteins wurde hierzu nach 4.2.3 (CF: 0,48) ermittelt.

Die Ergebnisse der Analyse des Reaktionsprodukts von CXCL8S72C mit DyLight[®]550-Maleimid sind in Abbildung 5.22 dargestellt. Das Chromatogramm zeigt Peaks mit Absorptionen bei 280 nm und den Extinktionswellenlängen des Farbstoffes bei 530 und 560 nm bei 11 und 43 Minuten. Aufgrund der vorherigen Chromatogramme wurde CXCL8S72C-D550 bei 43 Minuten vermutet, was mit dem Resultat der massenspektrometrischen Analyse übereinstimmte. Der Großteil des nach elf Minuten eluierenden Farbstoffs, welcher in vierfachem Überschuss gegenüber dem Protein eingesetzt wurde, wurde bereits in einem vorherigen, nicht gezeigten Lauf abgetrennt. Wegen Überladung der Säule konnte das Reaktionsgemisch in dieser ersten Reinigung nicht erfolgreich getrennt werden, wodurch die erhaltene Elutionsfraktion nochmals chromatographisch aufgetrennt wurde. Abbildung 5.23 zeigt den Western Blot der Elutionsfraktionen der in 5.22 gezeigten Umkehrphasenchromatographie und bestätigt oben genannte Zuordnung der Fraktionen. Die Positivkontrolle (PK)⁶ des mittels Massenspektrometrie bereits analysierten Produkts, ist deutlich in

⁶ exprimiert, konjugiert und massenspektrometrisch (MALDI) analysiert von Dorothea Helmer

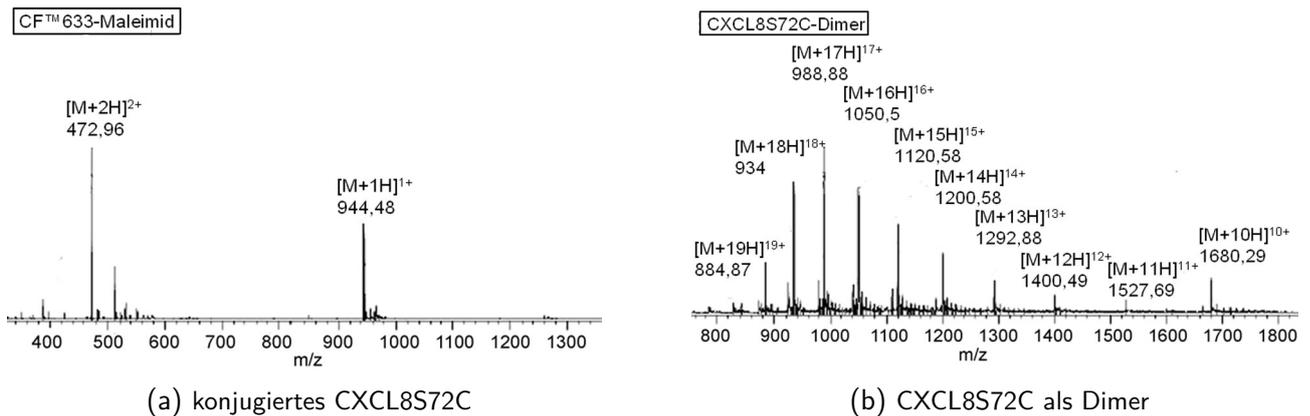


Abbildung 5.21: **Massenspektren von CFTM 633-Maleimid und CXCL8S72C als Dimer.** Massenspektren (aufgenommen von Mitarbeitern des Arbeitskreis von Herr Prof. Dr. Kolmar, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt) der Elutionsfraktionen bei a) 27 Minuten und b) 43 Minuten der Umkehrphasenchromatographie zur Reinigung des Reaktionsansatzes CXCL8S72C/CFTM 633-Maleimid. a) vom Hersteller angegebenes Molekulargewicht 945 g/mol, gemessene: 944 g/mol b) berechnetes Molekulargewicht 16800 g/mol, gemessene: 16803 g/mol)

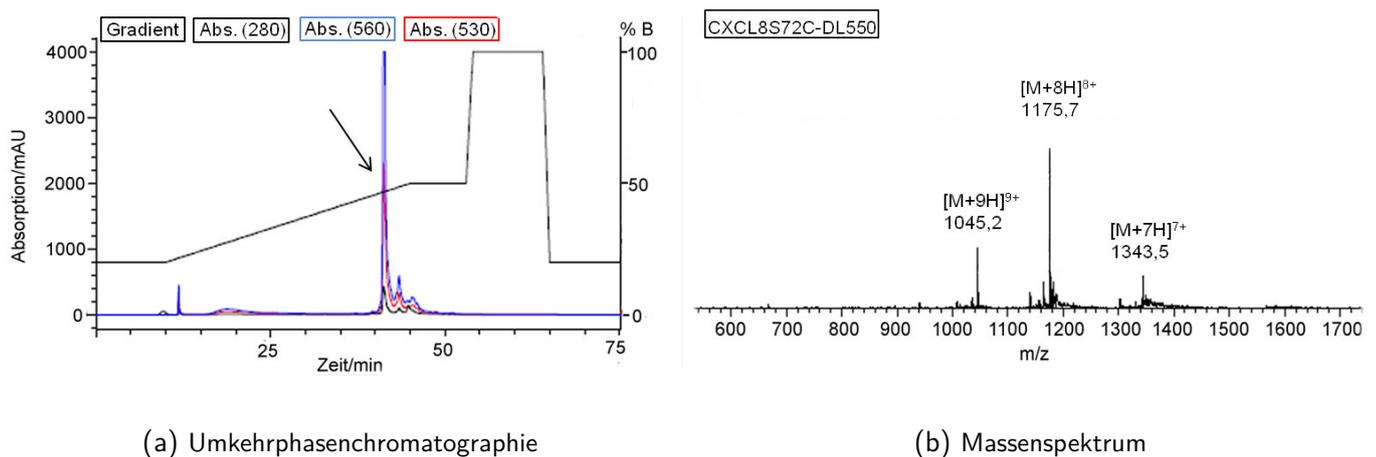


Abbildung 5.22: **Reinigung und Nachweis von CXCL8S72C-DL550** R_T : Retentionszeit, Eluent A: 95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA, Eluent B: 5 % H₂O, 95 % Acetonitril, 0,1 % TFA, NUCLEOSIL® 300-7 C8 von Machery Nagel, Flußrate: 2 mL/min. Der Pfeil kennzeichnet die Elutionsfraktion des Chemokins bei einer Retentionszeit von 43 Minuten und 45 % Eluent B (etwa 43 % Acetonitril) b) Massenspektrum (aufgenommen von Mitarbeitern des Arbeitskreis von Herr Prof. Dr. Kolmar, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt) von CXCL8S72C-DL550 (berechnetes Molekulargewicht: 9465 g/mol, gemessen: 9401 g/mol.)

Höhe der 17kDa-Bande des Proteinstandards zu sehen und beweist, dass eine Bindung des Antikörpers nach Proteinmodifikation noch stattfindet. (Aufgrund der 10%igen SDS-PAGE befindet sich das 9,4kDa große Produkt noch in der Lauffront, da die Probe nicht vollständig aufgetrennt wurde.) Die Elution des Produkts, CXCL8S72C-DL550, bei etwa 43 Minuten konnte somit immunologisch bestätigt werden. Die Fraktion mit einer Retentionszeit von elf Minuten wurde durch den gegen CXCL8 gerichteten Antikörper nicht angefärbt, was mit obigen Überlegungen, dass es sich hierbei um den funktionalisierten Farbstoff



Abbildung 5.23: **Western Blot-Analyse der Elutionsfraktionen der Umkehrphasenchromatographie nach Fluoreszenzmarkierung von CXCL8S72C mit DyLight®550-Maleimid.** Denaturierende 10%ige SDS-PAGE, Antikörper: *monoclonal* Anti-Interleukin-8 [Sigma-Aldrich], 0,5 µg/mL, Sekundärantikörper: Anti-*mouse* HRP [Carl Roth GmbH], 1 µg/mL, Positivkontrolle (PK): CXCL8S72C-DL550, 0: ungereinigtes Reaktionsgemisch, PS: Proteinstandard, B: Blank

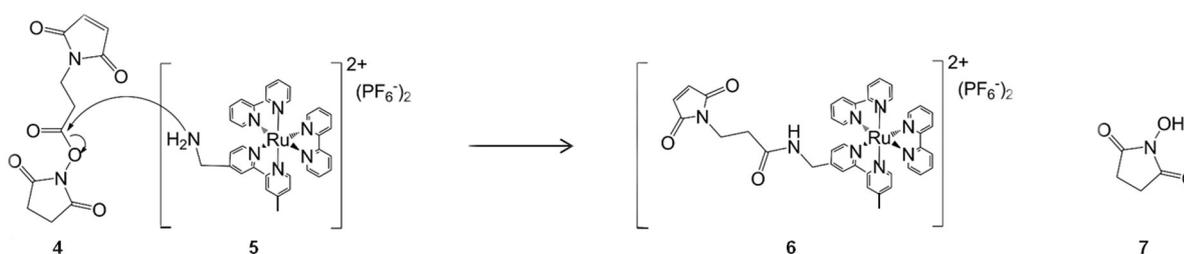
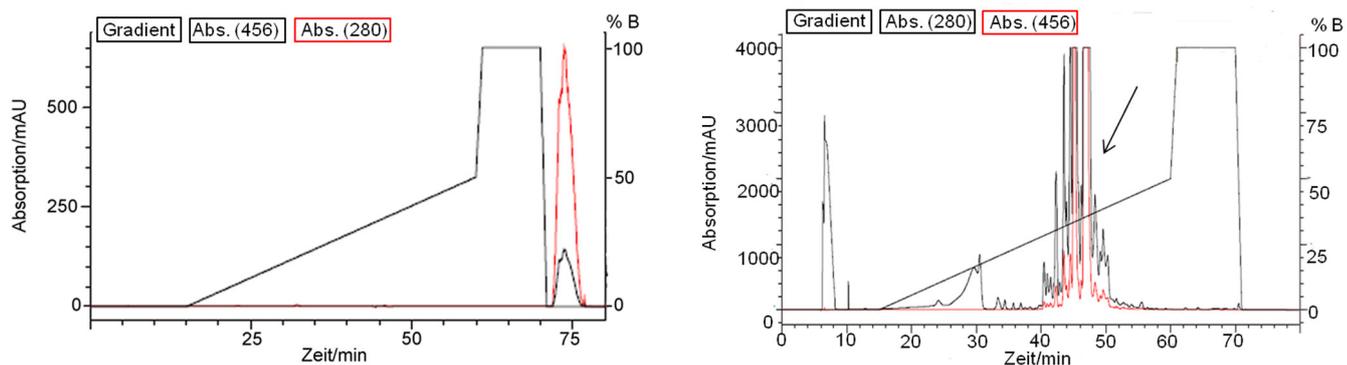


Abbildung 5.24: **Reaktionsmechanismus der Maleimid-Funktionalisierung von Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂) mit dem bifunktionalen Linker β-Maleimidopropionsäure-NHS-Ester**

handelt, zusammenpasst. Mit Ausnahme von CXCL8S72C-DL550, dessen Masse geringfügige Abweichungen zu dem kalkulierten Molekulargewicht aufweist, konnten alle Konjugate mit der erwarteten Masse im Massenspektrum nachgewiesen werden.

Neben diesen kommerziell erworbenen Fluoreszenzfarbstoffen sollte CXCL8S72C für zukünftige Experimente zusätzlich mit einem Rutheniumfluorophor konjugiert werden. Als Vorteile dieses Fluorophors sind die große Stokes-Verschiebung sowie die große Fluoreszenzhalbwertszeit zu nennen, welche ausführlich unter 5.4.1 erläutert werden (vgl. Abbildung 5.32). Hierzu stellte der Arbeitskreis von Prof. Dr. Plenio⁷, einen Übergangsmetallkomplex (Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)) **5** zur Verfügung. Zur Funktionalisierung wurde dieser zur Weiterreaktion mit CXCL8S72C mit dem im Arbeitskreis von Kevin Brahm und Julia Wack synthetisierten β-Maleimidopropionsäure-NHS-Ester **4** umgesetzt, wobei N-Hydroxysuccinimid **7** (NHS) als Nebenprodukt entsteht. Um die bei der chromatographischen Trennung des Reaktionsansatzes zur Funktionalisierung des (Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)) erhaltenen Peaks besser zuordnen zu können, wurde der nicht umgesetzte Übergangsmetallkomplex mit dem zur Trennung verwendeten Gradienten analysiert. Abbildung 5.25 zeigt die Chromatogramme des Übergangsmetallkomplexes sowie des Reaktionsgemischs. Das Edukt, in Niedrigsalz-PBS (35 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄) gelöst, eluierte nach Ende des Gradienten bei 0% Eluent B nach etwa 75 Minuten, was durch die Absorption bei 280 und 456 nm deutlich wird und zeigt, dass dieses Verfahren mit dem gezeigten Gradienten nicht zur Trennung des Rutheniumkomplexes geeignet ist. Ersteres Absorptionsmaximum ist auf die aromatischen Liganden des Komplexes zurückzuführen, letzteres stellt die Exzitationswellenlänge des Fluorophors dar. Das Chromatogramm des Reaktionsansatzes zeigt neben einer bei 280 nm absorbierender Fraktion, welche nicht reagierte Linker darstellen könnte, zwei

⁷ Eduard-Zintl-Institut, Organometallchemie, Technische Universität Darmstadt



(a) Edukt: Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)

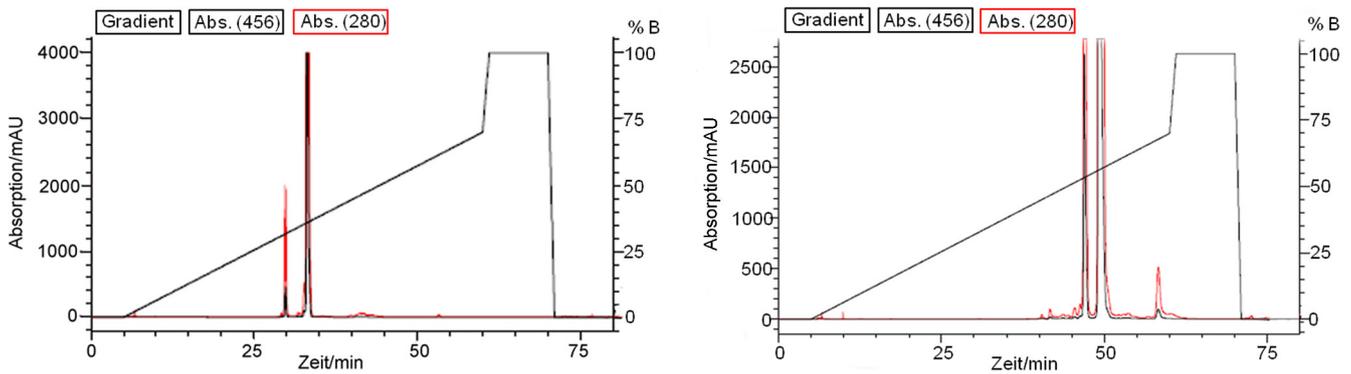
(b) Reaktionsansatz zur Funktionalisierung des Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)

Abbildung 5.25: **Umkehrphasenchromatographie des Eduktes und Reaktionsansatzes zur Funktionalisierung.** R_T : Retentionszeit, Eluent A: 95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA, Eluent B: 5 % H₂O, 95 % Acetonitril, 0,1 % TFA, NUCLEOSIL®300-7 C8 von Machery Nagel, Flußrate: 2 mL/min. a) Umkehrphasenchromatographie des Eduktes (Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)) zur Bestimmung der Retentionszeit. b) Umkehrphasenchromatographie zur Trennung des Reaktionsansatzes zur Funktionalisierung des Ru(II)-Komplexes mit einer Maleimidgruppe. Jene Peaks, welche sowohl bei 280 als auch 456 nm (Maximum des Rutheniumkomplexes) absorbieren, sind mit einem Pfeil markiert. Es wurden beide Fraktionen der kurz aufeinanderfolgenden Signale bei 45 und 47 Minuten (A und B) (35 und 36 % Acetonitril) lyophilisiert.

Signale mit hoher Absorption bei den genannten, relevanten Wellenlängen und mit 45 und 47 Minuten sehr ähnlichen Retentionszeiten, welche lyophilisiert wurden. Das erste Signal wird im Folgenden als Fraktion A, das zweite als B bezeichnet. Diese Signale können nicht auf die beiden Edukte zurückgeführt werden, da der Linker β -Maleimidopropionsäure-NHS-Ester nicht bei 456 nm absorbiert und die Retentionszeit des Übergangsmetallkomplexes nicht mit den hier zu sehenden Peaks übereinstimmt, sodass bei beiden Fraktionen Isomere des gesuchten Produkts, dem funktionalisierten Linker, vermutet wurden. Das Edukt, welches am Ende des Gradienten erwartet wurde, ist nicht mehr detektierbar. Geringere Peaks mit einer Absorption bei 280 nm könnten auf Verunreinigungen des Linkers oder mögliche Hydrolyseprodukte zurückzuführen sein. Die Retentionszeit des Linkers ist nicht bekannt. Die Ausbeute betrug 19 % für die früher und 16 % für die später eluierende Fraktion. Die Massen der Fraktionen wurden gravimetrisch bestimmt, allerdings müssen die bestimmten, geringen Mengen (0,3 und 0,4 mg) aufgrund des Wägefählers (Genauigkeit $\pm 0,1$ mg) als nicht zuverlässig angesehen werden. Daher wurde jeweils die gesamte Fraktion mit 0,25 Äquivalenten CXCL8S72C umgesetzt. Wie in Abbildung 5.26 zu sehen, wurden bei beiden Umsetzungen wiederum jeweils zwei aufeinanderfolgende Peaks detektiert, wobei bei A mit CXCL8S72C zwei Signale bei 30 und 33 Minuten zu sehen sind, während diese bei B bei 47 und 49 Minuten beobachtet werden können.⁸ Bei beiden Chromatogrammen zeigen die Peaks mit geringerer Retentionszeit die geringere Absorption im Vergleich zu den wenige Minuten später folgenden Peaks. Die aus der Reaktion von CXCL8S72C mit Fraktion A resultierenden Fraktionen eluieren zudem bei ähnlichen Hydrophobizitäten (32 und 36 % Acetonitril) wie jene der ersten Stufe (35 und 36 % Acetonitril), obgleich sich die Retentionszeiten aufgrund

⁸ Diese beiden chromatographischen Reinigungen wurden von Kevin Brahm durchgeführt.

der unterschiedlichen Gradienten unterscheiden. Aufgrund der ähnlichen Retentionszeiten der Signale der



(a) Reaktionsgemisch: CXCL8S72C mit Fraktion A

(b) Reaktionsgemisch: CXCL8S72C mit Fraktion B

Abbildung 5.26: **Umkehrphasenchromatographie des Reaktionsansatzes der Konjugation von CXCL8S72C mit Fraktion A und B.** R_T : Retentionszeit, Eluent A: 95 % H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), Eluent B: 5 % H₂O, 95 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), NUCLEOSIL®300-7 C8 von Machery Nagel, Flußrate: 2 mL/min. a) Reaktionsansatz Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)-Maleimid (Fraktion A)/CXCL8S72C: Es sind zwei aufeinanderfolgende Peaks bei 30 und 33 Minuten zu sehen (etwa 32 und 36 % Acetonitril) b) Reaktionsansatz Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)-Maleimid (Fraktion B)/CXCL8S72C: Es sind auch hier zwei aufeinanderfolgende Peaks bei 47 und 49 Minuten (etwa 55 und 59 % Acetonitril) zu sehen. Zur besseren Übersicht werden nur jene Peaks gezeigt, welche sowohl intensiv bei 280 nm als auch 456 nm absorbieren.

ersten Stufe mit jenen der Produkte der Reaktion CXCL8S72C/Fraktion A, welche in Abbildung 5.26a zu sehen sind, wurde vermutet, dass es sich hierbei um nicht umgesetzten, funktionalisierten Linker handelte, was jedoch der beobachteten Absorption bei 456 nm widerspricht. Da das Massenspektrum der Konjugate nicht auswertbar war, wurden die Proben mittels Western Blot hinsichtlich der Bindung zweier gegen das Chemokin gerichteter Antikörper sowie der Fluoreszenzintensität untersucht. Abbildung 5.27 zeigt das Ergebnis dieser Messungen, wobei CXCL8S72C als Positivkontrolle zweimal im Gel aufgetragen wurde (PK_a/PK_c und PK_b/PK_d). Beim direkten Vergleich der Fluoreszenzintensität mit der chemolumineszenten Aufnahme der Positivkontrolle (PK_b, CXCL8, detektiert durch Anti-Interleukin-8 [Sigma-Aldrich]) in der linken Aufnahme der Membran ist zu sehen, dass die fluoreszierenden Banden im Vergleich zum chemolumineszenten Signal (rechts) nach unten verschoben sind. Auffällig ist, dass die Fluoreszenzintensität über einen weiteren Bereich des Gels verteilt ist (links), anstatt eine diskrete Bande zu bilden. Diese Beobachtung wird auch bei einer SDS-PAGE mit einem G-Protein, das mit einem ähnlichen Ru-Komplex konjugiert wurde, in der Literatur beschrieben, wobei die Banden jedoch zu größeren Molekulargewichten hin verschoben sind (vgl. Abbildung 5.27).^[199] Diese Fluoreszenz war bei allen vier Elutionsfraktionen der Umkehrphasenchromatographie detektierbar. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde hierbei bei Probe B49 detektiert, allerdings konnte hieraus aufgrund nicht bestimmter Probenmengen keine Schlussfolgerung gezogen werden. Zusätzlich wurden alle Elutionsfraktionen mit gegen CXCL8 gerichteten Antikörpern untersucht. Neben dem bereits in Aktivitätsassays eingesetzten Antikörper von Sigma-Aldrich wurde ein speziell gegen den N-Terminus des Proteins gerichteter Antikörper ausgewählt, da sich die Markierung am C-Terminus des CXCL8 befinden sollte (PK_c). Bei Vergleich der mit unterschiedlichen Antikörpern inku-

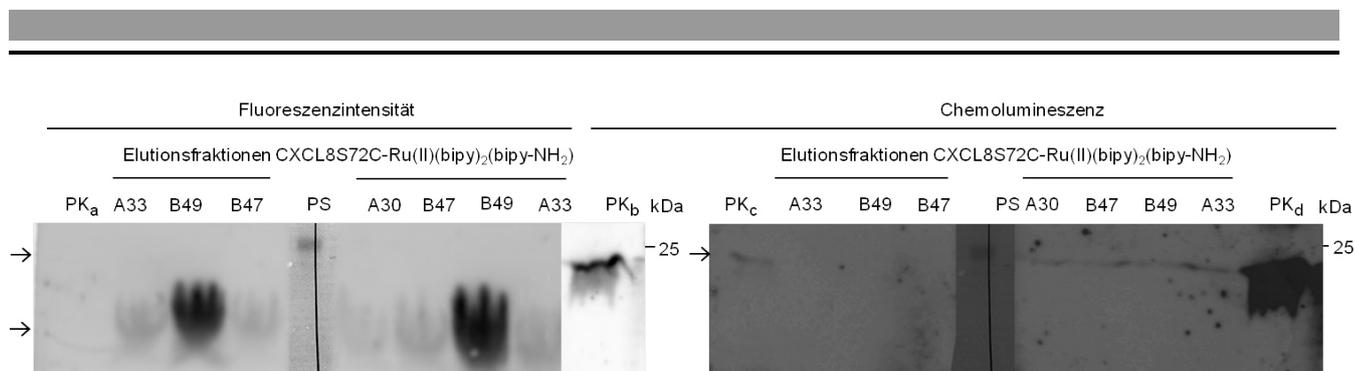


Abbildung 5.27: **Western Blot-Analyse der Elutionsfraktionen des Reaktionsansatzes CXCL8S72C/Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂) (funktionalisiert).** 10%ige SDS-PAGE, Es ist eine Membran bei unterschiedlichen Messmodi zu sehen, wobei CXCL8S72C (1,25 µg (0,15 nmol)) als Positivkontrolle zweimal auf dem Gel aufgetragen wurde. Dementsprechend handelt es sich bei PK_a und PK_c sowie PK_b und PK_d jeweils um dieselben Proben. Linke Aufnahme: Fluoreszenzintensitätsmessung der Positivkontrolle (PK_a) und der Elutionsfraktionen: Ex.: 460 nm, Em.: 670 nm neben der Chemolumineszenzmessung von CXCL8 (PK_b) mit *monoclonal* Anti-Interleukin-8 [Sigma-Aldrich], 1 µg/mL. Rechte Aufnahme: Chemolumineszenzmessung aller Spuren bei hoher Verstärkung nach Inkubation mit zwei verschiedenen Primärantikörpern gegen CXCL8, PK_c: Anti-IL8 MAB *rabbit* [Epitomics] Sekundärantikörper: Anti-*rabbit* HRP [Carl Roth GmbH] 1 µg/mL, 1:500, PK_d: *monoclonal* Anti-Interleukin-8 [Sigma-Aldrich], 1 µg/mL, 1:500, Sekundärantikörper: Anti-*mouse* HRP [Carl Roth GmbH] 1 µg/mL.

bierten Membranhälften ist anhand der Positivkontrolle eindeutig zu sehen, dass der rechts verwendete Antikörper der Firma Sigma-Aldrich (PK_d) stärkere Banden bei identischer Proteinmenge lieferte. Bei allen vier Produktfraktionen der Proteinkonjugation sind schwache Banden in Höhe der CXCL8S72C-Bande mit diesem Antikörper zu sehen. Das Fehlen dieser Signale bei Inkubation mit dem Antikörper der Firma Epitomics ist auf eine allgemein zu schwache Bandenintensität zurückzuführen. Zusammenfassend sprachen die Proteinbanden nach der Antikörperfärbung mit starker Fluoreszenz direkt unterhalb dieser dafür, dass in allen Elutionsfraktionen fluoreszent markiertes CXCL8S72C vorhanden ist.

Zur Berechnung der Proteinmenge wurde anhand des reinen Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂) ein CF von 4,27 bestimmt, woraus sich für Fraktion B49 eine Ausbeute von ungefähr maximal 40 % und für Fraktion A33 von unter 6 % ergibt. Diese Ausbeuten berücksichtigen zudem nicht die Proteinmenge der kleineren Fraktionen (A30 und B47, Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze und somit nicht zu bestimmen). Aufgrund der Proteinmengen nahe der Nachweisgrenze kann eine Ungenauigkeit der ermittelten Konzentration bei der Konzentrationsbestimmung über eine Absorptionsmessung bei 280 nm nicht ausgeschlossen werden. Da sich die zur Verfügung stehenden Analysemethoden, LC-MS und Western Blot, nicht zur Charakterisierung der Proben eigneten, konnte die Identität der einzelnen Fraktionen nicht geklärt werden. Eine massenspektrometrische Analyse mit schonender Ionisierung (z. B.: MALDI) steht aus.

5.4 Fluoreszenzanisotropie

Die Untersuchung einer Wechselwirkung zwischen Ligand und membrangebundenem GPCR mittels Fluoreszenzanisotropiemessung ist bereits für mehrere Ligand-Rezeptorpaare etabliert. Hierbei handelt es sich überwiegend um niedermolekulare Liganden wie Hormone mit den jeweiligen G-Protein-gekoppelten Re-

zeptoren wie beispielsweise dem Adenosin- (A_{2A}) oder Serotonin- ($5HT_{2C}$) Rezeptor.^{[125] [200]} Die Liganden sind kleine Biomoleküle, die demnach eine große Rotationsdiffusion besitzen, sodass die Bindung an ein größeres Molekül, den Rezeptor, durch welche diese Beweglichkeit stark eingeschränkt wird, durch Messung der Fluoreszenzanisotropie detektiert werden kann. Ein solcher Größenunterschied zwischen Ligand und Rezeptor ist Voraussetzung für einen solchen Assay. Bei der Markierung des Tracers muss zudem sichergestellt werden, dass kein sogenannter Propellereffekt stattfindet. Ist der Linker zwischen Protein und Fluorophor zu lang, so kann sich der Fluorophor unabhängig von der Beweglichkeit des Proteins bewegen und die gemessene Fluoreszenzanisotropie spiegelt lediglich die Beweglichkeit des Fluorophors, nicht aber jene des Proteins wieder. Das Prinzip eines kompetitiven Fluoreszenzanisotropie-Assays zum Screening von Inhibitoren ist in Abbildung 5.28 dargestellt. Die Bindung des Tracers, also des fluorescent markierten Liganden, resultiert in einer hohen Fluoreszenzanisotropie, welche durch Verdrängung des Tracers aus dieser Bindung durch unmarkierte Liganden wie zu testende Inhibitoren gesenkt wird. Hier-

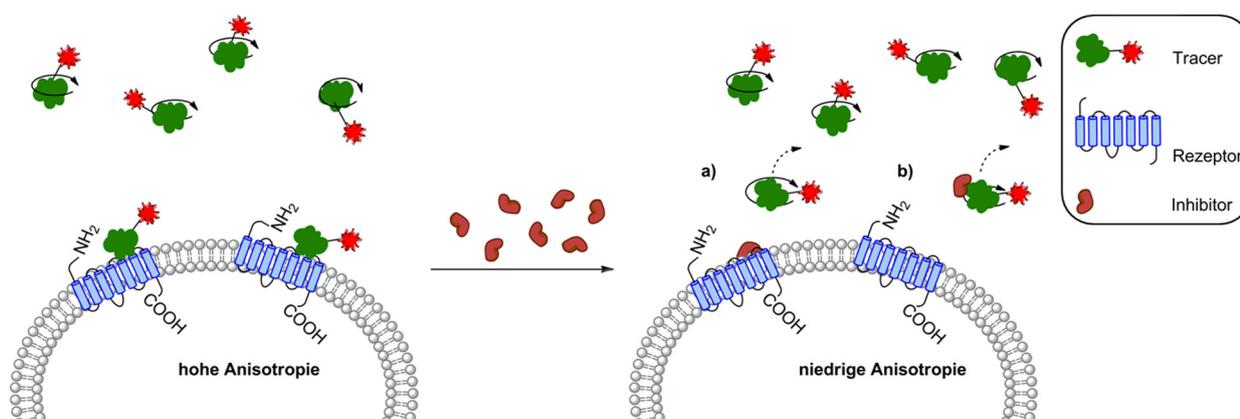


Abbildung 5.28: **Prinzip des auf Messung der Fluoreszenzanisotropie basierenden kompetitiven Bindungsassays.** Die ermittelte Fluoreszenzanisotropie berechnet sich anhand des emittierten Lichts sowohl freier als auch gebundener Tracermoleküle. Durch Bindung des Tracers sinkt dessen Beweglichkeit und die Fluoreszenzanisotropie steigt. Ungebundene Tracer sind in Lösung frei beweglich, was in niedrigeren Fluoreszenzanisotropiewerten resultiert. Sowohl an den Rezeptor bindende (a) als auch mit dem Tracer wechselwirkende Inhibitoren können in diesem homogenen Assay identifiziert werden.

bei ist es gleichbedeutend, ob dieser Kompetitor die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung durch Bindung an den Rezeptor oder den Tracer unterbindet. Die gemessene Fluoreszenzanisotropie stellt ein gewichtetes Mittel aller durch Photoselektion angeregten Tracermoleküle dar. Da der ermittelte Wert den Zustand des Tracers - frei oder gebunden - direkt reflektiert, kann der Assay homogen durchgeführt werden. Eine Trennung des gebundenen von freiem Tracer, wie im Fall eines Radioligand-Assays, ist somit nicht nötig.

5.4.1 Vergleich der Tracer

Für die Durchführung von Fluoreszenzanisotropiemessungen standen zwei Mikrotiterplattenlesegeräte, der Tecan Infinite[®]M1000 (im Folgenden kurz als M1000) und der Tecan Infinite[®]F200 (kurz: F200) zur Verfügung, wobei die Unterscheidung in den optischen Systemen liegt. Bei ersterem Gerät handelt es sich um

ein einen Monochromator enthaltendes Gerät mit Glasfaseroptik, während letzteres über ein Filtersystem mit Spiegeloptik verfügt. Beim Monochromator des Tecan Infinite[®]M1000 kann die Sensitivität zwar durch eine Änderung der Spaltbreite beeinflusst werden, jedoch stellt die Spiegeloptik das sensitivere System dar. Als Vorteil des Monochromators muss dagegen die größere Anzahl an möglichen Anregungswellenlängen (470, 530, 590 und 635 nm) gegenüber des Filtersystems am F200 (485 ± 20 nm) genannt werden.

Die Fluoreszenzanisotropiemessungen mit dem CXCL8/CXCR1(2)-System sollten mit Membranpräparationen der bereits vorgestellten transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt werden. Die Präparation der Plasmamembran wurde in einem TRIS-Puffer (50 mM TRIS, pH 7,5) durchgeführt. TRIS wird zudem neben HEPES-Puffern in vielen publizierten Fluoreszenzanisotropie-Assays sowohl in Konzentrationen von 50 als auch 10 nM verwendet, weshalb es auch hier mit dem ebenfalls als Pufferzusatz beschriebenen Detergenz Tween[®]20 (0,0005 %) getestet wurde.^{[200] [201] [202] [124]} Da Fluoreszenzanisotropiemessungen mit lebenden Zellen in Erwägung gezogen wurden, wurde neben dem genannten TRIS-T (50 mM TRIS, pH 7,5) auch der für Aktivitätsassays ausgewählte HHBS eingesetzt (vgl. 5.2).

Als Tracer sollte eines der angefertigten Proteinkonjugate ausgewählt werden. In Tabelle 5.2 sind die zur Anregung dieser Proteinkonjugate benötigten Wellenlängen in Verbindung mit dem hierzu zur Verfügung stehenden Gerät aufgelistet. Um einen geeigneten Tracer zu identifizieren und zu prüfen, ob die Konjugation

Tabelle 5.2: **Benötigte Anregungswellenlängen zur Fluoreszenzanisotropiemessung mit den hergestellten Proteinkonjugaten.**

Proteinkonjugat	Wellenlänge (Ex./Em.)	Gerät (tatsächlich verwendete Wellenlängen (Ex./Em.))
CXCL8S72C-CF TM 633	635/650 nm	M1000 (635 ± 5 nm/ 650 ± 5 nm)
CXCL8S72C-DL550	562/576 nm	M1000 (530 ± 5 nm/ 576 ± 5 nm)
CXCL8S72C-Fluorescein	485/520 nm	M1000 (470 ± 5 nm/ 535 ± 5 nm) & F200 (485 ± 20 nm/ 535 ± 25 nm)
CXCL8S72C-Ru(II)(bipy) ₂ (bipy-NH ₂)	456/634 nm	M1000 (470 ± 5 nm/ 634 ± 10 nm)

zu einer Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima führte, wurden Spektren der verschiedenen fluoreszent markierten Proteine aufgenommen. Abbildung 5.29 zeigt das Exzitations- und Emissionsspektrum von CXCL8S72C-Fluorescein. Das Maximum der Absorption befindet sich bei etwa 495 nm, jenes der

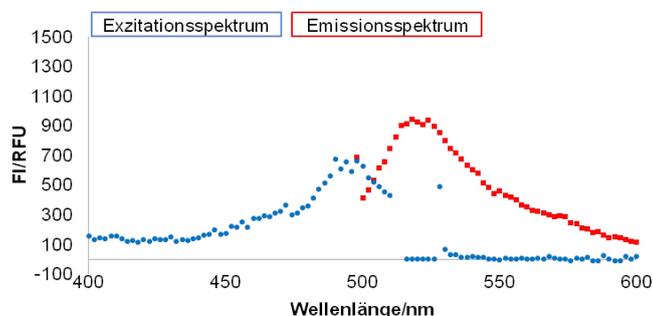


Abbildung 5.29: **Emissionsspektrum des Proteinkonjugats CXCL8S72C-Fluorescein.** MTP: 384 Well Flat Bottom Black Low Volume [Corning], 50 nM CXCL8S72C-Fluorescein in 50 mM TRIS-T, Exzitationswellenlänge zur Aufnahme des Emissionsspektrums: 480 ± 15 nm, Emissionswellenlänge zur Aufnahme des Exzitationspektrums: 520 ± 5 nm, Verstärkung: 150

Emission bei 520 nm. Ebenso wurden diese Spektren von CXCL8S72C-CFTM633 aufgenommen (vgl. Abbildung 5.30). Eine durch die Konjugation des Farbstoffs mit CXCL8S72C hervorgerufene Verschiebung des

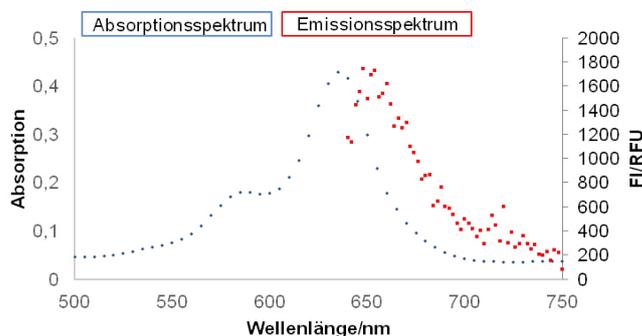


Abbildung 5.30: **Absorptions- und Emissionsspektrum von CXCL8S72C-CFTM633.** MTP: 384 Well Flat Bottom clear, UV transparent [Corning], 384 Well Flat bottom black [Corning], Verstärkung: 200, Exzitation: 630 ± 5 nm, $1,2 \mu\text{M}$ CXCL8S72C-CFTM633 in Niedrigsalz-PBS.

Exzitations- und Emissionsspektrums liegt auch bei diesem Konjugat nicht vor, sodass sichergestellt wurde, dass es sich bei 635 und 650 nm, der Exzitations- und Emissionswellenlänge von CFTM633-Maleimid, um die zur Fluoreszenzmessung optimalen Wellenlängen handelte.

Der dritte, potentieller Tracer, CXCL8S72C-DL550, besitzt eine Exzitations- und Emissionswellenlänge von 562/576 nm. Bei Aufnahme der in 5.31 dargestellten Spektren wurde eine weitere mögliche Anregungswellenlänge bei 530 nm identifiziert, welche sich in Form einer Schulter des Exzitationsmaximums äußert und vermutlich ermöglicht, mit Anregungswellenlängen im gesamten Bereich zwischen 530 und 550 nm anzuregen. Durch diese wurden Fluoreszenzanisotropiemessungen am Tecan Infinite[®]M1000 ermöglicht, da hier

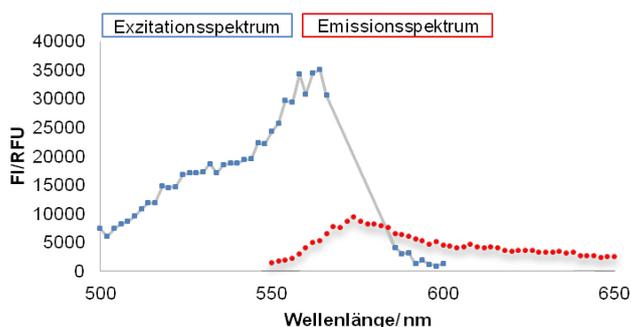


Abbildung 5.31: **Exzitations- und Emissionsspektrum von CXCL8S72C-DL550.** MTP: 384 Well Flat Bottom Black Polystyrene Low Volume, clear bottom, Tracerkonzentration: 200 nM in 10 mM TRIS, Exzitationswellenlänge zur Aufnahme des Emissionsspektrums: 530 ± 5 nm, Emissionswellenlänge zur Aufnahme des Exzitationsspektrums: 576 ± 5 nm, Verstärkung: 220

nur die Exzitationswellenlänge (530 nm) nicht aber die des Absorptionsmaximums (562 nm) eingestellt werden konnte.

Da die massenspektrometrische Identifizierung des mit einem maleimid-funktionalisierten Übergangsmetallkomplex konjugierten CXCL8S72C noch ausstand, wurde der unkonjugierte Übergangsmetallkomplex Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂) hinsichtlich seiner spektroskopischen Eigenschaften analysiert. In Abbildung 5.32

ist das Exzitations- und Emissionsspektrum zu sehen, wobei sich der Komplex mit einem Exzitationsmaximum bei 456 nm und einem Emissionsmaximum bei 634 nm durch eine große Stokes-Verschiebung von etwa 184 nm auszeichnet.

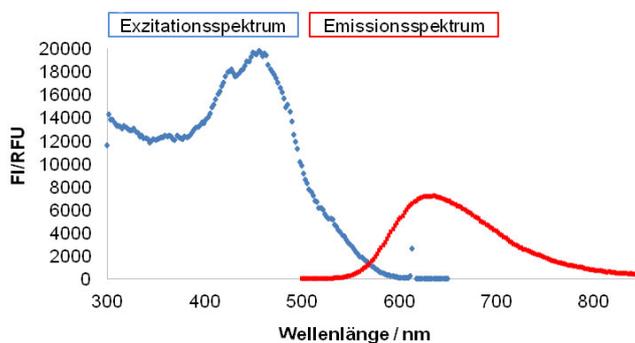
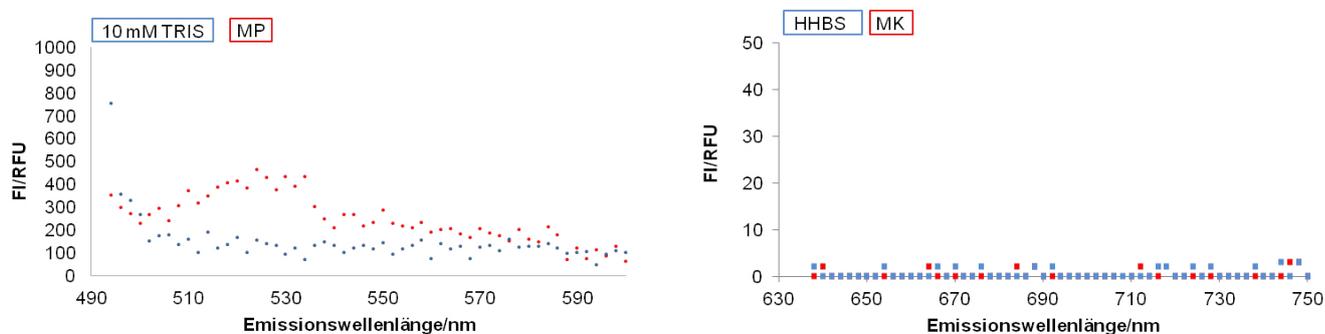


Abbildung 5.32: **Exzitations- und Emissionsspektrum des Übergangsmetallkomplexes Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)** Die Konzentration des Fluorophors betrug 0,8 mg/mL (886 μ M) in Natriumchlorid-PBS, MTP: 384 Well *Flat bottom black* [Corning], Verstärkung: 105, Bandbreite 20 nm

Das preiswerte Fluorescein stellt aufgrund seiner hohen Quantenausbeute einen gängigen Fluorophor in fluoreszenzbasierten Assays dar.^[203] Die Autofluoreszenz der Zellen ist jedoch ebenfalls im grünen Kanal zu finden.^[198] Um zu überprüfen, ob eine solche Störung zu erwarten war, wurden Emissionsspektren biologischer Proben sowohl bei einer Anregungswellenlänge im grünen Kanal (485 nm) als auch im roten Kanal, exemplarisch bei der Anregungswellenlänge des Farbstoffs CFTM633 (630 nm) aufgenommen. Das



(a) Membranpräparation HEK293/CXCR1-B8

(b) lebende Zellen HEK293/CXCR1

Abbildung 5.33: **Emissionsspektren zur Untersuchung der Autofluoreszenz einer Membranpräparation im grünen und lebender Zellen im roten Kanal.** (a) Membranpräparation HEK293/CXCR1-B8, 0,9 mg/mL, MTP: 384 Well *Flat bottom black* [Corning], Verstärkung: 200, Exzitation: 485 ± 5 nm (b) MK: Mischklon HEK293/CXCR1, MTP: 384 Well *Flat bottom black with clear bottom* [Corning].

Emissionsspektrum einer Plasmamembranpräparation ist in Abbildung 5.33a zu sehen. Obwohl die Autofluoreszenz in vitalen Zellen vorwiegend von Molekülen aus zytoplasmatischen Regionen verursacht wird, konnte bei der Anregungswellenlänge von Fluorescein bei der Membranpräparation im Vergleich zum Puffer (TRIS-T) ein Anstieg der Fluoreszenzintensität im Bereich von 500 bis 550 nm detektiert werden.^[198]

Abbildung 5.33b zeigt dagegen keine Autofluoreszenz der vitalen Zellen bei Wellenlängen größer 500 nm, wenn diese mit langwelligerem Licht (Anregungswellenlänge des Fluorophors CFTM633: 630 nm) angeregt werden, obwohl bei diesen, im Vergleich zu den gemessenen Plasmamembranpräparationen die höhere Autofluoreszenz vermutet wurde. Da die Autofluoreszenz in vitalen Zellen hauptsächlich im grünen Kanal stattfindet, wurde ein Versuchsaufbau mit Fluorescein-markiertem Ligand und vitalen Zellen von Beginn an ausgeschlossen und kein Spektrum vitaler Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm aufgenommen.

Aufgrund der Störungen durch Hintergrundfluoreszenz im grünen Kanal sollten erste Fluoreszenzanisotropiemessungen mit CXCL8S72C-CFTM633 durchgeführt werden, wobei jedoch ausnahmslos „invalid“-Werte am Messgerät ausgegeben wurden. Daher wurden die Rohdaten der Messung, aus welcher die Software unter Berücksichtigung des angegebenen Leerwerts die Fluoreszenzanisotropie berechnet, direkt betrachtet. Die

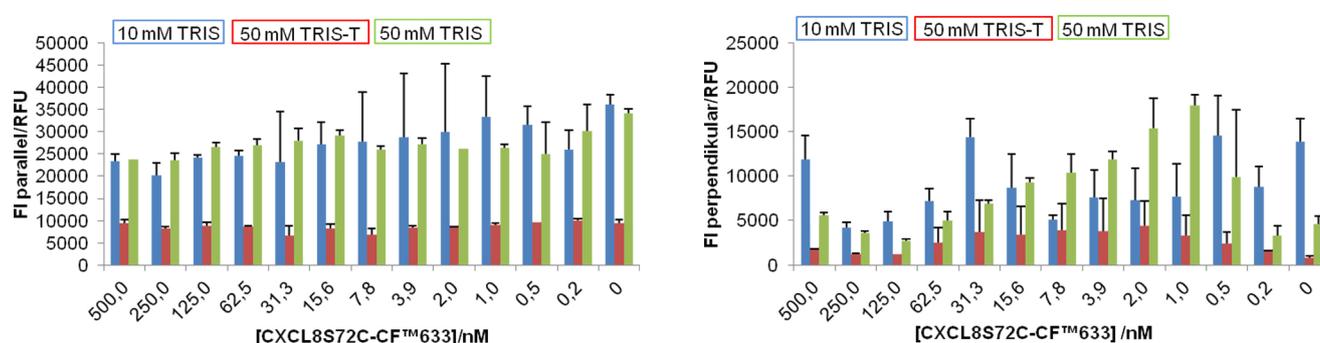


Abbildung 5.34: **Parallele und perpendikuläre Fluoreszenzintensitäten einer Verdünnungsreihe des Proteinkonjugats CXCL8S72C-CFTM**. MTP: 384 Well Flat bottom black with clear bottom [Corning], Verstärkung : 55, Exzitation: 635 ± 5 nm, Emission: 650 ± 5 nm, TRIS-T: 0,0005 % Tween.

parallelen und perpendikulären Intensitäten einer Verdünnungsreihe des Proteinkonjugats in verschiedenen Konzentrationen des zur Durchführung mit Membranpräparationen gewählten TRIS-Puffers sowie unter Zusatz von Tween[®]20 sind in Abbildung 5.34 zu sehen. Trotz steigender Tracerkonzentrationen konnte unter Berücksichtigung der Fehlerbalken kein Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden. Dies könnte ein Grund für die nicht auswertbare Fluoreszenzanisotropie sein. Auffallend war hierbei, dass der Leerwert selbst zumeist die höchsten Intensitäten lieferte, sodass die durch den Tracer hervorgerufenen Intensitäten vor dem hohen Hintergrund nicht detektierbar waren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem für Zellversuche getesteten HHBS als Puffer beobachtet (Daten nicht gezeigt), wobei vor allem die parallelen Fluoreszenzintensitäten mit zunehmender Fluorophorkonzentration sanken, sodass mit Fluorophor keine höheren Intensitäten als jene des Puffers detektiert wurden. Die reguläre Fluoreszenzmessung derselben Verdünnungsreihen (vgl. Abbildung 5.35) zeigte jedoch, dass die Fluoreszenzintensität des Tracers wie üblich mit der eingesetzten Konzentration linear ansteigt. Die in 10 und 50 nM TRIS erstellten Verdünnungsreihen unterschieden sich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht, wohingegen TRIS-T zu höheren Fluoreszenzintensitäten führte. Diese Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Proteinstocks, auch in Niedrigsalz-PBS und HHBS, erhalten. Nachdem CXCL8S72C-CFTM633 in Fluoreszenzanisotropiemessungen getestet wurde, wurde untersucht, ob CXCL8S72C-DL550

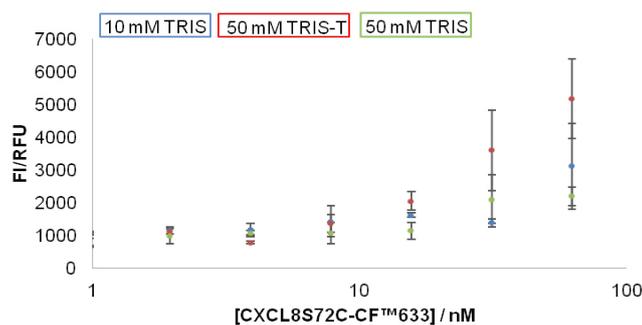


Abbildung 5.35: **Fluoreszenzintensitätsmessung der Verdünnungsreihe CXCL8S72C-CFTM633 in verschiedenen Puffersystemen.** MTP: 384 Well *Flat bottom black with clear bottom* [Corning], Verstärkung: 247, Exzitation: 630 ± 5 nm, Emission: 650 ± 7 nm, TRIS-T: 0,0005 %.

auch bei einer Anregungswellenlänge der Schulter des Exzitationsmaximums und somit zu Fluoreszenzanisotropiemessungen am Tecan M1000 eingesetzt werden kann. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität einer Verdünnungsreihe des Proteinkonjugats bei beiden Anregungswellenlängen und einer Emissionswellenlänge von 576 nm gemessen (Abbildung 5.36). Bei einer Exzitationswellenlänge von 530 nm wurden im Vergleich

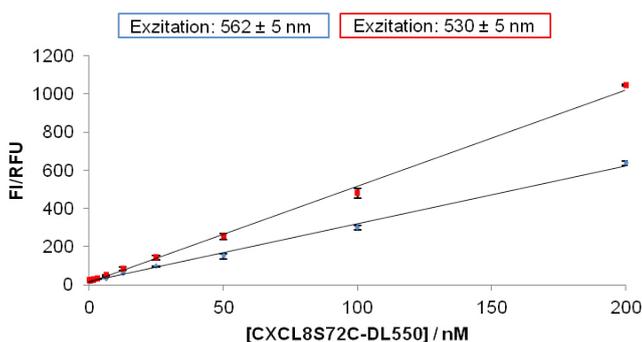


Abbildung 5.36: **Fluoreszenzintensitätsmessung von CXCL8S72C-DL550 bei den Anregungswellenlängen 530 und 560 nm.** MTP: 384 Well *Flat Bottom clear, UV transparent* [Corning], 384 Well *Flat bottom black* [Corning], Verstärkung : 150, Exzitation: 530 ± 5 nm und 562 ± 5 nm in 10 mM TRIS-T, Mittelwert einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung.

zur Anregung mit der eigentlich maximalen Exzitationswellenlänge von 562 nm größere Fluoreszenzintensitäten erhalten, was zeigte, dass eine Messung der Fluoreszenzanisotropie dieses Tracers am M1000 möglich ist und es sich hierbei aufgrund der offenbar größeren Quantenausbeute auch um die günstigere Anregungswellenlänge handelt.

Zusätzlich wurde die Fluoreszenzintensität einer Verdünnungsreihe des Übergangsmetallkomplexes Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂) - zur Charakterisierung dieses Fluorophors - gemessen (vgl. Abbildung 5.37). Die Kalibriergerade des unkonjugierten Übergangsmetallkomplexes zeigte bis etwa zu einer Konzentration von 200 nM auch bei der höchsten Detektorverstärkung keinen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität, wohingegen im Vergleich hierzu bei CXCL8S72C-DL550 und CXCL8S72C-CFTM633 bereits im Bereich von 50 nM eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität sichtbar war. Der Tracer muss in Konzentrationen im Bereich der vermuteten Affinitätskonstante eingesetzt werden, um diese korrekt anhand der Bindungskurve berechnen zu können, was zeigt, dass die Fluoreszenzintensitäten des Ru-Komplexes für die hier

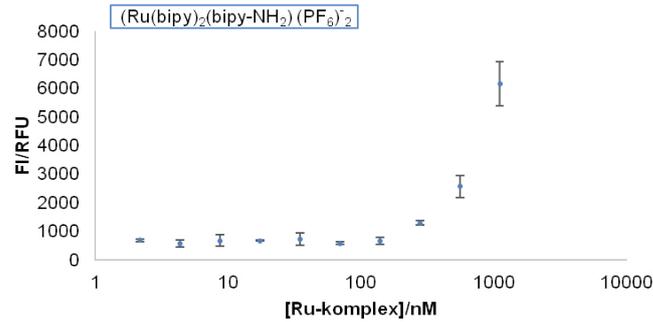


Abbildung 5.37: **Fluoreszenzmessung einer Verdünnungsreihe des Übergangsmetallkomplexes** Exzitation: 456 ± 5 nm, Emission: 634 nm Verstärkung: 255, Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung, Bestimmtheitsmaß: 0,96

geplanten Fluoreszenzanisotropiemessungen zu gering waren. Aufgrund der großen Stokes-Verschiebung, welche dazu dienen kann, den Einfluss der Autofluoreszenz im grünen Kanal der Proben zu minimieren, wurde die Konjugation des Komplexes mit CXCL8S72C trotzdem durchgeführt, da das Konjugat für zukünftige fluorometrische Messungen mit biologischen Proben interessant sein könnte.

Da die Fluoreszenzanisotropie von CXCL8S72C-CFTM633 nicht detektierbar war und das mit dem Übergangsmetallkomplex markierte Protein nicht isoliert werden konnte, wurden die gut verfügbaren Konjugate CXCL8S72C-Fluorescein und CXCL8S72C-DL550 zur Etablierung von Fluoreszenzanisotropiemessungen mit Membranpräparationen gewählt.

Diese Tracer wurden hinsichtlich des durchzuführenden Fluoreszenzanisotropieversuchs verglichen. Um die Bindung des Tracers an den Rezeptor detektieren zu können, muss sich die Fluoreszenzanisotropie des frei beweglichen Moleküls deutlich von jener des gebundenen und somit unbeweglicheren unterscheiden. Die Beweglichkeit eines Moleküls sinkt nach der in 1.17 angegebenen Formel mit zunehmender Viskosität und abnehmender Temperatur. Zur Messung des freien Zustands wurden die Parameter Viskosität und Temperatur so gewählt, dass die Beweglichkeit der Fluorophore groß ist. Hierzu wurden dieselben Proben in TRIS-T bei 30 °C gemessen. Um den unbeweglichen Zustand näherungsweise zu imitieren, wurden sowohl die maleimidfunktionalisierten Fluorophore als auch die entsprechenden Proteinkonjugate in 80 %igem Glycerin/TRIS-T gelöst und die mit Fluorophoren beladene Mikrotiterplatte kurze Zeit (unter fünf Minuten) bei 4 °C vor der Messung gekühlt. Dieser Versuchsaufbau diente der näherungsweisen Bestimmung der intrinsischen Fluoreszenzanisotropie eines Fluorophors, jener Fluoreszenzanisotropie, welche im unbeweglichen Zustand des Fluorophors ohne depolarisierende Ereignisse gemessen wird und auf die unterschiedliche Orientierung von Absorptions- und Emissionsdipolmoment zurückzuführen ist.^{[118] [204]} Die absolute Temperatur der Lösung konnte aufgrund des geringen Volumens (20 µL) nicht bestimmt werden. Eine Kühlung der Lösungen im Messgerät war aus gerätespezifischen Gründen nicht möglich. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 5.38 zu sehen. Beim Vergleich der Maleimid funktionalisierten Fluorophore gegen die Proteinkonjugate in Lösung ist die Fluoreszenzanisotropie letzterer größer als jene der unkonjugierten Fluorophore. Fluorescein-5-Maleimid zeigte mit einer Zunahme um das Zehnfache die größte Differenz in der Fluoreszenzanisotropie zwischen beiden Zuständen gefolgt von CXCL8S72C-Fluorescein, welches bei hoher Viskosität und tiefer Temperatur eine vierfach höhere Fluoreszenzanisotropie aufwies. Die Fluoreszenzanisotropie von DyLight[®]550-Maleimid stieg von 206 auf 344 mAU, dagegen wurde CXCL8S72C-DL550 im

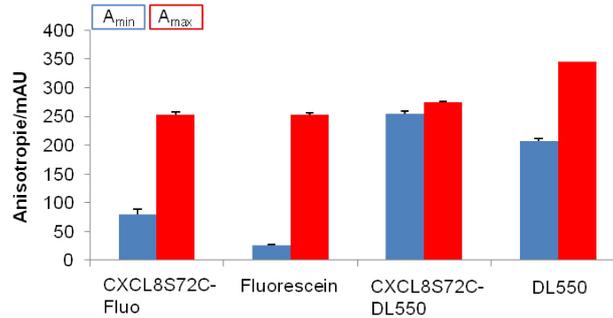


Abbildung 5.38: **Messung der Fluoreszenzanisotropie der Proteinkonjugate CXCL8S72C-Fluorescein und -DL550 sowie der entsprechenden Fluorophore bei geringer und hoher Beweglichkeit.** MTP: 384 Well Flat Bottom Black [Corning], Die Messung der in TRIS-T gelösten Fluorophore und Konjugate (A_{\min}) wurde bei 30°C durchgeführt, während A_{\max} die Fluoreszenzanisotropie der zuvor bei 4°C gekühlten Tracer in 80% Glycerin/TRIS-T darstellt. Konzentrationen: CXCL8S72C-Fluorescein und Fluorescein-5-Maleimid: 46 nM, CXCL8S72C-DL550: 200 nM, DyLight®550-Maleimid: etwa maximal 94 nM. Exzitationswellenlängen: 530 ± 5 nm und 470 ± 5 nm, Emissionswellenlängen: 576 ± 5 nm, 535 ± 5 nm, Verstärkung: 100, mAU: *milli Anisotropy Units*

Vergleich von Temperatur und Viskosität weniger beeinflusst. Das Proteinkonjugat zeigte mit einer Änderung von 254 auf 275 mAU fast keine Erhöhung der Fluoreszenzanisotropie. Zusätzlich war diese Differenz des beweglicheren und unbeweglicheren Konjugats geringer als bei CXCL8S72C-Fluorescein. Beides ließ vermuten, dass der Fluorophor - im Vergleich zu Fluorescein - relativ rigide an CXCL8 selbst gebunden ist und somit auch im beweglicheren Zustand bereits eine hohe Fluoreszenzanisotropie zeigt. Interessanterweise besaß CXCL8S72C-DL550 in Glycerin eine geringere Fluoreszenzanisotropie und damit eine höhere Beweglichkeit als der freie Farbstoff. Die Fluoreszenzanisotropie des unbeweglicheren Zustands war wie zu erwarten in beiden Fällen für Farbstoff und Konjugat gleich.

Trotz der geringen dynamischen Breite des mit DyLight®550-Maleimid konjugierten CXCL8S72C wurde dieses Konjugat neben CXCL8S72C-Fluorescein aufgrund der Autofluoreszenz der Membranpräparationen im grünen Kanal für erste Fluoreszenzanisotropiemessungen zur zukünftigen Etablierung eines Fluoreszenzanisotropie-Assays genutzt.

Die Fluoreszenzanisotropie des frei beweglichen Tracers schwankte bei beiden Konjugaten bei der Durchführung unabhängiger Experimente trotz konstanter Versuchsparameter. Insbesondere zeigte CXCL8S72C-DL550 konzentrationsunabhängig beim Vergleich unterschiedlicher Experimente maßgebliche Unterschiede zwischen etwa 200 und 270 mAU. Zudem zeigten erste Vorversuche hierzu bereits, dass die Reproduzierbarkeit stark abhängig von der Fluoreszenzanisotropie des Tracers zu Beginn des Experiments, A_0 war. Zur Analyse der unterschiedlich hohen Fluoreszenzanisotropiewerte von CXCL8S72C-DL550 in Lösung wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzanisotropie von der Temperatur mit jener der Fluorescein-Konjugate verglichen. Dazu wurde ein Temperaturbereich gewählt, welcher möglichen experimentellen Bedingungen entspricht. Die die Tracerlösungen enthaltenden MTP wurden bei 4°C gekühlt. Da eine Kühlung des Messgeräts (Tecan Infinite®M1000) nicht möglich war, wurde die Messung bei Raumtemperatur (20°C) begonnen und diese Temperatur schrittweise erhöht, sodass eine Änderung der Fluoreszenzanisotropie mit steigender Temperatur untersucht werden konnte. Die Fluoreszenzanisotropie des Fluorescein-5-Maleimid sowie des

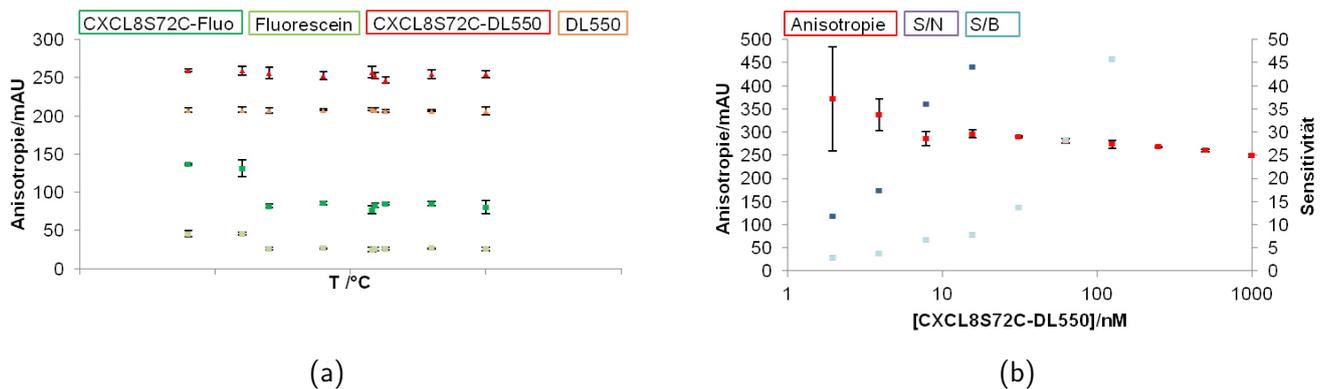


Abbildung 5.39: **Einfluss der Temperatur und der Tracerkonzentration auf die Fluoreszenzanisotropie.** Exzitation: 530 ± 5 nm und 470 ± 5 nm, Emission: 576 ± 5 nm und 535 ± 5 nm, TRIS-T: 0,0005 % Tween. (a) Tracerkonzentration CXCL8S72C-DL550: 200 nM; DL550: maximal etwa 94 nM, CXCL8S72C-Fluorescein und Fluorescein-5-Maleimid: 46 nM, MTP: 384 Well *Flat Bottom Black Low Volume* [Corning], Verstärkung : 100 (b) MTP: 384 Well *Flat bottom black* [Corning], Verstärkung: 97, SB: *Signal-to-Background*, SN: *Signal-to-Noise*. Die die Sensitivität angegebenden Werte beziehen sich auf die perpendikulären Intensitäten und wurden nach Zhang *et al.* berechnet.^[136]

CXCL8S72C-Fluorescein sanken während der zweiten Messung von 46 und 135 mAU auf 26 bzw. 82 mAU, während im Fall der auf DyLight[®]550-Maleimid basierenden Moleküle keine signifikante Änderung der Fluoreszenzanisotropie ersichtlich war, sondern diese bei 260 mAU (CXCL8S72C-DL550) und 208 mAU (DyLight[®]550-Maleimid) konstant blieb.

Zudem wurde für CXCL8S72C-DL550 der Einfluss der Konzentration des Proteins auf die gemessene Fluoreszenzanisotropie untersucht (vgl. Abbildung 5.39b). Anhand der Standardabweichungen der Fluoreszenzanisotropiemessung einer Verdünnungsreihe von CXCL8S72C-DL550 wurde deutlich, dass konstante Werte mit dem reinen Puffer als Leerwert frühestens ab Konzentrationen zwischen 4 und 8 nM Tracer erhalten wurden und der Mittelwert der Fluoreszenzanisotropie mit steigender Tracerkonzentration sank. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung waren diese Werte nicht zu verwenden und es wurde deutlich, dass verlässliche Werte der Fluoreszenzanisotropie nur mit höheren Konzentrationen an CXCL8S72C-DL550 erhalten werden können, da der Mittelwert dieser Messungen höher liegt und somit hohe Fluoreszenzanisotropiewerte suggeriert werden würden. Diese Messung erfolgte mit einem Volumen von 20 μ L je 384-Wellkavität. Eine zweite Messung in den zu Bindungsstudien genutzten, komponentensparenden *low volume*-MTP mit geringeren Volumina von 12 μ L zeigte, dass hier eine deutlich höhere Konzentration - zwischen 125 und 250 nM - für konstante Werte der Fluoreszenzanisotropie benötigt wurde. In Anbetracht dieser geringen Volumina war jedoch auch die Schichtdicke der Proben gering, was die Messgenauigkeit ebenfalls beeinflusste. Zudem wurde zur Ermittlung der minimal verwendbaren Konzentration an CXCL8S72C-DL550 einerseits das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (S/N, *Signal-to-noise*), andererseits das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (S/B, *Signal-to-Background*) nach Zhang *et al.* berechnet und mit der jeweiligen Fluoreszenzanisotropie verglichen. Formel 5.1 zeigt die Berechnung des S/N. Bei dieser Größe wird auch die Streuung der Hintergrundsignale (σ) - hier die Intensitäten des Puffers - mit einbezogen, während die in Formel 5.2 dargestellte Größe des S/B lediglich die Mittelwerte (μ) des Signals zu jenem des

Hintergrunds in Relation setzt.^[136] Somit verdeutlicht der S/B, inwiefern sich die Intensitäten der Tracer enthaltenden Lösungen von jenen des Puffers unterscheiden.

$$\frac{S}{N} = \frac{\mu_{\text{Signal}} - \mu_{\text{Hintergrund}}}{\sigma_{\text{Hintergrund}}} \quad (5.1)$$

$$\frac{S}{B} = \frac{\mu_{\text{Signal}}}{\mu_{\text{Hintergrund}}} \quad (5.2)$$

Die berechneten S/N und S/B stiegen erwartungsgemäß mit zunehmender Konzentration. Von stabilen Fluoreszenzanisotropiewerten, welche aus den perpendicularen und parallelen Intensitäten berechnet werden, wurde erst ab einem S/B der perpendicularen Intensitäten, aufgetragen als Sensitivität, im Bereich von vier bis sieben (Bereich zwischen dem zweiten und dritten Messpunkt) erhalten. Der entsprechende S/N-Wert beginnt bei etwa zwölf und beträgt bei einem S/B von vier 17, obgleich die Werte dieser dreifachen Messung im Vergleich zu höheren Konzentrationen noch stark schwanken (337 ± 35 mAU). Der hier gezeigten Berechnung liegen exemplarisch die perpendicularen Intensitäten zugrunde. Die parallelen Intensitäten wiesen zwar bessere Verhältnisse (S/N: 31, S/B: 7 im zweiten Messpunkt) auf, jedoch addieren sich die Fehler, sodass man anhand dieser Ergebnisse eher größere Werte von S/B benötigte. Laut Angaben der Firma Tecan Group AG sollte ein *Signal-to-Noise* von mindestens vier bereits zu konstanten Fluoreszenzanisotropiewerten führen, wobei nicht näher angegeben wird, welche Berechnung diesem Wert zugrunde gelegt wird.^[205] Wird eine Tracerkonzentration entsprechend eines S/N von vier nach der hier angegebenen Formel gewählt, so zeigten die Werte der Fluoreszenzanisotropie noch starke Schwankungen, sodass aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse mit geringeren Standardabweichungen der Fluoreszenzanisotropie ab dem zweiten Messpunkt die Tracerkonzentrationen so gewählt wurde, dass der S/B mindestens vier betrug (vgl. Abbildung 5.39b).

Zusammenfassend zeigte sich im Vergleich der hergestellten Tracer, dass CXCL8S72C-CFTM633 nicht als Tracer in Fluoreszenzanisotropiemessungen eingesetzt werden konnte. Trotz der Vorteile der langen Fluoreszenzlebensdauer und der großen Stokes-Verschiebung des Übergangsmetallkomplexes Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂), die eine Messung außerhalb des Bereichs der Autofluoreszenz biologischer Proben ermöglicht, zeigte sich bei Messung der Fluoreszenzintensität einer Verdünnungsreihe des unkonjugierten Fluorophors, dass sich dieser Fluorophor aufgrund der zu geringen Fluoreszenzintensität nicht für einen Fluoreszenzanisotropie-Assay eignet. Von den beiden verbleibenden Tracern war das DL550-Konjugat eigentlich ebenfalls nicht geeignet (vgl. Abb. 5.38), wurde aber verwendet für den Fall, dass die Autofluoreszenz im grünen Bereich ggf. doch stört. Dieses Proteinkonjugat absorbiert bei einer Wellenlänge von 530 nm, die einer der Anregungswellenlängen des M1000 für Anisotropiemessungen entspricht, ebenfalls stark und es ergeben sich hieraus im Vergleich zur Anregung im Absorptionsmaximum bei 562 nm sogar größere Fluoreszenzintensitäten. Der Vergleich der Fluoreszenzanisotropie der Fluorophore Fluorescein-5-Maleimid und DL550-Maleimid mit den entsprechenden Proteinkonjugaten zeigte zudem, dass die Fluoreszenzlebensdauer des Fluoresceinkonjugats ausreicht, um die Beweglichkeit des 8,4 kDa großen CXCL8S72C mittels Fluoreszenzanisotropie zu messen, weshalb für weitere Experimente CXCL8S72C-DL550 trotz der geringen

dynamischen Breite und CXCL8S72C-Fluorescein trotz der Autofluoreszenz der Membranpräparationen ausgewählt wurden.

In Bezug auf die minimal einsetzbare Tracerkonzentration sollte mindestens ein S/B von vier gewählt werden, um verlässliche Fluoreszenzanisotropiewerte zu erhalten. Dieses Verhältnis wurde bei jedem Experiment mit den Intensitäten der Lösung der maximalen Konzentration des Bindungspartners als Hintergrund berechnet, um die Fluorophorkonzentration bei der Durchführung mit unterschiedlichen Bindungspartnern und Chargen an Membranpräparation ggf. anzugleichen. Für CXCL8S72C-Fluorescein betrug die Konzentration demnach 50 - 400 nM, jene des CXCL8S72C-DL550 100 - 150 nM.

5.4.2 Hintergrundkorrekturen bei Fluoreszenzanisotropiemessungen

Die Fluoreszenzanisotropie berechnet sich aus der Fluoreszenzintensität des parallel und senkrecht zur Polarisationssebene des Anregungslichts emittierten Lichts. Tragen die unmarkierten Rezeptormoleküle oder andere Biomoleküle in der Zelle oder der Membranpräparation durch Autofluoreszenz zu diesen Intensitäten bei, kann dieses nicht vom emittierten Licht des fluoreszent markierten Liganden (Tracer) unterschieden werden, sodass die Interpretation der Bindungsisotherme verfälscht werden könnte.

Um einen Einfluss der Membranpräparation oder der Proteinlösung, welche als Bindungspartner dient, aus dem ermittelten Fluoreszenzanisotropiewert auszuschließen, wurde anstelle des reinen Puffers als Leerwert die entsprechende Lösung des Bindungspartners zur Berechnung der Fluoreszenzanisotropie gewählt (dieses Vorgehen entspricht der Durchführung von Fluoreszenzanisotropiemessungen von Harris *et al.*).^[174] Hierzu wurde bei allen Versuchen eine zusätzliche Probe jeder Konzentration der Verdünnungsreihe ohne Tracerlösung gemessen. Damit diese Hintergrundproben dasselbe Volumen wie die fluoreszenten Lösungen hatten, wurde das fehlende Volumen an Puffer zugesetzt.

Zudem kann es bei der Bindung des Tracers an den Rezeptor zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität des Tracers kommen, welche mit Hilfe der Intensität des freien Tracers mit der des gebundenen korrigiert werden kann.^{[131][132]} Hierzu wurde die in Kapitel 1.3 erläuterte, von Dandliker *et al.* erstellte Formel genutzt (vgl. Formel 1.20).

5.4.3 Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen im Fluoreszenzanisotropie-Assay

Weitere benötigte Parameter zur Durchführung eines Bindungsexperiments, wie beispielsweise die Inkubationszeit bis zur Gleichgewichtseinstellung, wurden in Anlehnung an die bereits etablierten (Radioligand-) Bindungsassays mit dem CXCL8/CXCR1/2-System gewählt und mit jenen Versuchsparametern etablierter Fluoreszenzanisotropie-Assays (Menge an Membranpräparation je Kavität) kombiniert.^{[122][92][124][200]} Beim Aufbau eines auf Fluoreszenzanisotropiemessungen basierenden Bindungsassays müssen die in Abbildung 5.40 schematisch dargestellten Wechselwirkungen berücksichtigt werden: So ist eine unspezifische Bindung sowohl des Fluorophors als auch des Proteins, welche zusammen den Tracer bilden, mit der Membran möglich ((d) und (f)), wobei beides Bindungsversuche zumeist stört. Die Bindung des Proteins an die Rezeptoren ((e)) und Glykosaminoglykane (zur besseren Übersicht nicht in der Abbildung dargestellt) stellt eine spezifische Bindung dar, wobei die Erstgenannte jene ist, welche untersucht werden soll. Zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen kann BSA zugegeben werden, wobei die Wechselwirkung

dieses Proteins mit Fluorophor und Chemokin überprüft werden muss ((a) und (b)). Alternativ können unspezifische Wechselwirkungen ermittelt werden, indem ein Überschuss an unmarkiertem Ligand zusätzlich zugegeben wird, sodass der Tracer aus der Rezeptorbindung verdrängt und nur die unspezifischen Wechselwirkungen gemessen werden. Auch hier muss die Wechselwirkung mit dem Tracer in Betracht gezogen werden. Da es sich hierbei um einen homogenen Assay handelt, welcher auf Änderungen der Rotationskor-

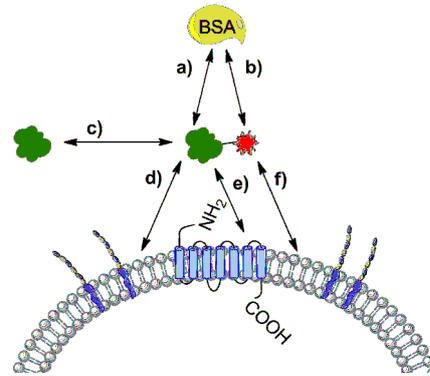


Abbildung 5.40: **Bei Bindungsstudien mittels Fluoreszenzanisotropie relevante Wechselwirkungen des Tracers.** Das zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen verwendete BSA (gelb) kann sowohl mit dem Protein (grün) ((a)) als auch mit dem Fluorophor (rot) wechselwirken ((b)). Wird ein Überschuss unmarkierten Ligands (grün) zugegeben, muss eine Dimerisierung mit dem Tracer (grün-rot) berücksichtigt werden ((c)). Bei Inkubation mit einer Plasmamembran ist neben der spezifischen Wechselwirkung des Tracers mit dem Rezeptor (blau,e) auch eine unspezifische Bindung des Proteins zur Plasmamembran sowie die spezifische Bindung zu GAGs (blau-gelb) vorhanden ((d)). Zuletzt muss geprüft werden, ob der Fluorophor mit der Plasmamembran wechselwirkt ((f)).

relationszeit und damit des molekularen Volumens des fluoreszent markierten Moleküls (Tracers) basiert, trägt jede dieser Bindungen zur detektierten Fluoreszenzanisotropie (r_{gesamt}) bei (vgl. Formel 5.3).

$$r_{gesamt} = f_1 * r_{frei} + f_2 * r_{RL} + f_3 * r_{us} \quad (5.3)$$

r_{frei} steht für die Fluoreszenzanisotropie des ungebundenen Tracers, r_{RL} für jene des rezeptorgebundenen und r_{us} für jene des unspezifisch gebundenen Tracers. Der Beitrag an letzterer (r_{us}) beinhaltet die in Abbildung 5.40 dargestellten, möglichen Wechselwirkungen. Der Häufigkeit der einzelnen Bindungen entsprechend erfolgt eine Gewichtung der Fluoreszenzanisotropie der einzelnen Wechselwirkungen durch f_i . Die Summe dieser Faktoren ergibt eins:

$$\sum f_i = 1 \quad (5.4)$$

Wird in Bindungsassays eine Sättigung erreicht, kann der K_D aus dem Wendepunkt der Kurve im halblogarithmischen Maßstab bestimmt werden. Aufgrund der Anzahl an möglichen, sich überlagernden Bindungsgleichgewichten war eine Berechnung des K_D der Bindung von CXCL8 an CXCR1(2) mit Hilfe der aus

Bindungskurven mit Membranpräparationen erhaltenen Parameter jedoch nicht möglich. Bei einer Berechnung des K_D (CXCL8/CXCR1(2)) durch nicht-lineare Regression der Bindungskurve wird die Anzahl an Rezeptormolekülen benötigt, welche jedoch aus selbigem Grund ebenfalls noch nicht zur Verfügung steht. Die ermittelten Wendepunkte stellen nur eine apparente Bindungskonstante dar und werden im Folgenden zum Vergleich der einzelnen Durchführungen sowie zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit bezüglich der Gesamtproteinmenge der Membranpräparation angegeben.

Um zu überprüfen, mit welchen dieser möglichen Wechselwirkungen zu rechnen ist, und anhand dieser Ergebnisse eine geeignete Methode zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen des fluoreszent markierten CXCL8S72C mit der Membranpräparation zu unterbinden, wurde die Fluoreszenzanisotropie einzelner Komponentenpaare zur Überprüfung der Wechselwirkungen gemessen.

Zugabe von BSA

Zur Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen wird oftmals BSA als Pufferzusatz verwendet.^{[42][117]} Um zu prüfen, ob BSA eingesetzt werden kann, musste die Wechselwirkung des Tracers mit diesem Protein kontrolliert werden.

In Abbildung 5.41 ist das Ergebnis der Inkubation einer Verdünnungsreihe von BSA sowohl mit den Tracern CXCL8S72C-Fluorescein/-DL550 als auch mit den freien Fluorophoren zu sehen. Die Fluoreszenzintensität von Fluorescein nahm mit zunehmender Konzentration an BSA ab, was auf eine Interaktion zwischen Fluorophor und BSA hindeutete. Eine Veränderung der Fluoreszenzintensität im Fall des Tracers lag dagegen nicht vor, unter Umständen verringerte die Konjugation die Wechselwirkung des Tracers zu BSA. Die Fluoreszenz von BSA alleine war ab etwa 1 % (w/v) (10 mg/mL), der im Calcium-Assay zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen eingesetzten Konzentration, messbar, ist jedoch im Vergleich zu den Tracer oder Fluorophor enthaltenden Proben deutlich geringer. Anhand der nach Dandliker *et al.* korrigierten Bindungskurve des Fluorophors ließ sich durch nicht-lineare Regression für Fluorescein eine Dissoziationskonstante von $0,1 \pm 0,01$ % BSA (entspricht $1 \pm 0,1$ mg/mL) ermitteln (vgl. Abbildung 5.41b). Da sich die Fluoreszenzintensität des CXCL8S72C-Fluorescein mit steigenden Konzentrationen an BSA nicht signifikant änderte, wurde die nach Dandliker *et al.* korrigierte Fluoreszenzanisotropie mit den unkorrigierten Werten verglichen, wobei unter Berücksichtigung der Standardabweichung kein signifikanter Unterschied des K_D erhalten wurde. Die Zunahme der Fluoreszenzanisotropie bei Inkubation des Tracers mit steigenden Konzentrationen an BSA ließ vorerst eine Bindung vermuten. Die Werte des freien (ohne BSA) und gebundenen CXCL8S72C-Fluorescein (maximale Konzentration an BSA) unterschieden sich unter Berücksichtigung der Fehlerbalken jedoch nicht signifikant, was darauf schließen ließ, dass der Tracer nicht mit BSA wechselwirkt. Unter Annahme einer Bindung wurde ein K_D von $0,15 \pm 0,08$ % BSA ($1,5 \pm 0,8$ mg/mL) ermittelt. Zusammenfassend wird deutlich, dass Fluorescein selbst stärker mit BSA wechselwirkte als CXCL8S72C-Fluorescein, bei welchem eine Bindung anhand der Bindungskurve weder widerlegt noch bestätigt werden konnte, vermutlich ist eine schwache Bindung vorhanden. Geringe Konzentrationen von weniger als $0,15 \pm 0,08$ % BSA ($1,5 \pm 0,8$ mg/mL) BSA wären demnach durchaus denkbar. Die Fluoreszenzintensität der im orangegelben Kanal fluoreszierenden Moleküle (vgl. Abbildung 5.41c) zeigte

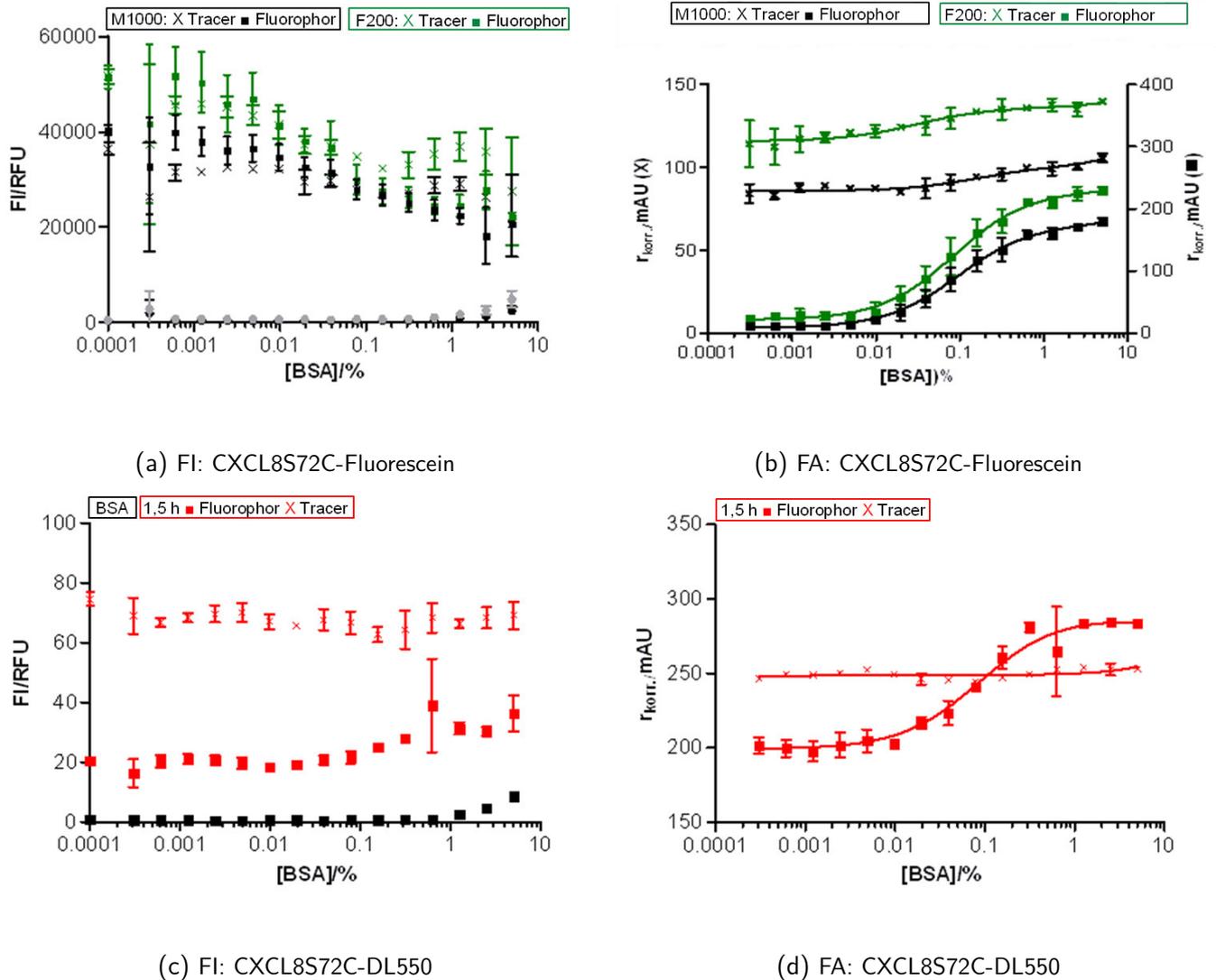


Abbildung 5.41: **Bindungskurven der Wechselwirkung zwischen BSA und fluorescent markiertem CXCL8S72C sowie den Fluorophoren Fluorescein und DyLight®550-Maleimid.** Abbildung (a) und (c) zeigen die Fluoreszenzintensitätsmessungen (FI), (b) und (d) die Fluoreszenzanisotropie (r_{korr}) in einer MTP Flat Bottom Black Low Volume [Corning]. Die Messung erfolgte nach einer Stunde Inkubation bei 37°C (dunkel) am M1000. In Grau ((a) bzw. schwarz (■ (c)) ist die Fluoreszenz von BSA ohne Zugabe der fluorescenten Komponente zu sehen. Zur Veranschaulichung sind die Werte der Fluoreszenzintensitätsmessung der reinen Tracerlösungen bei einem X-Achsenwert von 0,0001 eingetragen. Die dargestellten Bindungskurven der in Dreifachbestimmung ermittelten Werte (die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar) wurden durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software GraphPadPrism (*total binding*) ermittelt. (a) und (b): Die Messungen zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen CXCL8S72C-Fluorescein (Tracer, 400 nM)/Fluorescein (Fluorophor, 100 nM) und BSA erfolgte bei Wellenlängen von Ex./Em.: 470/520 ± 5 nm, Verstärkung: 179 (FI) und Ex./Em.: 490/520 ± 5 nm, Verstärkung: 104 (r_{korr}). (b): Zur besseren Übersicht bezieht sich die Fluoreszenzanisotropie des Tracers (X) auf die linke Y-Achse, jene des Fluorescein (■) auf die rechte. (c) und (d): Messung der Wechselwirkung von BSA mit CXCL8S72C-DL550 (Tracer, 200 nM) und DyLight®550-Maleimid (Fluorophor, maximal etwa 60 nM) bei Wellenlängen von Ex./Em.: 530/576 ± 5 nm und Verstärkungen von 100 (FI), 126 (r_{korr}).

mit steigender BSA-Konzentration keine Veränderung im Fall des fluoreszent markierten Proteins, jedoch eine geringe Zunahme bei DyLight®550-Maleimid. Die Fluoreszenzanisotropie des freien CXCL8S72C-DL550 in Abwesenheit von BSA betrug etwa 250 mAU und veränderte sich bei steigender Konzentration an BSA nicht, weshalb eine Bindung dieses Tracers an BSA ausgeschlossen wurde. Die Fluoreszenzanisotropie des freien Farbstoffs lag dagegen bei etwa 200 mAU und erreichte eine Sättigung bei etwa 280 mAU (etwa 1 % BSA (1 mg/mL) BSA). Die Dissoziationskonstante betrug $0,06 \pm 0,02$ % ($0,6 \pm 0,2$ mg/mL) BSA (mit Korrektur nach Dandliker).

Die Proben von CXCL8S72C-Fluorescein und Fluorescein mit BSA wurden zusätzlich parallel am F200 gemessen, wobei sich diese nicht von den am M1000 erhaltenen Messwerten unterschieden ($0,1 \pm 0,01$ % BSA (M1000) und $0,08 \pm 0,01$ % BSA (F200)). Ebenso wurde sofort nach dem Zusammengeben eine Messung durchgeführt, dieser Werte unterschieden sich allerdings bei keinem der Tracer-BSA- oder Fluorophor-BSA-Paaren, weshalb zur besseren Übersicht lediglich die Messung nach einstündiger Inkubation bei 37°C dargestellt ist. Die hier dargestellten Ergebnisse der Wechselwirkung von BSA mit den Tracern und Fluorophoren konnten in einem weiteren, unabhängigen Experiment reproduziert werden.

Die Betrachtung der Bindungskurven mit beiden Tracern und Fluorophoren ließ folgende Schlussfolgerung zu: Sowohl DL550 als auch Fluorescein binden mit einer ähnlichen Affinität an BSA. CXCL8S72C-DL550 zeigte dagegen keine Bindung an BSA, wohingegen für CXCL8S72C-Fluorescein im Gegensatz zur starken Bindung des Fluorophors - wenn überhaupt - eine schwache Bindung vermutet werden konnte, was darauf hindeutete, dass die Affinität des Fluorophors zu BSA durch die Konjugation stark herabgesetzt wurde.

Eine Bindung des CXCL8S72C-Fluorescein an BSA wurde schließlich bei Bindungsversuchen mit Membranpräparationen bestätigt (Daten nicht gezeigt), da in BSA-haltigem TRIS-T wiederholt eine im Vergleich zu TRIS-T erhöhte Fluoreszenzanisotropie der reinen Tracerlösung detektiert wurde. Da die Konzentration von 0,1 % BSA jedoch entsprechend einer Literaturangabe gewählt wurde, wobei anhand der berechneten Bindungsaffinität der Einsatz einer geringeren Konzentration an BSA auch durchaus denkbar wäre, wurden Bindungsversuche mit einer Membranpräparation und CXCL8S72C-Fluorescein unter Zusatz von 0,1 % BSA in TRIS-T durchgeführt. Diese ergaben jedoch reproduzierbar keine Änderung der Fluoreszenzanisotropie (Daten nicht gezeigt), welche ohne BSA durchaus detektierbar war (vgl. Abbildungen 5.47b, 5.46b, 5.45). Diese Beobachtung lässt zudem die Vermutung einer Bindung von BSA an den Rezeptor zu, wobei BSA den Tracer aus der Rezeptorbindung verdrängen würde.

BSA wurde im Folgenden in Bindungsversuchen mit CXCL8S72C-Fluorescein aufgrund dieser Ergebnisse nicht zur Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen verwendet.

Überschuss an unmarkiertem CXCL8

In Radioligandassays wird der unmarkierte Ligand oder ein Agonist vergleichbarer Bindungsaffinität, im 100 bis 1000-fachen Überschuss zur Konzentration des Tracers eingesetzt, um anhand der gesamten Bindung des Tracers (ohne diesen Überschuss an unmarkiertem Ligand) und den unspezifischen Bindungen (mit diesem Überschuss) die spezifischen Bindungen des Tracers zum Rezeptor bestimmen zu können.^{[115] [42] [206]} Aufgrund der bekannten Oligomerisierungsneigung der Chemokine musste untersucht werden, ab welcher Chemokinkonzentration bei den gewählten Versuchsbedingungen eine Wechselwirkung zwischen unmar-

kiertem CXCL8 und fluoreszent markiertem CXCL8S72C stattfindet. Wenn das unmarkierte CXCL8 in einer Konzentration eingesetzt werden kann, in welchem es zwar im Überschuss zum fluoreszent markierten CXCL8 vorliegt, jedoch keine Dimerisierung stattfindet, könnte der markierte Tracer vollständig aus den spezifischen Bindungen verdrängt werden, sodass die gemessene Fluoreszenzanisotropie nur unspezifische Bindungen widerspiegelt. Eine zweite Messung ohne Überschuss an unmarkiertem Ligand zeigt dagegen sowohl spezifische als auch unspezifische Bindungen des Tracers (Gesamtbindung), wobei die spezifischen Bindungen als Differenz dieser beiden Messungen erhalten werden. Im Fall einer Dimerisierung zwischen Tracer und unmarkiertem CXCL8 würde dagegen ein weiteres Bindungsgleichgewicht in den Anteil der oben als unspezifische Fluoreszenzanisotropie (r_{us}) zusammengefassten Größe einfließen. Zudem würde dieses Gleichgewicht sowohl die zu untersuchende Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor ((g) in Abbildung 5.40) als auch die oben erläuterte Bestimmung der Gesamtbindung und unspezifischen Bindungen indirekt durch veränderte Affinitäten des Dimers im Vergleich zum Monomer beeinflussen.

In Abbildung 5.42b und 5.42d sind repräsentative Bindungskurven von zwei unabhängigen, jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführten Bindungsversuchen mit CXCL8 und CXCL8S72C-Fluorescein bzw. CXCL8S72C-DL550 zu sehen. Die Fluoreszenzintensität der unmarkierten CXCL8-Lösung stieg bei den drei maximalen Chemokin-Konzentrationen ebenfalls leicht an, wobei die Fluoreszenzintensität der maximalen Konzentration des unmarkierten CXCL8 bei Konzentrationen zwischen 10 und 23 % des Wertes der fluoreszenten Proben lag (vgl. Abbildungen 5.42c und 5.42a). Aufgrund dieser Fluoreszenzintensitäten hätte das unmarkierte CXCL8 bei Konzentrationen $\geq 25 \mu\text{M}$ einen Beitrag zur Fluoreszenzanisotropie leisten und das Ergebnis der Messung verfälschen können. Obgleich es sich hierbei nur um diese maximalen Werte handelte, wurde wie erläutert eine Hintergrundkorrektur, wie von Harris *et al.* beschrieben, durchgeführt, um einen Einfluss des unmarkierten CXCL8 auf die ermittelte Fluoreszenzanisotropie zu verhindern.^[174] Abbildung 5.42a zeigt die am M1000 durchgeführte Fluoreszenzmessung der mit CXCL8S72C-DL550 inkubierten Proben mit einer Intensitätszunahme mit steigender CXCL8-Konzentration. Durch nicht-lineare Regression wurde im Fall des ersten Experiments (Tracer A) eine Affinität von $0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ermittelt. Bei der Wiederholung dieses Experiments war eine solche Intensitätszunahme ebenfalls angedeutet zu sehen, allerdings bei dieser Durchführung geringer ausgeprägt und auf eine zu geringe Konzentration an Tracer zurückzuführen.

Wie auch für CXCL8S72C-DL550 wurde für CXCL8S72C-Fluorescein bei der ersten Messung mit beiden Readern eine, unter Berücksichtigung der Fehlerbalken geringe, Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch die Wechselwirkung mit CXCL8 beobachtet (vgl. Abbildung 5.42c). In einer Wiederholung (B) dieses Bindungsexperiments wurde dagegen ein solcher Anstieg der Intensität mit Zunahme der CXCL8-Konzentration nicht beobachtet. Eine Berechnung der Bindungsaffinität wurde anhand dieser Kurven nicht durchgeführt, da keine offensichtliche Bindungskurve erhalten wurde. Obwohl die Änderung der Fluoreszenzintensität bei beiden Tracern in zwei Experimenten nicht in gleichem Ausmaß stattfand, wurde die zugehörige Fluoreszenzanisotropie bei allen Experimenten zur Wechselwirkung von CXCL8 mit fluoreszent markiertem CXCL8S72C zur besseren Vergleichbarkeit nach Dandliker *et al.* korrigiert. Ändert sich die Fluoreszenzintensität nicht, unterscheiden sich die korrigierten Werte nicht wesentlich von den gemessenen.

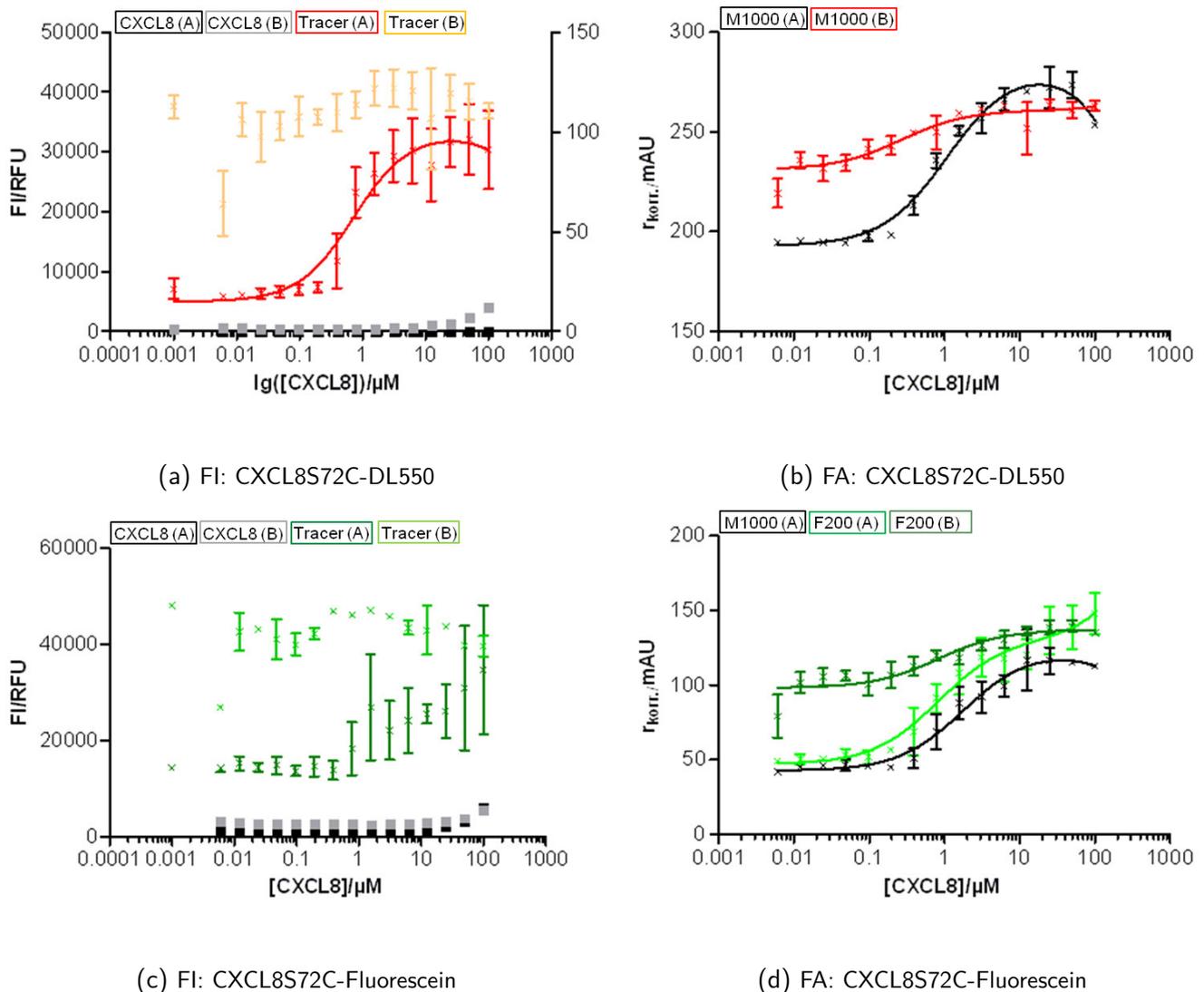


Abbildung 5.42: **Bindungskurven der Wechselwirkung zwischen CXCL8 und fluorescent markiertem CXCL8S72C (Tracer).** Exzitation/Emission CXCL8S72C-DL550: $530 \pm 5 \text{ nm}/576 \pm 5 \text{ nm}$, gemessen am M1000; CXCL8S72C-Fluorescein: $470 \pm 5 \text{ nm}/520 \pm 5 \text{ nm}$ (M1000) und $485 \pm 20 \text{ nm}/535 \pm 25 \text{ nm}$ (F200), gemessen an beiden Geräten; 200 nM Tracer in TRIS-T, MTP *Flat Bottom Black Low Volume* [Corning]. Es sind zwei unabhängige Experimente (A und B) mit beiden Tracern nach einer Inkubation von mindestens 1,5 Stunden bei 37°C gezeigt. (a)/(c): Fluoreszenzintensitätsmessungen bei einer Verstärkung von 100 (Experiment A) und 220 (Experiment B) für CXCL8S72C-DL550. Die Messung von CXCL8S72C-Fluorescein erfolgte (bei beiden Experimenten A und B) bei einer Verstärkung von 100 (M1000) und 89 (F200). „CXCL8“ zeigt die Verdünnungsreihe mit Zugabe von Puffer anstelle der Tracerlösung und stellte somit den Hintergrund dar. „Tracer“ zeigt die sowohl CXCL8 (Rezeptor) als auch CXCL8S72C-DL550/Fluorescein (Ligand) enthaltenden Proben. Der Wert der reinen Tracerlösung ist zum Vergleich bei einem X-Achsenwert von 0,001 eingetragen. (b)/(d) Fluoreszenzanisotropie bei einer Verstärkung 114 (F200) und 120 (M1000). Die dargestellten Bindungskurven wurden durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software GraphPadPrism (*total binding*) ermittelt.

Die Fluoreszenzanisotropie der Wechselwirkung zwischen fluoreszent markiertem CXCL8S72C und unmarkiertem CXCL8 ist in den Abbildungen 5.42b und 5.42d dargestellt.

Für CXCL8S72C-DL550 wurden aus den zwei unabhängigen Experimenten zwei unterschiedliche Bindungsaffinitäten berechnet. So unterschied sich der aus Experiment A ermittelte K_D mit $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ signifikant von jenem der Wiederholung des Experiments mit $0,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Zudem zeigte die Fluoreszenzanisotropie des freien Tracers (A_0) einen großen Unterschied zwischen den beiden unabhängigen Experimenten (etwa 190 mAU (A) und etwa 240 mAU (B)). Je höher diese A_0 , desto geringer war die dynamische Breite, da kein Unterschied in höchsten Werten der Fluoreszenzanisotropie detektiert werden konnte. In Experiment A sank die Fluoreszenzanisotropie bei der maximalen CXCL8-Konzentration ab. Die Wechselwirkung zwischen Fluorescein-markiertem Chemokin und unmarkierten CXCL8 konnte in allen Messungen nachgewiesen werden. Abbildung 5.42d zeigt einerseits den Vergleich zweier unabhängiger Experimente (A und B), sowie den Vergleich beider Geräte (F200 A gegen F200 B), wobei wie bereits für CXCL8S72C-DL550 ein Unterschied der A_0 detektiert wurde (Messung am F200, etwa 40 mAU (A) und etwa 80 mAU (B)). Trotz dieser Differenzen bezüglich der A_0 und somit der dynamischen Breite, stimmten die aus beiden Bindungskurven am F200 ermittelten Affinitäten überein (F200 A: $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$, F200 B: $0,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$). Die Bindungskurven, die für die gleiche Messreihe an den beiden Geräten aufgenommen wurden, unterschieden sich geringfügig in ihrem Verlauf bei den maximalen CXCL8-Konzentrationen. So stieg der Wert bei den höchsten CXCL8-Konzentrationen im Fall des F200 weiterhin an, während am M1000 eine leichte Abnahme der Fluoreszenzanisotropie zu sehen war. Dieser Anstieg für die Messung des F200 ist bei Experiment B jedoch nicht zu sehen. Der am F200 gemessene K_D von $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (F200 A) entsprach in etwa dem durch Messung am M1000 erhaltenen K_D von $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (M1000 A). Ebenso lagen die Bindungsaffinitäten des CXCL8S72C-Fluorescein zweier unabhängiger, an verschiedenen Geräten gemessenen Experimente in derselben Größenordnung (vgl. M1000 A: K_D von $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ mit F200 B: $0,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$).

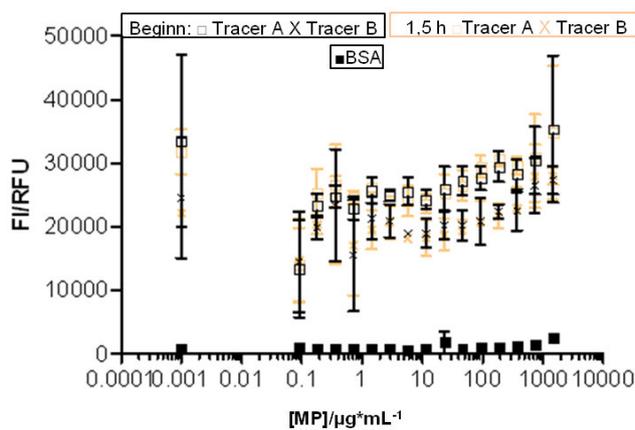
Obgleich sich die Bindungsaffinitäten im Vergleich der einzelnen Messungen durchaus signifikant unterschieden (vgl. CXCL8S72C-DL550: $0,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ und CXCL8S72C-Fluorescein: $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$), unterschieden sich die gemessenen Bindungskonstanten für die beiden Fluorophore unter Berücksichtigung aller Durchführungen nicht signifikant. Da mit beiden Tracern eine Dimerisierung des Chemokins detektiert werden konnte, schien der Fluorophor keinen Einfluss auf diese Wechselwirkung zu haben. Demnach lag die Dimerisierungskonstante von fluoreszent markiertem CXCL8S72C (Tracer) mit CXCL8 bei etwa $1 \mu\text{M}$, sodass bei Zugabe des unmarkierten CXCL8 in 100-1000fachem Überschuss zum Tracer (etwa 200 nM), nicht nur die Löslichkeitsgrenze erreicht wäre, sondern ein erheblicher Anteil an Tracer als Heterodimer gebunden wäre. Tracer, welcher an CXCL8 gebunden wäre, wäre weniger beweglich als das freie, markierte CXCL8S72C. Da die Fluoreszenzanisotropie dieser Tracermoleküle ebenfalls zur Gesamtanisotropie beitragen würde, wäre bei der Berechnung der Fluoreszenzanisotropie eine weitere Komponente zu berücksichtigen. Zudem besitzt das Dimer eine geringere Affinität zum Rezeptor, weshalb der als Monomer vorliegende Tracer schlechter aus der Rezeptorbindung verdrängt werden würde. Letztlich eignete sich ein Überschuss an CXCL8 nicht, um es zur Verdrängung des Tracers aus der Rezeptorbindung und somit zur Bestimmung der spezifischen Bindungen zu nutzen. Bei Reduzierung der Tracerkonzentration auf den unteren nanomolaren Bereich der Bindungskonstanten durch Auswahl eines Fluorophors mit höherer Helligkeit, wäre entsprechend eine Konzentration an CXCL8 von etwa $1 \mu\text{M}$ nötig. Da dies in etwa der hier ermittelten Dimerisierungskonstanten

entspricht, wäre ein Überschuss an unmarkierten CXCL8 jedoch auch dann keine optimale Lösung, um zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungen unterscheiden zu können.

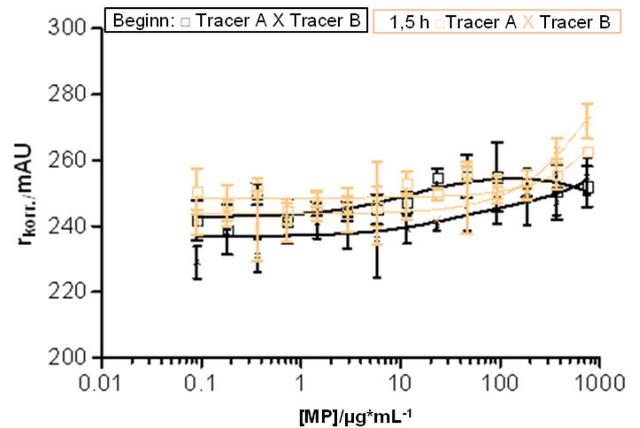
5.4.4 Bindungsversuche

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Bindungskurve durch Messung der Fluoreszenzanisotropie mit den hier hergestellten Membranpräparationen und den unterschiedlich markierten Tracern prinzipiell aufgenommen werden kann. In ersten Fluoreszenzanisotropiemessungen wurden Membranpräparationen aus zwei Einzelklonen verwendet (vgl. Abbildung 5.43), wobei die unterschiedlich starke Rezeptorexpression in verschiedenen Bindungskurven resultieren sollte. Im Fall einer Membranpräparation mit starker Rezeptorexpression würde sich der apparente K_D bei geringeren Gesamtproteinmengen befinden als bei einer mit schwacher Expression, bei welcher der Anteil an Rezeptorproteinen bezogen auf die Gesamtproteinmenge geringer ist. Dabei wurde ausgehend von den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie von einer sehr geringen Expression des CXCR1 in HEK293/CXCR1-A7 und einer starken in HEK293/CXCR1-C11 ausgegangen. Die Fluoreszenzmessungen, in den Abbildungen 5.43a und 5.43c zu sehen, zeigten, dass die Membranpräparation im Vergleich zu den fluoreszenten Proben keine relevante Autofluoreszenz besitzt (vgl. 5.44a). Trotzdem wurden bei allen hier durchgeführten Berechnungen die jeweiligen Werte für die Membranlösung ohne Tracer als Hintergrund von den parallelen und perpendicularen Intensitäten subtrahiert (r_{korrr}), da verschiedene Chargen an Membranpräparationen mit unterschiedlich großen Startkonzentrationen verwendet wurden und auf diese Weise stets eine einheitliche Auswertung durchgeführt wurde.^[174]

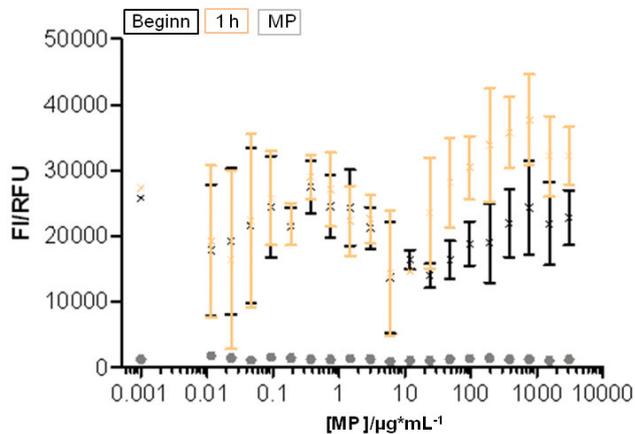
Die Fluoreszenzintensität einer Verdünnungsreihe der Membranpräparation der Zelllinie HEK293/CXCR1-C11 mit zwei verschiedenen Konzentrationen (94 und 140 nM) an CXCL8S72C-DL550 sank vorerst nach Zugabe der Membranpräparation im Vergleich zu der nur den Tracer enthaltenden Lösung, um mit zunehmender Menge an Membranpräparation wieder anzusteigen (vgl. Abbildung 5.43b). Unter Berücksichtigung der Standardabweichung sowie der ohne Membranpräparation detektierten Fluoreszenz ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität jedoch nicht signifikant, weshalb keine Korrektur nach Dandliker *et. al* durchgeführt wurde. Lediglich bei der ohne Inkubation gemessenen Fluoreszenzanisotropie (vgl. Abbildung 5.43b) mit 140 nM Tracer (A) konnte eine Bindungskurve mit einer apparenten Affinitätskonstante von $13 \pm 11 \mu\text{g}/\text{mL}$ Gesamtproteinmenge (Gpm) vermutet werden. Nach einer eineinhalbstündigen Inkubation bei 37°C glich diese Kurve jedoch jenen mit einer Tracerkonzentration von 94 nM, wo selbst die maximalen Konzentrationen an Membranpräparation lediglich zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenzanisotropie führten. Im Gegensatz hierzu konnte mit einer Membranpräparation des Einzelklons HEK293/CXCR1-A7 eine Bindungskurve mit einer apparenten Affinitätskonstanten von $19 \pm 7 \mu\text{g}/\text{mL}$ Gpm ermittelt werden. Eine Messung der Fluoreszenzintensität dieser Proben zeigte einen leichten Anstieg bei höheren Konzentrationen an Membranpräparation (zwischen 10 und $100 \mu\text{g}/\text{mL}$) über die Zeit (vgl. 5.43c), wobei die zugehörigen Fluoreszenzanisotropiewerte keine solche zeitliche Veränderung aufwiesen. Die nach Dandliker *et al.* korrigierte Bindungskurve nach einer Stunde entsprach jener der späteren Messung bei zwei Stunden, weshalb letztere zur besseren Übersicht in Abbildung 5.43d nicht zusätzlich dargestellt ist. Beim Vergleich der Fluoreszenzanisotropie des freien Tracers (vgl. Abbildung 5.43b und 5.43d) ist auffällig, dass sich diese bei den



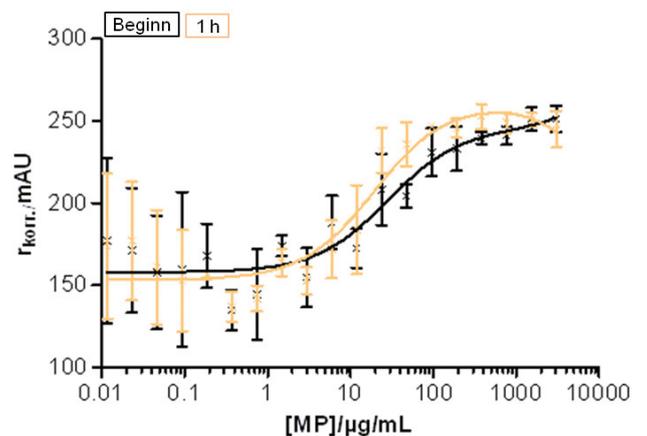
(a) FI: HEK293/CXCR1-C11



(b) FA: HEK293/CXCR1-C11



(c) FI: HEK293/CXCR1-A7



(d) FA: HEK293/CXCR1-A7

Abbildung 5.43: **Bindungskurven des Tracers CXCL8S72C-DL550 mit Membranpräparationen der Zelllinien HEK293/CXCR1-C11 und HEK293/CXCR1-A7.** Exzitation/Emission: $530 \pm 5 \text{ nm} / 576 \pm 5 \text{ nm}$ (M1000); MTP: *Flat Bottom Black Low Volume* [Corning]. In schwarz sind die Messungen unmittelbar nach Zugabe aller Lösungen zu sehen, während in hellorange die Messung nach einer Inkubation bei 37°C für eine Stunden zu sehen ist. Die Ergebnisse nach zweieinhalb Stunden sind zur besseren Übersicht nicht gezeigt, da diese jenen der vorangehenden Zeitpunkte entsprechen. Es sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung dargestellt. Gezeigt sind die Fluoreszenzintensität ((a) und (c) FI, Verstärkung: 230) und Fluoreszenzanisotropie, berechnet nach Harris *et. al*, ((b) und (d) $r_{\text{kor.}}$, Verstärkung: 140) der Verdünnungsreihe einer Membranpräparation der Zelllinie (a) und (b) HEK293/CXCR1-C11 (höchste Konzentration: 1,5 mg/mL) nach Zugabe von zwei verschiedenen Konzentrationen an CXCL8S72C-DL550 (A: 140 nM, B: 94 nM) sowie (c) und (d) HEK293/CXCR1-A7 (Startkonzentration: 3,1 mg/mL) mit 150 nM CXCL8S72C-DL550. Zur Veranschaulichung ist der Wert der Fluoreszenzintensitätsmessung der reinen Tracerlösung bei einem X-Achsenwert von 0,001 eingetragen. Die dargestellten Bindungskurven wurden durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software GraphPadPrism (*total binding*) ermittelt.

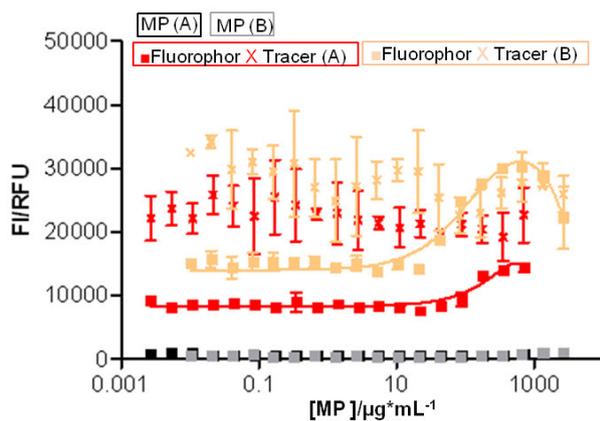
Experimenten mit verschiedenen Membranpräparationen (MP) trotz gleicher Versuchsparameter deutlich unterschied. So begann die Bindungskurve mit der MP HEK293/CXCR1-A7 in Abbildung 5.43d bei etwa 160 mAU während die der MP HEK293/CXCR1-C11, bei etwa 240 mAU startete, so dass in diesem Fall aufgrund der geringen dynamischen Breite keine Wechselwirkung zwischen Tracer und Membran erkennbar war. Die geringe Fluoreszenzanisotropie des freien Tracers ließ auf eine hohe Beweglichkeit des Fluorophors schließen. Die Fluoreszenzanisotropie des gebundenen Tracers war dagegen bei beiden Membranpräparationen gleich. Diese Ergebnisse stimmen mit jenen aus Abbildung 5.38 überein, da auch hier bei einer hohen A_0 von 254 mAU eine sehr geringe dynamische Breite (Differenz A_{max} und A_{min} : 21 mAU) beobachtet wurde. Die Tatsache, dass bei dieser Membranpräparation (HEK293/CXCR1-C11) keine eindeutige Bindungskurve ermittelt werden konnte, wurde aufgrunddessen auf die zu geringe dynamische Breite und nicht auf eine schwache Rezeptorexpression zurückgeführt.

Aufgrund dieser unerwarteten Ergebnisse, einer Bindungskurve trotz schwacher CXCR1-Expression, wurde eine Verdünnungsreihe der Membranpräparation einer Kontroll-Zelllinie aus einem externen Labor, HEK293/CXCR1-EGFP⁹ mit CXCL8S72C-DL550 inkubiert und als Positivkontrolle verwendet. Abbildung 5.44 zeigt eine Bindungskurve dieser Membranpräparation mit 150 nM CXCL8S72C-DL550 sowie DyLight[®]550-Maleimid (maximale Konzentration: 60 nM¹⁰). Auch hier zeigte die Membranpräparation selbst keine relevante Autofluoreszenz (vgl. Abbildung 5.44a). Zudem zeigt Abbildung 5.44a einen Anstieg der Fluoreszenzintensität des ungebundenen Farbstoffs DyLight[®]550-Maleimid mit zunehmender Menge an Membranpräparation. Diese Zunahme war reproduzierbar und wies bei einer Gesamtproteinmenge von etwa 0,7 mg/mL ein Maximum auf, wobei die Fluoreszenzintensität bei weiter steigenden Proteinmengen wieder absank. Dies kann mit einer Fluoreszenzlöschung bei einer dichten Beladung der Membran erklärt werden. Eine Veränderung der Fluoreszenzintensität des Tracers war dagegen nicht zu beobachten. Daher wurde lediglich die Fluoreszenzanisotropie der mit DyLight[®]550-Maleimid inkubierten Membranpräparation nach Dandliker *et. al* korrigiert. Der Wendepunkt befand sich bei der auf Fluoreszenzintensität basierenden Bindungskurve für den Fluorophor bei $0,14 \pm 0,05$ mg/mL (Experiment B) und stimmte mit jenen des auf Fluoreszenzanisotropie basierenden Graphen mit $0,15 \pm 0,02$ mg/mL (Experiment B) und $0,36 \pm 0,20$ mg/mL (Experiment A) überein. Die Fluoreszenzanisotropie des Tracers änderte sich bei Titration der Membranpräparation dagegen nicht, sodass keine Wechselwirkung des CXCL8S72C-DL550 mit der Membranpräparation nachgewiesen werden konnte.

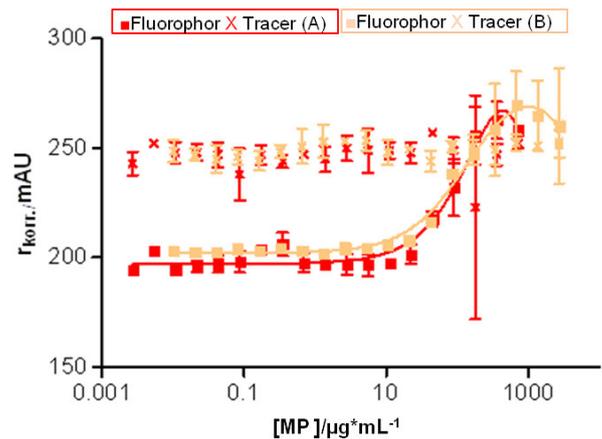
Parallel zur Messung der Fluoreszenzanisotropie wurde aufgrund der Überschneidung des Emissionsspektrums des EGFP-Fusionsproteins (HEK293/CXCR1-EGFP) und der Anregungswellenlänge des Liganden eine FRET-Messung dieser Proben durchgeführt. Durch die spezifische Bindung des Liganden wird die Anregungsenergie vom Donor (CXCR1-EGFP) strahlungsfrei auf den Akzeptor (CXCL8S72C-DL550) übertragen, sodass die Emission des Rezeptors mit zunehmender Bindung abnimmt. Hierbei handelt es sich aufgrund der Entfernungsabhängigkeit des detektierten Energietransfers um einen spezifischen Nachweis der Rezeptor-Ligand-Bindung, weshalb eine unspezifische Bindung des Fluorophors an die Membranpräparation nicht detektiert werden würde. Die von Prof. Jean-Luc Galzi, Ph.D., als Positivkontrolle zur Verfügung gestellte Zelllinie (HEK293/CXC1-EGFP) eignet sich insbesondere für einen solchen Versuchsaufbau, wobei

⁹ von Prof. Jean-Luc Galzi, Ph.D., Forschungszentrum der ESBS, Universität Straßburg/Frankreich, zur Verfügung gestellt

¹⁰ die genaue Konzentration konnte aufgrund der nur noch geringen, vorhandenen Menge nicht mehr ermittelt werden



(a) FI: HEK293/CXCR1-EGFP



(b) FA: HEK293/CXCR1-EGFP

Abbildung 5.44: **Bindungskurven der Wechselwirkung zwischen Membranpräparationen der Zelllinie HEK293/CXCR1-EGFP und CXCL8S72C-DL550.** Exzitation/Emission: $530 \pm 5 \text{ nm}/576 \pm 5 \text{ nm}$ (M1000), 150 nM CXCL8S72C-DL550 bzw. DyLight®550-Maleimid (maximale Konzentration: 60 nM) in TRIS-T, MTP: *Flat Bottom Black Low Volume* [Corning]. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente (A und B) am Tecan Infinite®M1000 nach einer Inkubation von mindestens 1,5 Stunden bei 37°C zu sehen. (a) zeigt die Fluoreszenzintensitätsmessung bei einer Verstärkung von 226, (b) die Fluoreszenzanisotropie bei einer Verstärkung von 130. „MP“ (Membranpräparation) zeigt die Verdünnungsreihe (höchste Konzentrationen: 0,7 mg/mL (A) und 2,7 mg/mL (B)) mit Zugabe von Puffer anstelle der Tracerlösung und stellt somit den Hintergrund dar. „Tracer“ zeigt die sowohl Membranpräparation (Rezeptor) als auch CXCL8S72C-DL550 (Ligand) enthaltenden Proben.

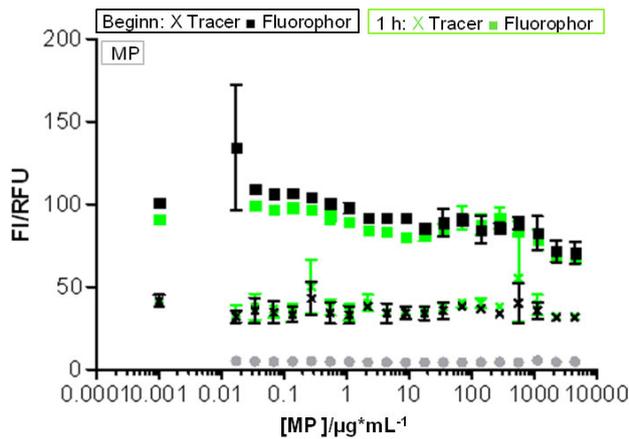
FRET-basierte Bindungsversuche zum Screening von Inhibitoren des Ligand-Rezeptor-Paares CXCL12-CXCR4 von dieser Arbeitsgruppe bereits publiziert sind.^[120] Diese von Hachet-Haas *et al.* beschriebene Messung stellt eine zeitaufgelöste Messung der Rezeptor-Ligand-Interaktion dar. Nach der Aufnahme einer Basislinie durch die Messung des vom EGFP-Fusionsprotein emittierten Lichts in regelmäßigen Zeitintervallen wurde in dieser Publikation der mit dem roten Fluorophor (*Texas red*) markierte Ligand zugegeben und die Abnahme des emittierten Lichts bei der Emissionswellenlänge des Donors aufgezeichnet.^[120] Ein dieser Durchführung entsprechender nicht zeitaufgelöster Versuchsaufbau besteht in der Messung der Abnahme der Emission des Donors bei Titration des Liganden, woraus die Effizienz des Energietransfers berechnet werden kann. Aufgrund des zur Fluoreszenzanisotropiemessung nötigen Versuchsaufbaus mit steigender Rezeptorkonzentration (Donor) und konstanter Akzeptorkonzentration (Tracer) ist eine solche Berechnung als Kontrolle der erhaltenen Fluoreszenzanisotropie jedoch nicht möglich, da die betrachtete Emission des Donors durch Titration dieser Komponente ansteigt. Daher wurde getestet, ob eine Messung der Emission des Akzeptors (CXCL8S72C-DL550: Ex./Em.: 530/576 nm) bei der Anregung mit der Wellenlänge des Donors (HEK293/CXCR1-EGFP, Ex./Em.: 490/520 nm) möglich ist, wobei auch hier keine Bindungskurve aufgenommen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurde aus den mit DyLight®550-Maleimid und CXCL8S72C-DL550 durchgeführten Experimenten deutlich, dass der Farbstoff selbst mit der Membranpräparation wechselwirkt, wodurch sich die-

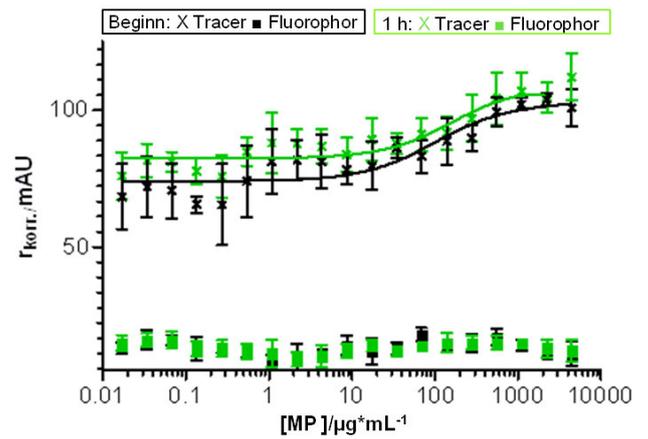
ses Proteinkonjugat nicht zur Messung der Fluoreszenzanisotropie eignete. Bei diesen Bindungsversuchen mit CXCL8S72C-DL550 waren die Messungen zudem ebenfalls nicht reproduzierbar, da die Fluoreszenzanisotropie des freien Tracers und somit die dynamische Breite auch hier von Versuch zu Versuch schwankte. Die oftmals geringe dynamische Breite war aufgrund der in Abbildung 5.38 dargestellten Ergebnisse jedoch zu erwarten. Eine zur Fluoreszenzanisotropie simultan durchgeführte FRET-Messung ist nicht möglich, allerdings könnte die Etablierung eines FRET-Assays mit HEK293/CXCR1-EGFP und CXCL8S72C-DL550, in Kooperation mit Prof. Galzi, Ph.D., eine Alternative zu dem hier angedachten Fluoreszenzanisotropie-Assay darstellen.

Aufgrund dessen wurde im Folgenden CXCL8S72C-Fluorescein als Tracer gewählt, wobei auch hier die Wechselwirkung des freien Fluoresceins mit der Membranpräparation überprüft wurde. Die zuvor als Positivkontrolle gewählte Membranpräparation der HEK293/CXCR1-EGFP eignete sich aufgrund der ähnlichen Anregungs- und Emissionsmaxima (EGFP: Ex./Em.: 488/507 nm, Fluorescein: Ex./Em.: 485/520 nm) nicht. In Abbildung 5.45 sind zwei unabhängige Experimente in Dreifachbestimmung von Membranpräparationen der Zelllinie HEK293/CXCR1-C11 mit CXCL8S72C-Fluorescein und Fluorescein zu sehen. Bei den verwendeten Konzentrationen war die Autofluoreszenz der Membranpräparation vernachlässigbar klein gegenüber dem Fluorophor (vgl. Abbildung 5.45a). Des Weiteren war bei keiner der Proben eine Änderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit zu erkennen. Während bei CXCL8S72C-Fluorescein keine Unterschiede der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Konzentrationen an Membranpräparation zu sehen war, wurde jene des Fluorescein bei hohen Konzentrationen von Membranpräparation gequencht, was auf eine Wechselwirkung des Fluorophors mit der Membran hindeutete. In Abbildung 5.45b ging aus der gleich bleibenden, niedrigen Fluoreszenzanisotropie des unkonjugierten Fluorophors hervor, dass der Farbstoff offenbar nicht mit der Membranpräparation wechselwirkte. Eine Korrektur nach Dandliker *et. al* führte zu keiner Änderung des Kurvenverlaufs (es ist die unkorrigierte Fluoreszenzanisotropie zu sehen). In einer Wiederholung des Experiments mit HEK293/CXCR1-A7 und Fluorescein, wurden diese Ergebnisse reproduziert und trotz sinkender Fluoreszenzintensität keine Zunahme der Fluoreszenzanisotropie detektiert (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurde die Wechselwirkung von CXCL8S72C-Fluorescein mit diesen Membranpräparationen (HEK293/CXCR1-C11) untersucht (vgl. Abbildung 5.45). Eine Korrektur der Fluoreszenzanisotropie nach Dandliker *et al.* wurde aufgrund der gleich bleibenden Fluoreszenzintensität des Tracers nicht durchgeführt. CXCL8S72C-Fluorescein band an die Membranpräparation HEK293/CXCR1-C11 und wies direkt nach Zusammengeben der beiden Komponenten einen Wendepunkt der Bindungskurve bei $99 \pm 72 \mu\text{g}/\text{mL}$ Gesamtprotein auf (vgl. Abbildung 5.45b). Nach einer Stunde bei 37°C hatte sich dieser auf $0,18 \pm 0,15 \text{ mg}/\text{mL}$ verschoben. Die in Abbildung 5.45b dargestellte Bindungskurve der einstündigen Inkubation wurde anhand des Mittelwerts aus insgesamt sechs (drei verschiedene Verdünnungsreihen der Membranpräparation, welche zweimal hintereinander gemessen wurden) Messwerten erstellt. Die erhöhte Fluoreszenzanisotropie der maximal eingesetzten Konzentration an Membranpräparation in den Randkavitäten der MTP nach dieser einstündigen Inkubationszeit wurde auf Verdunstungseffekte zurückgeführt, weshalb der maximale Wert bei der nicht-linearen Regression ausgelassen wurde.

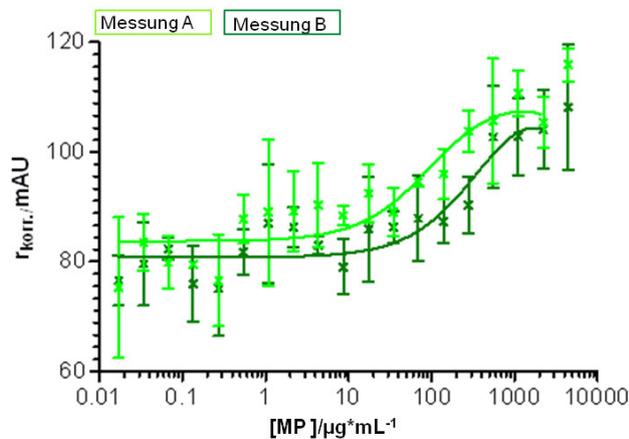
Zur Untersuchung des Messfehlers wurde die Platte nach dieser einstündigen Inkubation innerhalb von fünf Minuten zweimal hintereinander am M1000 gemessen (vgl. Messung A und B in Abbildung 5.45c). Die in weniger als fünf Minuten später durchgeführte Messung resultierte in einer zu geringeren Fluor-



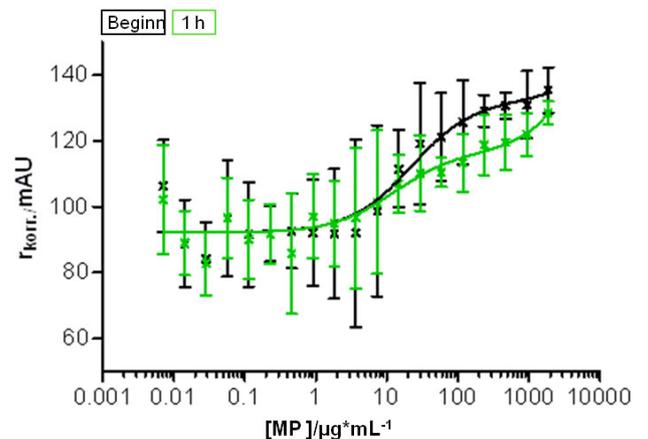
(a) 1. Experiment, M1000



(b) 1. Experiment, M1000



(c) 1. Experiment, M1000, zwei aufeinander folgende Messungen (A) und (B)



(d) 2. Experiment, F200

Abbildung 5.45: **Bindungskurven des Tracers CXCL8S72C-Fluorescein und Fluorescein mit Membranpräparationen der Zelllinie HEK293/CXCR1-C11.** Die Konzentration an Tracer betrug 50 nM, jene des Fluoresceins 10 nM in TRIS-T und einer MTP *Flat Bottom Black Low Volume* [Corning]. In schwarz sind die Messungen unmittelbar nach Zugabe aller Lösungen zu sehen, während in grün die Messung nach einer Inkubation bei 37°C für eine Stunde zu sehen ist. Es sind jeweils die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung dargestellt. In (a) ist die Fluoreszenzintensität (FI) am M1000 und in (b), (c) die Fluoreszenzanisotropie, nach Harris *et al.* berechnet, ($r_{\text{korr.}}$) (Ex./Em.: 490 (470) \pm 5 nm/520 \pm 5 nm, Verstärkung 100 (118)) dargestellt. Die Startkonzentration dieser Membranpräparation betrug 4,45 mg/mL. Zur Veranschaulichung ist der Wert der Fluoreszenzintensitätsmessung der reinen Tracerlösung bei einem X-Achsenwert von 0,001 eingetragen. In c) sind zwei unmittelbar aufeinander folgende Messungen (A und B) derselben Proben zu sehen, während (b) und (d) zwei unabhängige Experimente verglichen. Hierbei ist eine Messung unmittelbar nach Zugabe der Lösungen (Beginn) im Vergleich zur Messung einer Stunde bei 37°C gezeigt. Die in d) gezeigte Messung erfolgte am F200 (Ex./Em.: 485 \pm 20 nm/535 \pm 25 nm, Verstärkung: 128). Die dargestellten Bindungskurven wurden durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Software GraphPadPrism (*total binding*) ermittelt.

reszenzanisotropiewerten verschobenen Bindungskurve. Die ermittelten Wendepunkte unterschieden sich unter Berücksichtigung der Standardabweichung nicht signifikant. Sie befinden sich bei $448 \pm 496 \mu\text{g/mL}$ (Messung A) und bei $101 \pm 80 \mu\text{g/mL}$ (Messung B). Die Verschiebung der Bindungskurve wurde auf eine temperaturabhängige Abnahme der Fluoreszenzanisotropie zurückgeführt. Bei jeder Fluoreszenzanisotropiemessung wurden die MTP im Anschluss an die einstündige Inkubation bei 37°C zweimal bei Raumtemperatur zentrifugiert (einmal wegen der an der Abdeckfolie kondensierten Flüssigkeit, einmal nach dem Entfernen der Folie, um Flüssigkeitstropfen an der Gefäßwand zu entfernen), wodurch die MTP wieder abkühlten. Um eine Messung bei 37°C und somit gleichen Bedingungen trotz unterschiedlicher Raumtemperatur zur gewährleisten, wurden die MTP vor jeder Messung fünf Minuten im Messgerät inkubiert, um eine Erwärmung der MTP auf 37°C zu ermöglichen. Dieser Versuch zeigte jedoch deutlich, dass diese Zeitspanne nicht genügt, um die Temperatur der Lösungen in der MTP an die Temperatur im Reader anzupassen. Die Wiederholung dieses Bindungsversuches am F200 mit einer anderen Membranpräparation derselben Zelllinie zeigte, dass die gemessene Bindungskurve des CXCL8S72C-Fluorescein reproduzierbar war (vgl. Abbildung 5.45d). Der mittels nicht-linearer Regression ermittelte Wendepunkt entsprach unter Berücksichtigung der Standardabweichung mit $22,2 \pm 9,8 \mu\text{g/mL}$ (Beginn) und $12,7 \pm 7,6 \mu\text{g/mL}$ (eine Stunde) den apparenten Bindungskonstanten, welche aus zwei einzelnen Messungen (A und B) ermittelt worden war, allerdings unterschieden sich die aus zwei unabhängigen Experimenten erhaltenen Mittelwerte um etwa den Faktor zehn (vgl. nach einstündiger Inkubation, Experiment 1, Messung A: $448 \pm 496 \mu\text{g/mL}$, Messung B: $101 \pm 80 \mu\text{g/mL}$ und Experiment 2: $12,7 \pm 7,6 \mu\text{g/mL}$).

Schließlich verdeutlichen die in Abbildung 5.45 dargestellten Ergebnisse, dass eine Bindungskurve der Membranpräparation mit CXCL8S72C-Fluorescein aufgenommen werden konnte und diese nicht durch den Fluorophor vermittelt wurde.

Im Folgenden sollten die Membranpräparationen des CXCR1 stark exprimierenden HEK293/CXCR1-C11 mit dem schwach exprimierenden HEK293/CXCR1-A7 in einer Fluoreszenzanisotropiemessung ebenfalls mit CXCL8S72C-Fluorescein verglichen werden. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 5.46 dargestellt. Wie bereits in Abbildung 5.45a zu sehen, zeigte der Tracer keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Membranpräparation, weshalb die ermittelte Fluoreszenzanisotropie nicht nach Dandliker *et. al* korrigiert wurde (vgl. Abbildung 5.46a). Die zugehörige Fluoreszenzanisotropie ist in Abbildung 5.46b zu sehen. Bei der ersten Messung nach Zugabe der Lösungen („Beginn“) war ein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie mit steigender Gesamtproteinmenge bis etwa $1 \mu\text{g/mL}$ zu sehen, welche nach einem Plateau bis etwa $1000 \mu\text{g/mL}$ eine weitere Zunahme andeutete, was auf sich überlagernde Wechselwirkungen hinwies. Der berechnete Wendepunkt der mittels nicht-linearer Regression ermittelten Bindungskurve für den ersten Anstieg bis zum Plateau fand sich bei einer Konzentration von $0,1 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$, wobei der Kurvenverlauf der zeitlich später erfolgten Messungen nahe legt, dass sich das System noch nicht im Gleichgewicht befand. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde ein Wendepunkt der sigmoidalen Kurve von $0,1 \pm 0,8 \text{ mg/mL}$ und nach zweistündiger Inkubation von $0,3 \pm 0,2 \text{ mg/mL}$ ermittelt, wobei sich diese Werte im Rahmen des Messfehlers nicht signifikant unterschieden und die Bindungsisothermen einen fast identischen Verlauf hatten.

Dieser Versuch bestätigte erneut, dass eine Wechselwirkung zwischen CXCL8S72C-Fluorescein und den Membranpräparationen stattfindet und mittels Messung der Fluoreszenzanisotropie detektiert werden

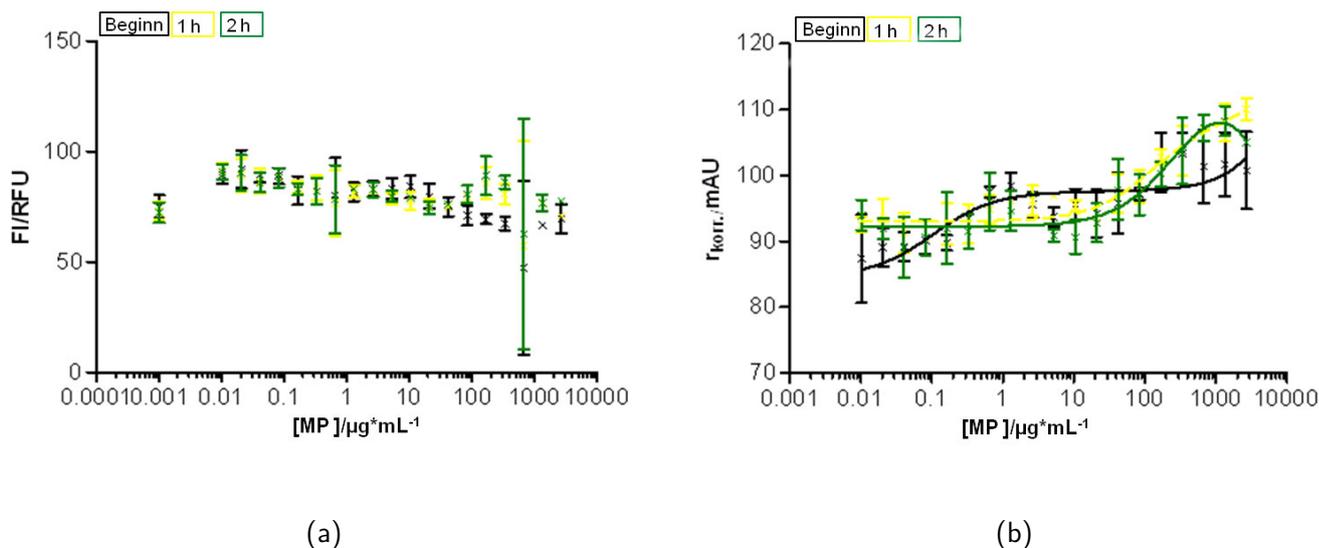


Abbildung 5.46: **Bindungskurven der Wechselwirkung zwischen HEK293/CXCR1-A7 und CXCL8S72C-Fluorescein.** Verschiedene Konzentrationen einer Membranpräparation der Zelllinie HEK293/CXCR1-A7 wurden mit 100 nM CXCL8S72C-Fluorescein für ein (gelb) und zwei (dunkelgrün) Stunden bei 37°C in einer MTP *Flat Bottom Black Low Volume* [Corning] inkubiert und sowohl die (a) Fluoreszenzintensität (FI) als auch die (b) Fluoreszenzanisotropie, nach Harris *et al.* berechnet, ($r_{\text{kor.}}$) am M1000 (Exzitation/Emission: $470 \pm 5 \text{ nm}/520 \pm 5 \text{ nm}$, Verstärkung: 120) gemessen. Zur Veranschaulichung ist der Wert der Fluoreszenzintensitätsmessung der reinen Tracerlösung bei einem X-Achsenwert von 0,001 eingetragen. Es sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung dargestellt.

konnte. Allerdings war kein Unterschied zwischen den CXCR1 schwach exprimierenden HEK293/CXCR1-A7 (vgl. Abbildung 5.46) und den, den Rezeptor stark exprimierenden Einzelklon HEK293/CXCR1-C11 (vgl. Abbildung 5.45), zu erkennen.

Letztlich sollten die mit Membranpräparationen CXCR1-exprimierender Zellen durchgeführten Experimente mit jenen CXCR2-exprimierender Zellen wiederholt werden. Abbildung 5.47b zeigt die Inkubation von CXCL8S72C-Fluorescein mit einer Membranpräparation der Zelllinie HEK293/CXCR2-IIH8. Die Fluoreszenzintensitätsmessung ergab bei den Messungen an beiden Geräten keine Änderung bei Zugabe der Membranpräparation (vgl. Abbildung 5.47a). Lediglich die Tracerlösung ließ eine höhere Fluoreszenzintensität erkennen. Ein von der Konzentration der Membranpräparation abhängige und somit durch die Bindung des Tracers an diese ausgelöste Veränderung war nicht zu beobachten. Über mehrere Stunden war ebenfalls keine Änderung im Verlauf der Intensität zu sehen. Abbildung 5.47b verdeutlicht, dass wie bei den CXCR1 exprimierenden Zellen eine Bindung des Tracers an die Membranpräparation stattfand. Die durch nicht-lineare Regression ermittelten Bindungskurven hatten Wendepunkte bei $18,2 \pm 7 \mu\text{g}/\text{mL}$ (F200) und $55 \pm 29 \mu\text{g}/\text{mL}$ (M1000) und unterschieden sich unter Berücksichtigung der Fehlerbalken nicht signifikant. Nach Inkubation der Proben verringerte sich die dynamische Breite, die Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität des freien gegen jene des gebundenen Tracers, was mit beiden Geräten zu beobachten war. Zudem verschob sich der Wendepunkt zu geringeren (F200) bzw. höheren (M1000) Gesamtproteinmengen (F200: $2,6 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{mL}$, M1000: $105,4 \pm 74,7 \mu\text{g}/\text{mL}$). Die letzte Messung am M1000 (zur besseren Übersicht im Diagramm nicht mehr gezeigt) zeigte dagegen entsprechend der Messwerte des F200 eine

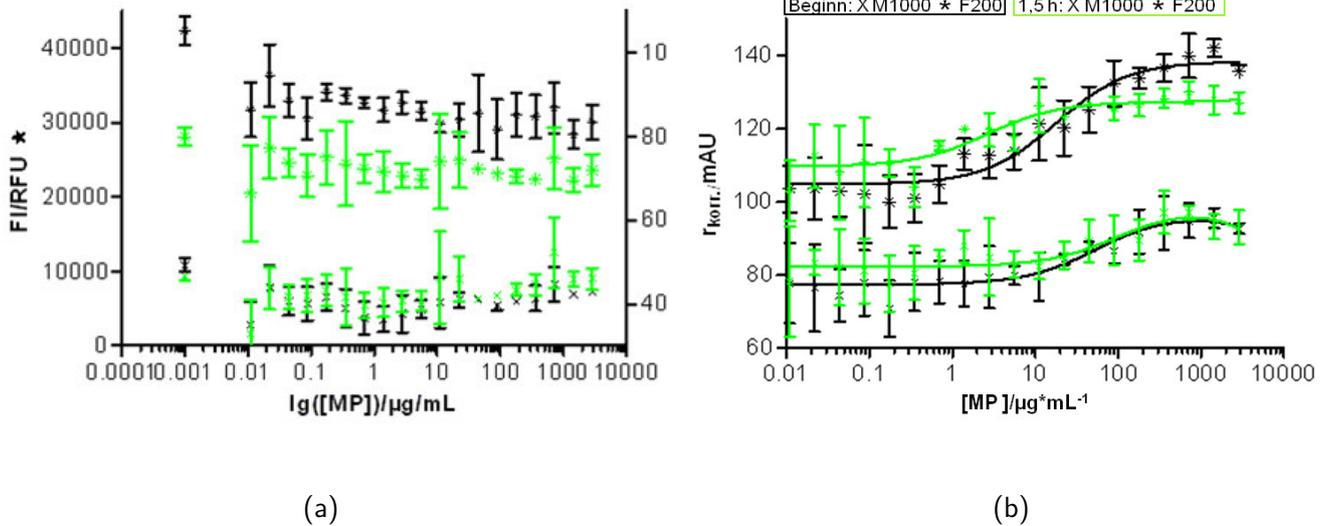


Abbildung 5.47: **Bindungskurve der Wechselwirkung zwischen HEK293/CXCR2-IIH8 und CXCL8S72C-Fluorescein.** Verschiedene Konzentrationen einer Membranpräparation der Zelllinie HEK293/CXCR2-IIH8 wurden mit 50 nM CXCL8S72C-Fluorescein für eineinhalb Stunden bei 37°C in einer MTP *Flat Bottom Black Low Volume* [Corning] inkubiert und sowohl a) Fluoreszenzintensität (FI) und b) Fluoreszenzanisotropie ($r_{\text{korr.}}$) am M1000 (gekennzeichnet durch X, Exzitation/Emission: 470 ± 5 nm/ 520 ± 5 nm, Verstärkung: 100 (120)) und F200 (gekennzeichnet durch *, Exzitation/Emission: 485 ± 20 nm/ 535 ± 25 nm, Verstärkung: 105 (130)) gemessen. Zur Veranschaulichung ist der Wert der Fluoreszenzintensitätsmessung der reinen Tracerlösung bei einem X-Achsenwert von 0,001 eingetragen. Die am M1000 erhaltene Fluoreszenzintensität bezieht sich auf die rechte Y-Achse, während jene des F200 der linken Y-Achse zugeordnet werden. Es sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung dargestellt.

Verschiebung des Wendepunkts zurück zu geringeren Werten (drei Stunden Inkubation: 39 ± 22 µg/mL). Der Wendepunkt der am F200 aufgenommenen Werte veränderte sich dagegen über die Zeit nicht mehr ($3,5 \pm 2,5$ µg/mL). Die Korrektur der Fluoreszenzanisotropie nach Dandliker *et. al* ergab keine sich signifikant von den hier dargestellten Werten unterscheidenden Wendepunkte. Das Ergebnis wurde mit einer anderen Membranpräparation dieser Zelllinie erfolgreich reproduziert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass auch mit einer Membranpräparation der CXCR2 exprimierenden Zelllinie mit CXCL8S72C-Fluorescein eine Bindungskurve erstellt werden konnte.

Die Detektion der Wechselwirkung zwischen fluoreszent markiertem CXCL8S72C und Membranpräparationen unterschiedlich transfizierter HEK293-Zellen mittels Messung der Fluoreszenzanisotropie war demnach möglich. Hierzu eignete sich CXCL8S72C-DL550 aufgrund der bei vielen Versuchen zu geringen dynamischen Breite und somit schlechten Reproduzierbarkeit im Allgemeinen sowie insbesondere der Bindung des Fluorophors DyLight®550-Maleimid an die Membranpräparation nicht. Eine solche Wechselwirkung konnte mit Fluorescein dagegen nicht detektiert werden, weshalb CXCL8S72C-Fluorescein für die erste Messung der Wechselwirkung zwischen Membran und Chemokin gewählt wurde. Die vermutete Autofluoreszenz der Membranpräparationen zeigte sich als vernachlässigbar gering. Zur näheren Bestimmung und Etablierung eines Assays zum Inhibitorscreening ist allerdings eine Methode zur Bestimmung oder Verhinderung un-

spezifischer Wechselwirkungen des Proteins mit der Membran sowie der spezifischen Wechselwirkung zu GAGs der Plasmamembran nötig. Obgleich trotz unterschiedlich starker Rezeptorexpression gegen die Erwartung vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden, waren die erhaltenen Bindungskurven reproduzierbar mit Membranpräparationen aller getesteten Zelllinien.



6 Diskussion

6.1 Nachweis der Rezeptorexpression

Es wurden HEK293-Zellen mit Vektoren zur Expression von CXCR1/2 transfiziert und mit Hilfe des Antibiotikums G418 Einzelklone selektiert, welche einen der Rezeptoren stabil exprimieren. Der Nachweis dieser rekombinanten Expression sollte mit verschiedenen immunologischen Methoden erfolgen. Um CXCR1 und CXCR2 nachzuweisen, wurden Western Blots der Zellysate und von Membranpräparationen dieser Zellen durchgeführt und lebende Zellen bereits ausgewählter Einzelklone durchflusszytometrisch untersucht. Zusätzlich wurden fixierte Zellen dieser Kulturen nach immunologischer Färbung im konfokalen Mikroskop analysiert.

6.1.1 Rezeptordimerisierung

Sowohl CXCR1 als auch CXCR2 besitzt laut Datenbank ein anhand der Proteinsequenz berechnetes Molekulargewicht von etwa 40 kDa, wobei vom Hersteller der verwendeten Antikörper (Biolegend) zusätzlich eine erwartete Bande bei etwa 67-70 kDa angegeben wird. Diese ist auf die Homo- und Heterodimerisierung der Rezeptoren zurückzuführen, da nach Wilson *et al.* (immunopräzipitierte) Rezeptoroligomere unter denaturierenden Bedingungen einer SDS-PAGE bestehen bleiben, und CXCR2-Dimere nach Trettel *et al.* auch durch DTT-enthaltenden, heißen Lämmli-Puffer und in Membransolubilisierungen mit Triton-X-100 nicht denaturierten.^{[56] [55]} Entsprechend dieser auftretenden Homo- und Heterodimere wurde oftmals in Western-Blots mit Lysaten von transfizierten und teilweise auch Wildtypzellen ein Bandenmuster mit intensiven Signalen in Höhe der 35 kDa-Bande des Standards mit zusätzlichen oder stattdessen auftretenden Banden in Höhe des 63 kDa-Proteinstandards erhalten (vgl. Abbildungen 5.2, 5.3, 5.4, 5.1, 5.2 und 5.3). Allgemein konnte beobachtet werden, dass die als Dimerbanden interpretierten Signale nicht der berechneten Größe (80 kDa) eines solchen entsprachen, sondern im Vergleich zur berechneten Proteingröße leicht zu geringeren Molekulargewichten verschoben waren (vgl. Banden in Abbildungen 5.4, 5.2, 5.3 und 5.1). Diese Beobachtung stimmt jedoch ebenfalls mit publizierten Angaben überein, wobei unterschiedliche Angaben zur Größe der Monomer- und Dimerbanden nach gelelektrophoretischer Trennung publiziert sind. So wurden von Nasser *et al.* die detektierten Größen nach agonistinduzierter Phosphorylierung der Rezeptoren für CXCR1 mit 50 kDa (Monomer) und 70 kDa (Dimer) sowie für CXCR2 mit 40 kDa (Monomer) und 55 kDa (Dimer) angegeben.^[90] Trettel *et al.* gibt dagegen für CXCR2 Banden in einer Höhe von 40 kDa und 78 kDa an, was den von Richardson *et al.* veröffentlichten Angaben in einer Phosphorylierungsstudie der Rezeptoren mit 70 kDa für CXCR1 und 45 kDa und 70 kDa für CXCR2 ähnelt.^{[55] [147] [93]} Die Bande in Höhe des 35 kDa-Standards wurde mit dem Anti-CXCR1-Antikörper (Abcam) auch bei den als Kontrolle eingesetzten Lysaten von CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) und den mit EGFP-CXCR1 (Molekulargewicht des Fusionsproteins: etwa 65 kDa) transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen, was die Spezifität der Antikörperbindung jedoch bereits in Frage stellte oder darauf hindeutete, dass die Antikörperkonzentration zu hoch war (vgl. Abbildung 5.3).

Das in fast allen Western Blots erkennbare Bandenmuster kann somit bei den hier untersuchten Rezeptoren mit einer Monomer- und einer Dimerbande erklärt werden.

6.1.2 Analyse von Zelllysaten und ganzer Zellen zum Nachweis der rekombinanten Expression

Zusätzlich wurde beim Nachweis der Rezeptorexpression, insbesondere aufgrund des ähnlichen Bandenmusters bei den Lysaten der als Kontrolle eingesetzten HEK293-Wildtypzellen, eine Wechselwirkung der Antikörper mit endogen exprimierten Proteinen, sowohl Membranproteinen als auch zytosolischen Proteinen, in Erwägung gezogen (vgl. Abbildung 5.3).

Im Gegensatz zu CXCR1 und CXCR2 sind in der Literatur bezüglich der endogenen Expression von CXCR4, einem homöostatischen Chemokinrezeptor, in HEK293-Zellen gegensätzliche Angaben zu finden, sodass die Zelllysate auch auf die Expression dieses Rezeptors hin untersucht wurden. So wurde CXCR4 in HEK293-Zellen von Atwood *et al.* auf mRNA-Ebene bestätigt und von Sierro *et al.* auf Proteinebene genannt, wohingegen Ding *et al.* eine endogene Expression in diesem Zelltyp verneint.^{[186] [207] [8] [208]} CXCR4 besitzt neben den von Park *et al.* beschriebenen strukturellen Ähnlichkeiten zu CXCR1 ebenfalls ein kalkuliertes Molekulargewicht von 40 kDa, wobei zahlreiche Isoformen, darunter die von Sloane *et al.* publizierten, glykosylierten Formen bei 40, 47, 73 und 80 kDa, auch in transfizierten HEK293, beobachtet werden.^{[209] [210] [211]} Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass beim Nachweis des CXCR1 CXCR4 detektiert wurde. Zusätzlich wurden - neben der bekannten Homodimerisierung von CXCR1 und CXCR2 (vgl. Wilkinson *et al.*)- von Kaneider *et al.* Hinweise auf die Heterodimerisierung von CXCR1 und CXCR4 veröffentlicht.^{[212] [56]}

Die Western-Blot-Analyse der Lysate verschiedener Zelllinien zeigte zwar unter anderem Banden, welche den beschriebenen, erwarteten Monomer- und Dimerbanden des CXCR1 und CXCR2 entsprachen, allerdings wurden sowohl mit den gegen CXCR1 als auch dem gegen CXCR2 gerichteten Antikörpern bei allen transfizierten wie auch bei Wildtypzellen stets ähnliche Bandenmuster erhalten. Dies wurde vor allem durch den in Abbildung 5.4 dargestellten Vergleich verschiedener Zelllysate deutlich: Neben Lysaten der Wildtypzellen wurden auch jene der CXCR1- und CXCR2-transfizierten Zellen nach dem Blotten mit Antikörpern gegen CXCR1, CXCR2 und auch CXCR4 inkubiert, wobei sich die Bandenmuster der einzelnen Proben mit keinem der Antikörper unter Berücksichtigung der Intensität der gesamten Probenspur unterschieden und somit ein spezifischer Nachweis der einzelnen Rezeptoren nicht möglich war. In diesem Fall hätten alle detektierten Banden auf unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper zu endogen exprimierten z.B. zytosolischen Proteinen zurückgeführt werden müssen. Zudem konnten die bei Wildtypzellen reproduzierbar detektierten Signale in Höhe der Rezeptorbanden, welche mit jenen der transfizierten Zellen übereinstimmen, nicht als Beweis einer erfolgreichen Transfektion gedeutet werden, da eine endogene Expression der Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden konnte.

Unter Berücksichtigung der Resistenz der transfizierten Zellen gegen das Selektionsantibiotikum wäre ein *Silencing* des für die Expression genutzten CMV-Promoters jedoch eine denkbare Erklärung, wieso trotz Antibiotikaresistenz unter Umständen keine Rezeptorexpression nachgewiesen werden könnte. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die gezielte DNA-Methylierung ins Genom integrierter CMV-Promotoren durch die Methylierungsmaschinerie der Säugerzellen zu einer Regulierung der Genexpression führt und eine Verringerung der Proteinexpression dadurch möglich ist.^[213]

Zusammenfassend resultierten aus den Western Blots der Zellysate zwei konträre Schlussfolgerungen: Da sich die Zelllinien bezüglich der Bandenmuster bei keinem der verwendeten Antikörper unterschieden, werden entweder alle Rezeptoren in HEK293-Zellen endogen exprimiert oder keiner der Rezeptoren konnte durch die verwendeten Antikörper spezifisch nachgewiesen werden, sodass die erhaltenen Banden auf Kreuzreaktionen der Antikörper zurückgeführt werden müssten. Die Ergebnisse der sensitiveren durchflusszytometrischen Analyse mit lebenden Zellen, welche sowohl CXCR1 als auch CXCR2 in beiden transfizierten Zelltypen (HEK293/CXCR1 und HEK293/CXCR2) und den Wildtypzellen detektierte, lassen ebenfalls keine genaueren Schlussfolgerungen zu, sondern stimmen mit beiden oben genannten Hypothesen, einer unspezifischen Bindung der Primärantikörper an die Zelloberfläche oder einer endogenen Expression der Rezeptoren, überein. Diese Kreuzreaktionen waren auf eine unspezifische Bindung des variablen Teils der Antikörper mit der Zelloberfläche und Membranproteinen zurückzuführen, da die entsprechenden Isotypkontrollen keine vergleichbar hohe Bindung zeigte. Ebenso sprach die starke Fluoreszenz beim Nachweis des CXCR1 (FITC anti-*human* CD181, CXCR1) in HEK293/CXCR1-A7 in durchflusszytometrischen Analysen mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen diesen Rezeptor (FITC-konjugierten Primärantikörper [Biolegend] (Daten hier nicht gezeigt) und dem im Western-Blot verwendeten Primärantikörper (Abcam) mit einem fluoreszent markierten Sekundärantikörper, Abbildung 5.6), für unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper zu - aufgrund der diskreten Banden im Western Blot - ausgewählten Proteinen auf der Zelloberfläche, was im Vergleich mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie deutlich wurde. In dieser konnten Kreuzreaktionen durch eine Reduzierung der Antikörperkonzentration eliminiert werden, wobei im Fall des HEK293/CXCR1-A7 aufgrund der sehr geringen Fluoreszenzintensität, welche sich kaum von jener der Wildtypzellen unterschied, CXCR1 nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 5.8b). Dagegen konnten in HEK293/CXCR1-C11 und HEK293/CXCR2-IIH8 mit dieser Nachweismethode die der Transfektion entsprechenden Rezeptoren nachgewiesen werden.

In Western-Blot-Analysen der Lysate transient transfizierter Zellen (vgl. Abbildung 5.1) konnte die rekombinante Expression ebenfalls nachgewiesen werden. Durch die im Vergleich zu den anderen Lysaten (Wildtyp, Leervektor und pcDNA3.1(+)/CXCR1) ausgeprägtere Bande der mit pcDNA3.1(+)/CXCR2 transfizierten Zellen mit einem gegen CXCR2-gerichteten Antikörper wurde hierbei deutlich, dass die Transfektion erfolgreich war und nicht die Fehlerquelle darstellen konnte. Da keine Banden in gleicher Höhe bei den als Negativkontrolle mitgeführten Lysaten zu sehen waren, wurde diese als CXCR2 identifiziert. Die schwache Signalstärke dieser Bande kann darauf zurückzuführen sein, dass (trotz relativ hoher Gesamtproteinmenge) in einem Zellysate die Membranproteine einen relativ kleinen Anteil an der Gesamtproteinmenge haben und daher schwer zu detektieren sind. Das Lysat der mit pcDNA3.1(+)/CXCR1 transfizierten Zellen ergab das gleiche Bandenmuster wie die Lysate des mit dem Leervektor transfizierten und der Wildtyp-Zellen, so dass eine Kreuzreaktion des gegen CXCR2 gerichteten Antikörpers der Firma Santa Cruz Biotechnologies zu CXCR1 trotz der großen Homologie zwischen den beiden Rezeptoren von 77% anhand dieses Blots ausgeschlossen werden konnte.^[7] Die Doppelbanden aller nicht mit pcDNA3.1(+)/CXCR2 transfizierten Zellen in dieser Höhe stellen Wechselwirkungen zwischen Antikörper und endogenen Proteinen dar. Da sie leicht nach oben versetzt erscheinen und eine viel geringere Intensität aufweisen, können unspezifische Kreuzreaktionen vermutet werden. Allerdings kann es sich in Anbetracht des Verlaufs der Probenspuren auch um dieselbe Bandenhöhe handeln, was auf eine endogene Expression des Rezeptors hindeuten würde,

wobei die Transfektion durch die zusätzliche rekombinante Expression zu einer Überexpression geführt hätte.

6.1.3 Analyse von Membranpräparationen zum Nachweis der rekombinanten Expression

Die Western-Blot-Analyse von Membranpräparationen stimmte schließlich bezüglich der rekombinanten Expression der Rezeptoren in den jeweils transfizierten Zellen mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie überein (vgl. Abbildung 5.5). So konnte mit dem zugehörigen Antikörper (Anti-CXCR1) CXCR1 in zwei intensiven Banden ohne weitere, vergleichbar intensive Banden, nachgewiesen werden, wobei das Signal zwischen der 35 kDa und der 48 kDa-Markerbanden als Monomer, jene bei etwa 63 kDa als Dimerbande gedeutet wurde (vgl. Abbildung 5.5b). Letztere Bande wurde ebenfalls bei einer Inkubation der Membran mit einem gegen CXCR4 gerichteten Antikörper detektiert (vgl. Abbildung 5.5a). Unter Annahme einer endogenen Expression des CXCR4 in HEK293, welche unter 6.1.2 bereits erläutert wurde, schien es sich demnach bei dieser Bande um das Heterodimer CXCR1/CXCR4 zu handeln. Die entsprechenden kleineren Signale, welche Monomere widerspiegeln, stimmten bei beiden Blots dementsprechend nicht überein. So wurde mit Anti-CXCR1 eine starke Bande oberhalb des 35 kDa-Standards detektiert, welche gegenüber der erwarteten Bande für CXCR1 bei etwa 40 kDa leicht versetzt war. Die verschiedenen Signale bei Anti-CXCR4 zwischen 40 kDa und 35 kDa könnten durch die erwähnten Isoformen des Rezeptors erklärt werden. Es war nicht auszuschließen, dass diese Banden auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Die Vermutung, dass hier das CXCR1-CXCR4-Heterodimer detektiert wurde, wurde durch einen Vergleich der Signalstärke gestützt: Intensiv gefärbte Banden konnten bei der Membranpräparation HEK293/CXCR1-C11 lediglich nach einer Inkubation mit CXCR1- und CXCR4-Antikörpern beobachtet werden. Bei Inkubation dieser Membranpräparation der CXCR1 exprimierenden Zellen mit einem gegen CXCR2 gerichteten Antikörper waren lediglich unterhalb des 25 kDa und 35 kDa-Standards zwei Signale detektierbar. Bei der größeren Bande hätte es sich um eine Monomerbande (erwartete Masse: 40 kDa) handeln können, was wiederum für die endogene Expression des CXCR2 gesprochen hätte, allerdings zeigte der Western Blot zum Nachweis des CXCR2 nach einer transienten Transfektion Banden für CXCR2 größer 35 kDa und bei Western Blots von Membranpräparationen wurde für CXCR2 eine Dimerbande oberhalb der 65 kDa-Markerbande detektiert (vgl. 5.1 5.5d). Wie bereits bei Western Blots der Zellysate zum Nachweis der transienten Expression des CXCR2 zu sehen, zeigte auch dieser Western Blot der Membranpräparation, dass der gegen CXCR1 gerichtete Antikörper nicht an die CXCR2-Banden bindet. Zudem widersprachen die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie der endogenen Expression des CXCR2. Ebenso wurde die kleinere Bande aufgrund des viel zu geringen Molekulargewichts als unspezifische Wechselwirkung der Antikörper gedeutet.

Die Hypothese einer endogenen Expression des CXCR4 mit Bildung von Heterodimeren mit CXCR1 passte zu den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse der Zellysate von Wildtypzellen und CXCR1-Klonen und würde das komplexe Bandenmuster erklären, da durch die Inkubation mit Antikörpern gegen diese beiden Rezeptoren jeweils sowohl die Homodimere der jeweiligen Rezeptoren, die Heterodimere und die jeweiligen Monomere detektiert werden könnten (vgl. Abbildung 5.4).

Im Gegensatz zum Nachweis des CXCR1 als Monomer und Heterodimer CXCR1/CXCR4 konnte CXCR2 demnach nicht in der Membranpräparation HEK293/CXCR1-C11, jedoch eindeutig in HEK293/CXCR2-

IIH8 nachgewiesen werden, wodurch die rekombinante Expression der Rezeptoren in den entsprechend transfizierten Zellen bestätigt werden konnte.

Der Vergleich von Western Blots von Zellysaten (siehe Abbildung 5.4, 5.3 und 5.1) mit jenen der Membranpräparationen (Abbildungen 5.5) verdeutlichte zudem, dass die Kreuzreaktionen der Antikörper hauptsächlich auf zytosolische Proteine zurückzuführen waren. Zusätzlich zur konfokalen Mikroskopie ermöglichte die Western-Blot-Analyse von Membranpräparationen somit den spezifischen Nachweis der Rezeptoren.

6.1.4 Vergleich der Nachweismethoden

Im Vergleich der durchgeführten immunologischen Methoden wurde ersichtlich, dass der Western Blot mit der hier beschriebenen Durchführung zur Detektion der Überexpression in Zellysaten nicht sensitiv genug ist, nach einer Abtrennung der zytosolischen Proteine durch die Anfertigung einer Membranpräparation jedoch zum spezifischen Nachweis der Rezeptoren genutzt werden konnte. In Zukunft könnten höhere, als die verwendete (1 µg/mL) Antikörperkonzentration eingesetzt werden, um die bei Zellysaten detektierten unspezifischen Wechselwirkungen zu eliminieren, welche durch die somit nötige, hohe Verstärkung an der Geldokumentationsstation verstärkt auftreten. Alternativ wäre sowohl der Austausch des verwendeten Sekundärantikörpers, um die Qualität des konjugierten Enzyms sicherzustellen, als auch eine Veränderung des Verhältnisses von Primär- zu Sekundärantikörper denkbar. Die in der Durchflusszytometrie eingesetzten Antikörperkonzentrationen wurden entsprechend der Angaben der Hersteller (Biolegend und Abcam) ausgewählt, sollten jedoch in zukünftigen Experimenten, entsprechend der Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie, ebenfalls reduziert werden. Bei allen Optimierungsexperimenten empfiehlt sich die Verwendung einer Zelllinie mit bekannter Rezeptorexpression, wobei sich beispielsweise nach nun erfolgter vollständiger Analyse der Einzelklon HEK293/CXCR1-C11 anbietet.

Obgleich die Ergebnisse vorwiegend gegen eine endogene Expression der Rezeptoren in HEK293-Wildtypzellen sprachen, kann eine endogene Expression des CXCR1 und CXCR2 unter Berücksichtigung der Ergebnisse aller durchgeführten immunologischen Nachweise nicht vollständig ausgeschlossen werden, sodass sich diese Zelllinie nicht als Negativkontrolle beim Nachweis der rekombinanten Expression der Rezeptoren eignete. Zur Unterscheidung einer möglichen endogenen von der rekombinanten Expression sollten die Rezeptoren als markierte Fusionsproteine, beispielsweise für Western-Blot-Analysen mit einem His-Tag, exprimiert werden.

Zusammenfassend konnte die rekombinante Expression des CXCR1 in HEK293/CXCR1-C11 und jene des CXCR2 in HEK293/CXCR2-IIH8 durch diese immunologischen Nachweise bestätigt werden, während es sich bei dem als positiv bewerteten Einzelklon HEK293/CXCR1-A7 trotz der eindeutig positiven durchflusszytometrischen Analyse und den Banden in Western-Blots der Zellysate um eine, wenn überhaupt nur sehr gering ausgeprägte Expression des CXCR1 handelt. Somit standen für den geplanten Aufbau eines auf Fluoreszenzanisotropie basierenden Bindungsassays zwei Zelllinien (HEK293/CXCR1-C11 und HEK293/CXCR2-IIH8) und deren Membranpräparationen zur Verfügung.

6.2 Etablierung eines Calcium-Assays und Nachweis der Rezeptorfunktion

Als Ergänzung zu den immunologischen Versuchen zum Nachweis der Rezeptoren sollte deren biologische Aktivität in einem Aktivitätsassay untersucht werden. Hierzu sollte ein Calcium-Assay etabliert werden, wozu neutrophile Granulozyten verwendet werden sollten, da diese die Rezeptoren von CXCL8 endogen exprimieren.^[48] Zusätzlich sollte dieser Assay der Charakterisierung von Inhibitoren dienen.

6.2.1 Calcium-Assay mit neutrophilen Granulozyten

Die Durchführung von Aktivitätsassays mit Primärzellen erfordert deren Isolierung unmittelbar vor dem Experiment. Ein weiterer Nachteil äußert sich in der schlechten Reproduzierbarkeit aufgrund der großen Abhängigkeit des Zellverhaltens von den Blutspendern, was unter anderem mit der von Chuntharapai erwähnten stark variierenden Expression der Rezeptoren zwischen verschiedenen Spendern begründet werden kann.^[48] Dementsprechend variierten die mit diesen Primärzellen erhaltenen Ergebnisse stark, sodass eine Mittelwertbildung über die einzelnen Experimente als nicht sinnvoll angesehen und nicht durchgeführt wurde. Diese Punkte verdeutlichen die Notwendigkeit zur Etablierung einer stabilen Zelllinie und Übertragung des etablierten Assays auf eine solche für das zukünftige Screening von Inhibitoren.

Diese ersten Experimente wurden mit CXCL8-Lösungen durchgeführt, deren Konzentration im BCA-Assay bestimmt wurde. Wie unter 6.3 erläutert, liefert diese Methode im Vergleich zur Messung der Absorption bei 280 nm eine um den Faktor fünf geringere Proteinkonzentration, sodass die hier angegebenen Endkonzentrationen von 5, 50 und 500 nM CXCL8 in Wirklichkeit - schätzungsweise um den Faktor fünf - höher lagen.

Der zweistufige, ligand-induzierte Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist ein von der Konzentration des Liganden abhängiger Prozess und sättigbar.^{[214] [215] [158]} Bei den ersten Experimenten mit neutrophilen Granulozyten war deutlich zu sehen, dass die geringste Konzentration das größte Signal hervorrief. Diese Beobachtung konnte mit einer Dimerisierung des Chemokins bei höheren Konzentrationen erklärt werden, was durch das Ergebnis der unter 5.42 dargestellten Bindungskurve mit einer Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich in einem anderen Puffersystem, gestützt wurde. In der hier maximal eingesetzten Proteinkonzentration (500 nM, aufgrund der Bestimmung im BCA-Assay entsprechend höher, jedoch im Nachhinein nicht mehr genau bestimmbar) hätte CXCL8 demnach vorwiegend als Dimer vorliegen können, welches im Vergleich zur Monomervariante deutlich geringere Bindungsaffinitäten zu den Rezeptoren (CXCR1: 70-fach, CXCR2: 20-fach) aufweist.^{[41] [45]} Die Affinität stellt eine im Gleichgewicht ermittelte Größe dar und korreliert nach Nasser *et al.* nicht zwangsläufig mit der Stärke des ausgelösten Signals, welche auch durch die Lebensdauer der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung und somit vor allem durch die durch k_{off} beschriebene Dissoziationsrate, beeinflusst wird.^[42] Trotz allem werden Unterschiede bezüglich der durch das Monomer oder Dimer ausgelösten Signale in der Literatur beschrieben, wobei die Dimerisierung des Chemokins die Aktivierung von CXCR1 stärker als jene von CXCR2 zu beeinträchtigen scheint.^[46] So wurde kein Unterschied in der chemotaktischen Antwort nach Stimulierung mit der Dimer- oder Monomer-Variante durch CXCR2 beobachtet, während im Fall von CXCR1 das Monomer

eine stärkere Zellantwort hervorruft.^[42] Neutrophile Granulozyten exprimieren beide Rezeptoren endogen, wodurch die Auswirkung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts durchaus relevant sein könnte.^[48] Die Dimerisierung erklärt zwar den Unterschied der Signalstärke zwischen 5 und 500 nM CXCL8, allerdings kann das Ausbleiben des Signals bei einer Konzentration an CXCL8 von 50 nM hiermit nicht begründet werden. Da dieser Effekt wiederholt beobachtet werden konnte, ist die Wahrscheinlichkeit eines experimentellen Fehlers gering.

6.2.2 Calcium-Assay mit transfizierten HEK293

Aufgrund der genannten Nachteile bei der Durchführung eines Aktivitäts-Assays mit primären Zellen sollte der Calcium-Assay zusätzlich mit transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt werden.

Zur Etablierung des Assays mit diesen Zellen wurden ebenfalls drei verschiedene Konzentrationen des Chemokins CXCL8 miteinander verglichen. Der beobachteten Abnahme des Signals mit steigender Konzentration an CXCL8 bei neutrophilen Granulozyten widerspricht die Zunahme der Signalstärke mit steigender Konzentration an CXCL8 bei transfizierten HEK293-Zellen. Diese Ergebnisse der Stimulierung der transfizierten HEK293-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an CXCL8 entstanden jedoch vor der endgültigen Optimierung des Assays mit adhärenenten, transfizierten Zellen und zeigten allgemein eine schlechte Reproduzierbarkeit bezüglich der Signalstärke. Dies kommt vor allem am Beispiel des HEK293/CXCR1-A7 zum Ausdruck. Bei der Analyse der Rezeptorexpression mittels konfokaler Mikroskopie zeigte dieser Einzelklon keine starke Fluoreszenz und damit keine eindeutige Expression von CXCR1. Trotzdem ist hier ebenfalls eine Stimulierung nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an CXCL8 zu sehen. Demnach könnte es sich bei diesen Signalen um falschpositive Ergebnisse handeln. Dem widerspricht allerdings, dass solche unerwarteten Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration ausschließlich bei HEK293-Zellen auftraten. So wurde in wenigen Ausnahmen auch bei HEK293-Wildtypzellen eine Stimulierung detektiert, wobei hier jedoch eine Kreuzkontamination in der Zellkultur eine mögliche Ursache darstellen könnte. Andere Zelllinien, HT29 und CHO, zeigten dagegen in mindestens drei unabhängigen Experimenten keinerlei Stimulierung nach Zugabe von CXCL8, teilweise ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen. Obgleich eine endogene Expression des CXCR1 in HT29 von Sturm *et al.* immunologisch gezeigt wurde, konnten die Rezeptoren in Western-Blot-Analysen bei HT29-Zellen in dieser Arbeit hier (vgl. Abbildung 5.3) nicht oder nur in Form einer vergleichsweise sehr schwachen Bande detektiert werden, sodass angenommen wurde, dass der Rezeptor von der hier genutzten Zelllinie¹ nicht exprimiert wird.^[51] Die mögliche Stimulierung der HEK293-Wildtypzellen durch CXCL8 würde wiederum mit der bereits unter 6.1 erläuterten Hypothese einer endogenen Expression der Rezeptoren in HEK293-Wildtypzellen übereinstimmen. Wird die in der konfokalen Mikroskopie kaum sichtbare Fluoreszenz des HEK293/CXCR1-A7 als sehr schwache Expression gedeutet, so bedeutet dies, dass bereits eine geringe Anzahl an Rezeptoren, vermutlich aufgrund der Verstärkung des in einer Vielzahl von Zellen ausgelösten Signals, zur Detektion genügt. Diese Signale unterschieden sich nicht von jenen des CXCR1 deutlich stärker exprimierenden Zellklons HEK293/CXCR1-C11, was dagegen auf eine sehr niedrige dynamische Breite schließen lässt.

Zur Klärung der widersprüchlichen Ergebnisse zwischen immunologischem Nachweis und Aktivitäts-

¹ vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Kolmar, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, zur Verfügung gestellt

assay bezüglich des HEK293/CXCR1-A7 könnten weitere Aktivitätsassays wie beispielsweise der mit HEK293/CXCR1-B8 unter 5.16 beschriebene Transwell-Assay durchgeführt werden, in welchem die durch CXCL8 ausgelöste Migration der Zellen untersucht wird. Mit HEK293/CXCR1-C11 stand allerdings ein auf beiden Ebenen als positiv bewerteter Einzelklon zur Verfügung, mit dem weiter gearbeitet werden konnte.

Mit Hilfe der von Ina Rink erstellten Kalibriergeraden zur Bestimmung der Chemokinkonzentration über die Absorptionmessung bei 280 nm konnte mit der in Aktivitätsassays gängigen Konzentration von 10 nM CXCL8 (entspricht etwa 25 nM CXCL8, wenn die Konzentration mit einem BCA-Assay bestimmt wird) in transfizierten HEK293 kein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration detektiert werden. Ein solcher Unterschied in der benötigten Ligandenkonzentration ist auch in der Literatur beschrieben. So ist für die Durchführung eines Calcium-Assays mit neutrophilen Granulozyten und HEK293/CXCR1 und CXCR2 von Mortier *et al.* publiziert, dass die minimal notwendige CXCL8-Konzentration zur Auslösung eines Signals in diesen adhären Zellen ein Zehnfaches der bei Primärzellen ausreichenden Proteinmenge beträgt.^[215] Des Weiteren ist die Stimulierung transfizierter HEK293-Zellen mit einer (50 nM) CXCL8-Lösung publiziert, was dem fünffachen der hier getesteten Konzentration entspricht.^[168]

Die im Vergleich zu primären Zellen geringere Signalstärke wurde auch im Transwell-Assay gesehen. Abbildung 5.16 zeigte eine signifikante Migration der transfizierten HEK293 in Anwesenheit des Chemoattraktants CXCL8, allerdings war der Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle deutlich geringer als bei neutrophilen Granulozyten. In diesem Assay war der geringe Wert der Positivkontrolle im Vergleich zu den im Arbeitskreis von Ina Rink mit neutrophilen Granulozyten durchgeführten Versuchen auf den adhären Charakter der transfizierten Zellen zurückzuführen. Während bei Suspensionzellen die Migration durch die die Reservoirs trennende Membran in die untere Kammer stattfindet, verbleiben HEK293-Zellen durch Adhäsion in dieser Membran.

BSA stellt bei unterschiedlichen zellbasierten Aktivitätsassays zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen einen gängigen Zusatz zum verwendeten Puffer, auch zur Durchführung des Calcium-Assays in HHBS, dar und ist unter anderem auch im Chemotaxispuffer enthalten.^{[216] [147] [151] [217]} Nach Zugabe dieses Proteins konnte sowohl das durch CXCL8 ausgelöste Signal durch den gegen das Chemokin gerichteten Antikörper inhibiert als auch signifikante Signale bei physiologischen Konzentrationen (10 nM) mit transfizierten HEK293 detektiert werden. Dies entsprach den im Transwell-Assay mit selbigen Zellen erhaltenen Ergebnissen mit einer Konzentration von 12 nM (vgl. Abbildung 5.16). Eine mögliche Erklärung für die Wirkung von BSA stellt die Unterbindung von unspezifischen Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen der verwendeten Materialien (MTPs, Pipetten) und CXCL8 dar, da die möglichen Bindungsstellen durch den Überschuss des zur Reduktion solcher Effekte eingesetzten BSAs bereits besetzt sind.^[218] Letztlich würde die durch Blockieren unspezifischer Bindungsstellen effektiv zur Verfügung stehende Konzentration an CXCL8 durch die Zugabe von BSA erhöht werden, wodurch mit geringeren Konzentrationen an Chemokin (und Inhibitor) die gleichen Effekte erzielt werden konnten. Diese Überlegung wurde durch die Beobachtung gestützt, dass bei Inhibierungsversuchen ohne Zugabe von BSA bei Anwesenheit eines eigentlich zur Wechselwirkung mit CXCL8 bestimmten Moleküls stärkere Signale hervorgerufen wurden, als bei den nur CXCL8 enthaltenden Lösungen, was darauf hindeutete, dass hier die unspezifischen Bindungsstellen durch den Inhibitor (in diesem Fall das Inhibitorpeptid oder Anti-CXCL8) besetzt worden sind.

Die auch ohne Zusatz von BSA beobachtete Inhibierung des durch CXCL8 ausgelösten Signals bei neutrophilen Granulozyten konnte mit der bereits angesprochenen, allgemein höheren Sensitivität diese Zellart bezüglich der Aktivierung durch CXCL8 begründet werden. Der bei Calcium-Assays auftretende und in Abbildung 5.12 gezeigte Anstieg des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten der Basislinie, welcher mit einer Abnahme der dynamischen Breite einhergehen könnte, war auf einen Austritt des Farbstoffs aus der Zelle zurückzuführen, obwohl die im Zytosol stattfindende Esterhydrolyse eine solche unterbinden sollte. Durch die Wechselwirkung des Fluorophors mit den im Puffer enthaltenen Calciumionen erhöhte sich die Fluoreszenzintensität bei 340 nm und die Basislinie stieg an. Hierbei können die im Puffer enthaltenen Calciumkonzentrationen nach McDonough und Button bereits ausreichen, um den Farbstoff zu sättigen und die maximal detektierbare Fluoreszenzintensität nach einer Anregung bei 340 nm zu bewirken.^[219] Da trotz dieses Anstiegs weiterhin nach Zugabe von CXCL8 eine Änderung dieser relativen Fluoreszenzintensität detektiert werden konnte, schien es jedoch noch nicht zu einer Sättigung des Farbstoffs zu kommen. Nach Malgaroli *et al.* handelt es sich hierbei um einen mit zunehmender Temperatur bei Inkubation der Zellen mit Fura-2AM steigenden und von der Zellart abhängigen Prozess, wobei aufgrund dieser Temperaturabhängigkeit von den Autoren ein aktiver Prozess anstelle der passiven Diffusion vermutet wurde. Zusätzlich stützten Malgaroli *et al.* die Vermutung eines beteiligten Transporters am Austritt des Fluorophors durch die Inhibierung dieser Beobachtung nach Zugabe von Probenecid.^[163] Hierbei handelt es sich um einen Inhibitor von Transportern organischer Anionen.^{[219] [164] [220]} Fura-2AM wird als Stammlösung in DMSO angesetzt, bei DMSO-Konzentrationen über 0,5 % kann es auch zu Wechselwirkungen des Lösungsmittels mit Zellmembranen kommen, was deren Durchlässigkeit erhöht. Dies führt nach Chambers *et al.* sowohl zu einem Austritt des Farbstoffs aus den Zellen als auch zu einem Influx der im Versuchspuffer enthaltenen Ionen und somit zu einem Anstieg der Basislinie.^[143] Bei den hier durchgeführten Experimenten betrug die finale Konzentration an DMSO lediglich 0,2 % (v/v), wodurch DMSO demnach nicht für den beobachteten Anstieg der Basislinie verantwortlich gewesen sein dürfte, jedoch letztlich nicht ausgeschlossen werden konnte. Durch eine Reduzierung der Zyklusanzahl, der Beladung mit Fura-2AM und Injektion bei Raumtemperatur sowie der Beschränkung auf zwei unterschiedliche Injektionslösungen pro Mikrotiterplatte konnten acht bis zehn Injektionen kontinuierlich ohne deutliche Steigung der Basislinie durchgeführt werden, wobei sechs bis acht dieser MTP pro Tag bearbeitet werden können. Sollen in zukünftigen Experimenten mehr als diese Anzahl an Injektionen in einem Durchgang durchgeführt werden, was eine größere Zeitspanne erfordert, kann dieser Transport des Farbstoffs aus der Zelle durch Zugabe von Probenecid unterbunden werden.

6.2.3 Calcium-Assay zum Test von Inhibitoren

Der hier etablierte Aktivitätsassay eignete sich noch nicht zum Hochdurchsatz-Screening von Chemokininhibitoren, was durch den schlechten Z'-Faktor, teilweise im negativen Bereich (-1,86 bei der Verrechnung zweier unabhängiger Experimente, jeweils in Vierfachbestimmung), deutlich wurde. Innerhalb einer Mehrfachbestimmung (n=4) konnte ein sehr guter Z'-Faktor von 0,52 erzielt werden, allerdings war dieses Ergebnis nicht reproduzierbar. Weiterhin ist der Unterschied in der Signalstärke der Positivkontrollen von Durchführung zu Durchführung zu nennen, welche zusätzlich für den schlechten Z'-Faktor mit verantwortlich war. Dieser zeigte deutlich, dass die dynamische Breite, der Unterschied zwischen Positiv- und

Negativkontrolle, nicht groß genug war bzw. die Werte der einzelnen Durchführungen zu stark schwankten. Eine Verstärkung der Signalstärke und damit Zunahme der Stabilität des Assays könnte jedoch durch eine transiente Transfektion des zur Signaltransduktion benötigten G-Proteins erreicht werden. So zeigte Galzi *et al.*, dass HEK293-Zellen, welche Chemokinrezeptoren stabil exprimieren, durch die zusätzliche transiente Transfektion mit dem G_i -Protein im Calcium-Assay stärkere Signale selbst bei niedrigeren Temperaturen (21 °C) liefern, als die entsprechenden, nicht zusätzlich transfizierten Zellen bei 37 °C, wobei hier eigentlich eine größere Aktivität zu erwarten wäre.^[221] Zusätzlich resultierte die von Galzi *et al.* publizierte, automatisierte Durchführung des Assays in einem robusten Assay mit einem Z'-Faktor - je nach Chemokin von 0,52 bzw. 0,6, was darauf hin deutet, dass die erwähnte Transfektion unter Umständen eine größere Stabilität des in dieser Arbeit beschriebenen Assays am Tecan Infinite[®]M1000 bewirken könnte und beweist, dass ein Calcium-Assay mit entsprechenden Geräten durchaus zum Screening von Bibliotheken genutzt werden kann.^[221]

Des Weiteren standen am hier genutzten Tecan Infinite[®]M1000 lediglich zwei Injektoren zur Verfügung, wodurch der Vergleich mehrerer, mit dem Chemokin wechselwirkender, Inhibitoren mit einer Vorinkubation über mindestens eine Stunde, durch welche die Bindung des Chemokins an den Inhibitor sichergestellt werden sollte, nicht möglich war. An den Rezeptoren angreifende Inhibitoren könnten dagegen durchaus gescreent werden, da bei einem solchen Versuchsaufbau nur eine - CXCL8 enthaltende - Injektionslösung nötig wäre und die verschiedenen Inhibitor-Membranpräparationen nach einer Vorinkubation in geschlossenen Gefäßen zur Messung in der MTP vorgelegt werden könnten. Die Anzahl zur Verfügung stehender Injektoren erschwerte zudem die Aufnahme einer *Dose-response-curve*, bei welcher die Signalstärke in Abhängigkeit von der Ligandkonzentrationen bestimmt wird. Zusätzlich ist anzumerken, dass unabhängig von Injektionsvolumen und Anzahl der Injektionen ein relativ großes Probenvolumen (etwa 1 mL) jeder Lösung benötigt wurde, um die Vorrichtung luftblasenfrei zu befüllen. Zur Prüfung potentieller Inhibitoren, die an Chemokine binden, würde demnach ebenfalls eine entsprechend große Menge benötigt, die in einem ersten Screening nicht immer zur Verfügung steht. Um mehrere, unterschiedliche Chemokin-Inhibitorlösungen innerhalb eines Experiments vergleichen zu können, wurde eine manuelle Zugabe der Lösungen innerhalb des Messzykluses getestet. Zugleich könnte so die benötigte Menge an Inhibitor reduziert werden, da lediglich das tatsächlich zur Membranpräparation zugegebene Volumen benötigt werden würde. Die Zeitspanne zwischen Injektion und maximalem Signal betrug jedoch nur wenige Sekunden, sodass eine manuelle Injektion aufgrund der beim Einfahren der MTP in das Gerät verstreichenden Zeit nicht möglich war. Die Durchführung dieses Assays ist jedoch prinzipiell laut Literatur im Hochdurchsatz-Verfahren vollständig automatisiert mit den entsprechenden Geräten möglich. Hierzu werden zudem Fluoreszenzquencher eingesetzt, um den Waschschrift zwischen Farbstoffbeladung und Injektion eliminieren zu können.^{[217] [143]}

Ein weiteres Problem bei der hier durchgeführten automatischen Injektion stellte die Verunreinigung des Gerätes nach Verwendung hoher CXCL8-Konzentrationen sowie häufigem Einsatz dar. Um Artefakte durch diese Verunreinigungen zu vermeiden, musste das Gerät regelmäßig durch Injektion des reinen Puffers auf falschpositive Signale durch Reste des CXCL8 geprüft werden.

Abbildungen 5.14 und 5.15d zeigen, dass dieser Aktivitätsassay zur Bestätigung der in einem vorherigen Assay bereits als potentielle Inhibitoren identifizierten Substanzen genutzt werden kann. Die inhibitorische Wirkung des im Arbeitskreis von Dorothea Helmer synthetisierten Peptids CXCL8-RPLoops konnte

sowohl mit neutrophilen Granulozyten als auch mit transfizierten HEK293-Zellen bestätigt werden.^[110] CXCL8-RPLoops besitzt eine Affinität von $0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ zu CXCL8. Aufgrund dessen sollte die in dieser Arbeit gemessene, vollständige Unterdrückung des durch CXCL8 ausgelösten Effekts bei einer Inkubation des Chemokins mit einer $0,5 \mu\text{molaren}$ Lösung dieses Inhibitors nicht zu sehen sein. Diese Diskrepanz der mit Primärzellen erhaltenen Signale sowie Ungenauigkeiten in der Konzentrationsbestimmung der Komponenten und letztlich der Streuung der angegebenen Bindungsaffinität von CXCL8 mit dem genannten Inhibitorpeptid stellen mögliche Ursachen für die dennoch beobachtete vollständige Inhibierung dar. Des Weiteren muss erwähnt werden, dass die mit neutrophilen Granulozyten durchgeführten Experimente im Gegensatz zu jenen mit transfizierten HEK293-Zellen mit der fluoreszent markierten Variante des Inhibitors durchgeführt wurden, wobei eine auf Fluorescein zurückzuführende Begünstigung der Wechselwirkung zwischen Peptid und Protein sowie die Wechselwirkung zwischen Fluorescein und Rezeptor nicht ausgeschlossen werden konnte (vgl. Abbildung 5.14a und 5.15). Dafür sprach, dass die Aktivierung durch fMLP in einigen Durchführungen ebenfalls durch das Peptid beeinflusst wurde, obgleich keine spezifische Wechselwirkung zwischen Ligand und Inhibitor stattfinden sollte. Nähere Untersuchungen durch CD-Spektren und Bindungsexperimente von Dorothea Helmer und Ina Rink zeigten jedoch, dass die Fluoreszenzmarkierung lediglich einen unbedeutenden Einfluss auf die Protein-Peptidbindung besitzt und stattdessen zur Stabilisierung der Struktur des Peptids beiträgt.^[110] Die inhibitorische Wirkung des CXCL8-RPLoops konnte weiterhin nach Etablierung des Assays mit unmarkiertem Inhibitor in transfizierten Zellen reproduziert werden. Eine quantitative Beschreibung der inhibitorischen Wirkung im Calcium-Assay ist durch Berechnung der absoluten Calciumkonzentration nach Grynkiewicz *et al.* möglich und setzt den gemessenen maximalen und minimalen Quotienten mit Standardkonzentrationen des Kations in Relation.^[160] Da zytosolisches Fura-2 jedoch eine höhere Fluoreszenzintensität als der in Salzpuffern gelöste Farbstoff aufweist, wurde diese Kalibrierung von Malgaroli *et al.* durch die Messung von Suspensionen intakter Zellen modifiziert.^[163] In der hier vorliegenden Arbeit bestand die Intension dieses Assays in der Detektion einer Ja/Nein-Antwort zur Prüfung der biologischen Aktivität der transfizierten Zellen und zur Bestätigung der inhibitorischen Aktivität von Molekülen mit bereits in Bindungsversuchen bestätigter Affinität zu CXCL8, sodass die zur Kalibrierung nötigen Schritte im Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert wurden.

Die Ergebnisse des Calcium-Assays mit CXCL8-RPLoops entsprachen jenen weiterer im Arbeitskreis durchgeführter Experimente wie beispielsweise einem Transwell- und einem Internalisierungs-Assay und bekräftigten damit die inhibitorische Wirkung des CXCL8-RPLoops.^[110]

Die in der konfokalen Mikroskopie erhaltenen Unterschiede bezüglich der Rezeptorexpression waren im Calcium-Assay allerdings nicht zu beobachten. Unter Berücksichtigung sowohl der immunologischen als auch auf der biologischen Aktivität basierenden Nachweise wurde HEK293/CXCR1-C11 als bester Einzelklon identifiziert. So konnten diese transfizierten HEK293/CXCR1-Zellen erfolgreich in dem gezeigten, von Ina Rink etablierten Transwell-Assay und in einem noch in der Optimierungsphase befindlichen Aktinpolymerisations-Assay mit vitalen Zellen eingesetzt werden, was zeigt, dass mit den transfizierten HEK293 nun im Arbeitskreis eine immortalisierte Zelllinie zur Verfügung steht, welche zur Identifizierung von Inhibitoren des Chemokins CXCL8 in den unterschiedlichsten Assays genutzt werden kann.

6.3 Proteinkonjugation

Zur Durchführung von Bindungsstudien auf Basis von Fluoreszenzintensitäts- und -anisotropiemessungen sowie einigen Aktivitätsassays, wie beispielsweise einem Internalisierungsassay, wird fluoreszent markiertes CXCL8 benötigt.^[110] Hierzu wurde eine im Arbeitskreis bereits vorliegende Mutante des Chemokins, CXCL8S72C, in einer Michael-Addition mit Maleimid-funktionalisierten Fluorophoren konjugiert.

6.3.1 Nachweis und Quantifizierung der Proteinkonjugate

Wie in den Chromatogrammen 5.19a, 5.20a und 5.22a zu sehen, stimmten die Retentionszeiten der konjugierten Proteine mit etwa 40 Minuten bei gleichen Gradienten weitestgehend überein. CXCL8S72C-Fluorescein und CXCL8S72C-CFTM633 wurden massenspektrometrisch nachgewiesen. Die hierbei ermittelte Masse von CXCL8S72C-DL550 zeigte jedoch eine Differenz von etwa 60 Da im Vergleich zum berechneten Molekulargewicht des Proteinkonjugats, jedoch konnte das Konjugat in Kombination mit einer Western-Blot-Analyse eindeutig nachgewiesen werden. Die beobachtete Differenz ist vermutlich auf die als Gegenionen der Sulfonatgruppen enthaltenen Natriumionen (M: 23 g/mol) des Fluorophors zurückzuführen.^[222]

Die Ausbeute lag sowohl bei CXCL8S72C-DL550 als auch CXCL8S72C-CFTM633 zwischen etwa 20 % und 30 % bezogen auf das eingesetzte Chemokin. Bei CXCL8S72C-Fluorescein wurde eine Ausbeute von 85 % berechnet. Dabei ist zu beachten, dass die eingesetzte Proteinmenge mittels BCA-Assay und nicht wie bei den späteren Kupplungsreaktionen über eine Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt wurde. Im Vergleich verschiedener, mit beiden Methoden bestimmter, Proteinmengen wurden im BCA-Assay bis zu fünffach niedrigere Konzentrationen als mit der von Ina Rink erstellten Kalibriergerade, welche auf abgewogenen Mengen des Chemokins basiert, ermittelt. Diese Abweichungen sind zum einen auf die Unterschiede zwischen dem im BCA-Assay als Standard dienenden BSA oder Lysozym zurückzuführen. Grundlage dieses Nachweises stellt die Biuret-Reaktion dar, bei welcher zweiwertige Kupferionen im Alkalischen durch Proteine, vor allem die Aminosäurereste Tryptophan, Cystein, Cystin und Tyrosin sowie die Peptidbindung, reduziert werden. Die entstehenden, einwertigen Kupferionen werden durch das Natriumsalz der Bicinchoninsäure komplexiert. Die resultierende Violettfärbung der Lösung ist demnach proportional zur Anzahl der reduzierten Kupferionen und somit zur Proteinmenge, wird allerdings in einem temperaturabhängigen Ausmaß sowohl durch die Aminosäurezusammensetzung als auch die Peptidbindungen selbst beeinflusst, weshalb die Kalibriergerade bei jedem Versuch mit einem geeignetem Protein neu erstellt werden muss. Die ermittelte Absorption kann demnach nicht als Summe der Beiträge der einzelnen Komponenten gesehen werden.^{[223][224]} Allgemein handelt es sich hierbei um eine indirekte Methode, bei der bereits geringe Änderungen der Versuchsparameter, insbesondere der Temperatur, die Reaktionsgeschwindigkeit und damit das Ergebnis beeinflussen, während die Messung der Absorption bei 280 nm von keiner Reaktion abhängig ist. Damit kann die Kalibriergerade für die Absorption bei 280 nm wiederverwendet werden, sofern die gleichen MTP und Volumina eingesetzt werden. Somit entfällt die Erstellung einer Kalibriergeraden bei jeder Konzentrationsbestimmung und das zu quantifizierende Protein wird zur Konzentrationsbestimmung nicht verbraucht. Letztlich stellt die Quantifizierung einer reinen Proteinlösung basierend auf der Absorption bei

280 nm sowohl eine genauere als auch schnellere Methode gegenüber dem BCA-Assay dar, ist jedoch zur Quantifizierung von Proteingemischen nur unter Verwendung eines gemittelten Extinktionskoeffizienten geeignet.

Bezüglich der Kupplung von CXCL8S72C mit Fluorescein-5-Maleimid wurde aufgrund der mit dem BCA-Assay zu niedrig ermittelten Konzentration eine höhere Proteinmenge als angenommen eingesetzt, wodurch die berechnete Ausbeute in Wirklichkeit geringer ausfällt und jenen der anderen Konjugate entsprechen dürfte. Allerdings darf hier nicht ausgeschlossen werden, dass die Ausbeute aufgrund der bei dieser Reaktion auch entsprechend geringerem molaren Überschuss an Farbstoff beeinträchtigt wurde. Da die Ausbeute aller drei Kupplungsreaktionen somit trotzdem in der gleichen Größenordnung lag, scheinen die unterschiedlichen Fluorophore selbst die Reaktion nicht zu beeinflussen. Aus den Chromatogrammen und Massenspektren 5.20a und 5.21b geht hervor, dass die vollständige Umsetzung aufgrund noch vorhandener Dimere der Proteinmutante CXCL8S72C nicht möglich war, da in diesen keine freie Thiolgruppe zur Konjugation mit dem Fluorophor zur Verfügung stand. Dies ist vermutlich ebenfalls darauf zurückzuführen, dass in Wirklichkeit mehr Protein als angenommen vorhanden war, wodurch die eingesetzte Menge an TCEP zur Reduktion der Disulfidbrücken nicht ausgereicht hat. Um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten, hätte die Reaktionszeit zur Reduzierung der Disulfidbrücke der Chemokindimere mit dem hierzu verwendeten TCEP-Harz oder die Menge an diesem erhöht werden müssen. Ein Grund für die relativ geringen Ausbeuten könnte zudem in Verlusten des Produkts durch die aufgrund der begrenzten Kapazität der verfügbaren Säule nötigen Durchführung mehrerer chromatographischer Läufe begründet sein, deren Elutionsfraktionen letztlich vereint wurden. Zur Reaktion von CXCL8S72C mit Fluorescein-5-Maleimid wurde bereits in DMSO gelöster und bei -20°C gelagerter Fluorophor eingesetzt, was allerdings nur in diesem einen Fall eine niedrige Ausbeute erklären könnte. Die Reaktionen wurden bei einem physiologischen pH-Wert von sieben durchgeführt, wobei die Aminofunktionen des Proteins protoniert vorliegen, was die selektive Reaktion von Sulfhydrylresten mit der Maleimidgruppe ermöglicht, sodass keine in relevanten Mengen detektierbaren Nebenprodukte sichtbar sein sollten. Zudem stellt die mindestens zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur eine gängige Reaktionsbedingung zur Proteinkonjugation mit einem Maleimid-funktionalisierten Fluorophor dar.^{[204][225]} Zusammenfassend konnte CXCL8S72C erfolgreich mit drei verschiedenen Fluorophoren konjugiert werden.

6.3.2 Konjugation mit einem Übergangsmetall-basierten Fluorophor

Der Nachweis der Konjugation von CXCL8S72C mit einem Übergangsmetall-basierten Fluorophor mit großer Stokes-Verschiebung, $(\text{Ru}(\text{II})(\text{bipy})_2(\text{bipy-NH}_2))$, welcher zuvor mit einem bifunktionalen Linker modifiziert wurde, ist dagegen weniger eindeutig. Sowohl bei den Chromatogrammen nach der Funktionalisierung des $\text{Ru}(\text{II})$ -Komplexes mit β -Maleimidopropionsäure-NHS-Ester als auch bei jenen der Proteinkonjugation mit dem vermuteten Produkt der ersten Stufe wird stets ein Doppelpeak mit etwa ein bis zwei Minuten Unterschied in der Retentionszeit beobachtet. Das Chromatogramm des Edukts $(\text{Ru}(\text{II})(\text{bipy})_2(\text{bipy-NH}_2))$, gelöst in Natriumchlorid-PBS mit gleichem Gradienten zeigte nur einen Peak im Nachlauf des Gradienten (vgl. Abbildung 5.25a), weshalb mögliche Verunreinigungen des Übergangsmetallkomplexes nicht ausgeschlossen werden können, da hier keine Trennung erfolgte. Die Reaktion des Linkers

mit diesen Verunreinigungen stellt eine Erklärung für die beobachteten Peaks dar. Aufgrund der in den Eluenten enthaltenen Trifluoressigsäure (TFA) kann es sich zudem bei den beiden Fraktionen um das funktionalisierte $\text{Ru(II)(bipy)}_2(\text{bipy-NH}_2)$ mit unterschiedlichen Gegenionen (PF_6^- , TFA) handeln. Die eingesetzte Konzentration von 0,1 % (v/v) TFA entspricht bei einem Molekulargewicht von 114,02 g/mol und einer Dichte von 1,49 g/mL einer Konzentration von 13 mM. Im Vergleich hierzu ist die Konzentration des eingesetzten Edukts mit 2 mM kleiner, wodurch ein Austausch der beiden PF_6^- durch Trifluoracetat möglich ist. Diese Interpretation würde die ähnlichen Retentionszeiten der beiden Peaks erklären, allerdings muss erwähnt werden, dass bei Analyse des Übergangsmetallkomplexes alleine kein solcher detektiert wurde, allerdings auch keine Trennung erfolgte, weshalb Isomere auch nicht in Form zweier Peaks zu sehen sein sollten. Eine mögliche Erklärung stellt zudem die Tatsache dar, dass der Übergangsmetallkomplex für diesen Lauf in Niedersalzs-PBS (35 mM NaCl, 40 mM Na_2HPO_4) gelöst wurde und nicht wie die Reaktionsansätze mit dem Starteluenten verdünnt wurde, welcher 40 mM Phosphat enthält und somit den größten Anteil an möglichen Gegenionen stellte. Das Anion der Trifluoressigsäure sowie die PF_6^- schienen somit als Gegenionen vernachlässigbar.

Die Verwendung des bifunktionalen Linkers (β -Maleimidopropionsäure-NHS-Ester) stellt eine bekannte Methode zur Proteinkonjugation dar. Der NHS-Ester dient der Reaktion mit Aminen, während das Maleimid selektiv mit Thiolgruppen reagiert, sodass Nebenprodukte unwahrscheinlich sind, was die Vermutung stützt, dass es sich bei beiden Fraktionen um unterschiedliche Isomere des jeweils gesuchten Produkts handelt (erste Stufe: mit β -Maleimidopropionsäure-NHS-Ester funktionalisiertes $\text{Ru(II)(bipy)}_2(\text{bipy-NH}_2)$, zweite Stufe: (kurz) CXCL8S72C- $\text{Ru(II)(bipy)}_2(\text{bipy-NH}_2)$).^[25] Der Übergangsmetallkomplex $\text{Ru(II)(bipy)}_2(\text{bipy-NH}_2)$ besitzt drei Liganden, wobei zwei hiervon identisch sind, während sich der dritte von diesen unterscheidet. Durch die unterschiedliche Positionen dieser Liganden innerhalb der oktaedrischen Struktur ergeben sich verschiedene Isomere. Abbildung 6.1 zeigt schematisch die beiden Isomere, auf welche vermutlich der Doppelpeak im Chromatogramm zurückzuführen ist. Bei erstem, links

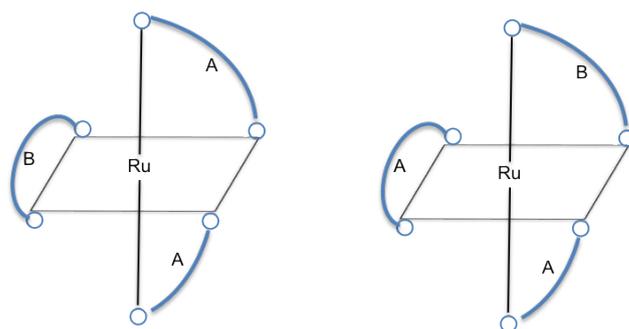


Abbildung 6.1: **Zwei mögliche Isomere des Übergangsmetallkomplexes $\text{Ru(II)(bipy)}_2(\text{bipy-NH}_2)$** Der Übergangsmetallkomplex $\text{Ru(II)(bipy)}_2(\text{bipy-NH}_2)$ bildet eine oktaedrische Struktur aus, wobei die drei Liganden unterschiedlich angeordnet sein können, woraus sich verschiedene Isomere ergeben. Zur besseren Übersicht sind die Liganden vereinfacht durch A (bipy) und B (bipy-NH₂), welcher zur Reaktion mit dem Linker und somit Proteinkonjugation dient, dargestellt.

im Bild, nehmen zwei der Liganden (A: bipy) jeweils eine äquatoriale und eine axiale Position ein, während der dritte, letztlich zur Proteinkonjugation benötigte (vereinfacht: B (bipy-NH₂)) zwei äquatoriale Positionen belegt. Im Fall des zweiten Isomers belegt ein Ligand A und Ligand B eine axiale und eine äquatoriale Position, während der zweite Ligand A zwei äquatoriale Positionen einnimmt. Denkbare Enantiomere wä-

im Chromatogramm vermutlich nicht unterscheidbar.

Durch Einsatz von zehn Äquivalenten des Linkers schien eine vollständige Umsetzung des Übergangsmetallkomplexes (erste Reaktionsstufe) trotz des zur Reaktion nicht optimal gewählten pH-Wertes (7,5 anstelle von 8 bis 9) stattgefunden zu haben, da der Übergangsmetallkomplex (Absorptionswellenlänge 456 nm im Detektor) als Edukt im Chromatogramm des Reaktionsansatzes nicht mehr detektiert werden konnte.^[225] Die berechneten Ausbeuten widersprachen dieser vollständigen Umsetzung, wobei diese Abweichungen wegen ihrer geringen Masse nahe der Nachweisgrenze (0,3 und 0,4 mg, Genauigkeit $\pm 0,1$ mg) der Feinwaage unter anderem auf Wägefehler zurückzuführen sind. Des Weiteren wird die Berechnung der Ausbeute durch die nicht eindeutige Zuordnung der erhaltenen Signale erschwert. Handelt es sich um oben genannten Anionenaustausch, so besitzen die Produkte beider Reaktionsstufen durch die gegenüber Hexafluorophosphationen (144,96 g/mol) leichteren Anionen der Trifluoressigsäure (114,02 g/mol) ein geringeres Molekulargewicht als das erwartete Produkt ohne einen Austausch der Anionen. Bei gleicher ausgewogener Masse wird somit unter Annahme der schwereren Gegenionen eine zu kleine Ausbeute berechnet.

Die Umsetzung mit beiden Fraktionen (Isomeren) der ersten Stufe resultierte wiederum in jeweils zwei Doppelpeaks, welche je nach Isomerisierungsgleichgewicht entweder ebenfalls auf unterschiedliche Isomere oder den beschriebenen Anionenaustausch zurückzuführen sind. Die Elution der modifizierten CXCL8-Varianten (CXCL8S72C-CFTM633, CXCL8S72C-Fluorescein und CXCL8S72C-DL550) erfolgte bei allen Konjugaten bei ähnlichen Hydrophobizitäten (43, 47 und 43 % Acetonitril). Die Retentionszeiten der Fraktionen des Reaktionsansatzes CXCL8S72C/Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)-Maleimid zeigten dagegen hierzu abweichende Hydrophobizitäten (Reaktionsansatz mit Fraktion A: 32 und 36 %, mit Fraktion B: 55 und 59 % Acetonitril), wobei eine leichte Abweichung durch den schneller ansteigenden Gradienten (0-70 % Acetonitril innerhalb von 55 Minuten anstatt von 20-50 % Acetonitril innerhalb von 35 Minuten) auftreten kann. Allgemein wiesen die unterschiedlichen Fraktionen auf einen größeren Einfluss des Markierungsreagenz auf die Polarität des Konjugats hin, als dies bei den anderen Farbstoffen der Fall war, was auf die unterschiedliche Struktur des Übergangsmetallkomplexes und dessen Eigenschaften im Vergleich zu den auf Xanthen, Rhodamin und Indocarbocyanin basierenden Farbstoffen zurückzuführen ist. Aus Chromatogrammen zur Entsalzung von CXCL8 (hier nicht gezeigt) ging hervor, dass das Chemokin selbst ebenfalls bei etwa 43 % Acetonitril eluiert. Die Michael-Addition stellt, wie bereits diskutiert, eine hoch selektive Reaktion von Sulfhydrylgruppen mit der Maleimidgruppe dar, weshalb Nebenreaktionen, welche beispielsweise zu einer Mehrfachmarkierung führen, ausgeschlossen wurden. Die Verwendung von Ruthenium basierenden Komplexen zur Proteinkonjugation wurde bereits des Öfteren mit verschiedenen Linkern beispielsweise zur Markierung von BSA publiziert, allerdings werden keine näheren Angaben zu einer genauen Analyse der Produkte gegeben.^{[226] [227] [228]} Auf immunologischer Ebene wurde eindeutig nachgewiesen, dass in allen Fraktionen CXCL8S72C vorhanden ist, dessen Markierung durch den Fluorophor bei der Extinktions- und Emissionswellenlänge des Ru(II)-Komplexes fluorimetrisch nachgewiesen werden konnte. Die sehr schwachen Signale der chemolumineszenten Detektion im Western Blot konnten jedoch nicht zwangsläufig auf die aufgetragene Proteinmenge zurückgeführt werden, da nach Abschätzung der Ausbeute in den Elutionsfraktionen und der CXCL8-Positivkontrolle im Western Blot in etwa dieselbe Menge an Protein aufgetragen wurde. Dies deutete entweder auf einen Einfluss der Markierung auf die Proteinstruktur

und somit Bindung des Antikörpers oder einer stark fehlerbehafteten Berechnung der Ausbeute hin. Obwohl CXCL8S72C-DL550 im Western Blot mit dem hier auch verwendeten Antikörper detektiert werden konnte, war ein Einfluss der Proteinmarkierung auf die Bindung des Antikörpers nicht ausgeschlossen, da sich die Proteinkonjugate des Übergangsmetallkomplexes von den restlichen zu unterscheiden schienen, was einen Einfluss des Übergangsmetallkomplexes auf die Proteinstruktur bestärkte. Für eine fehlerhafte Bestimmung der Ausbeute mittels Absorptionsmessung sprach dagegen die Tatsache, dass sich die insgesamt eingesetzte Proteinmenge auf mindestens zwei Fraktionen verteilte, wobei eine Bestimmung der Ausbeute lediglich in Bezug auf die intensivsten Signale möglich war und die Konzentration der Proben nahe der Nachweisgrenze lag.

Auch ohne nähere Bestimmung schien die erfolgreiche Konjugation des Proteins mit dem Übergangsmetallkomplex jedoch aufgrund der eindeutigen Peaks im Chromatogramm im Zusammenhang mit den Ergebnissen des Western Blots bestätigt. Da zur Durchführung erster Fluoreszenzanisotropieversuche bereits drei weitere Proteinkonjugate mit stärkerer Fluoreszenzintensität quantifiziert und vollständig analysiert zur Verfügung standen, wurde auf eine weitere Analyse der erhaltenen Fraktionen verzichtet. Zukünftig könnte die hier vorgestellte Konjugation des Chemokins mit einem stärker fluoreszierenden Übergangsmetallkomplex in einem wesentlich größeren Maßstab wiederholt werden, um ausreichende Analysen der Fraktionen durchführen zu können und das untersuchte Proteinkonjugat in Fluoreszenzanisotropieversuchen zu testen. Zusätzlich ist ein solches Konjugat aufgrund der großen Stokes-Verschiebung weiterhin für fluorimetrische Assays mit biologischen Proben interessant, sofern dabei höhere Proteinkonzentrationen eingesetzt werden können.

6.4 Fluoreszenzanisotropie

6.4.1 Vergleich der Tracer

Die bei den auf Fluoreszenz basierten Messungen mit Zellen hauptsächlich im grünen und blauen Kanal auftretende Autofluoreszenz kann durch Verwendung von Fluorophoren, welche im langwelligen Bereich absorbieren, gegenüber jenen mit den kürzeren Anregungswellenlängen minimiert werden.^{[198] [229] [230]} Des Weiteren tragen nach Buschmann *et al.* vor allem drei Effekte zur Hintergrundfluoreszenz bei: die elastische Streuung (Rayleigh-Streuung), die unelastische Streuung (Raman-Streuung) und die von Verunreinigungen wie kleinen Partikeln stammende Fluoreszenz.^[229] Die auf Streulicht basierenden Störungen nehmen mit steigender Wellenlänge ab. Die Empfindlichkeit kann somit entweder durch eine Erhöhung der Fluorophorkonzentration oder durch den Einsatz bei höheren Wellenlängen absorbierender Fluorophore erhöht werden.^{[203] [231] [229]} Da Streulicht meist polarisiert ist, kann es bei Messungen der Fluoreszenzanisotropie zu einer falschpositiven Erhöhung der gemessenen Fluoreszenzanisotropie führen. Hintergrundfluoreszenz führt dagegen vor allem bei der Durchführung eines Inhibitorscreenings im HTS-Format zu falschpositiven Ergebnissen. Da der Inhibitor zumeist in um ein Vielfaches höheren Konzentrationen als der im nanomolaren Bereich verwendete Tracer eingesetzt wird, kann die Autofluoreszenz der zu vergleichenden Komponenten einen wesentlichen Beitrag zur gemessenen Fluoreszenzanisotropie leisten. Das emittierte Licht dieser potentiellen Inhibitoren ist beim Screening kleiner Moleküle im Vergleich zur hohen Fluor-

reszenzanisotropie des gebundenen Tracers eher depolarisiert, wodurch eine falschpositive Inhibierung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung suggeriert wird.^[203] Dieser Beitrag zur Gesamtanisotropie sollte in einer separat gemessenen Probe, welche nur den Inhibitor enthält, ermittelt und entsprechend bei der Messung berücksichtigt werden.

CXCL8S72C-CFTM633

Der aufgrund der Vorteile langwelliger Fluorophore mit CFTM633-Maleimid hergestellte Tracer eignete sich allerdings nicht zur Aufnahme einer Bindungskurve. Trotz detektierbarer Fluoreszenz konnte kein Unterschied der parallelen und perpendicularen Intensitäten zwischen Leerwert (Durchführung mit verschiedenen Puffern) und Tracer gemessen werden. Im Vergleich der perpendicularen zu den parallelen Intensitäten sind letztere um etwa den Faktor zehn höher, was bei den anderen Fluorophoren nicht zu beobachten war (in etwa gleich bei CXCL8S72C-Fluorescein und maximal doppelt so hoch bei CXCL8S72C-DL550). Da die Anregung mit polarisiertem Licht in ebenfalls paralleler Richtung erfolgt, weist dieses Verhältnis auf eine hohe Fluoreszenzanisotropie hin. Aufgrund der mit anderen Fluorophoren messbaren Fluoreszenzanisotropie und Unterschiede bezüglich des freien und gebundenen markierten CXCL8S72C scheint eine zu geringe Fluoreszenzlebensdauer dieses Fluorophors eine mögliche Erklärung. Ist diese geringer als die Rotationskorrelationszeit des Proteinkonjugats, so kann die Beweglichkeit nicht detektiert werden. Dieser These widerspricht die Tatsache, dass eine Messung der Fluoreszenzanisotropie selbst bei der sehr geringen Fluoreszenzlebensdauer des DyLight[®]550-Maleimid mit etwa 1-1,5 ns noch möglich ist.^[230]^[203] Zudem wird zwar die exakte Struktur von CFTM633-Maleimid nicht angegeben, jedoch gehört der Fluorophor nach Angaben des Herstellers Biotium zur Familie der auf Rhodamin basierenden Fluorophore, wodurch die Fluoreszenzlebensdauer in der Größenordnung von Fluorescein liegen sollte, was ebenfalls dagegen spricht, dass diese nicht zur Messung der Fluoreszenzanisotropie ausreicht (<https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/FL-CF633.pdf>, zuletzt aufgerufen am 17.4.16, 13:21).^[232] Zudem können die höheren Intensitäten des Puffers im Vergleich zu den Fluorophor enthaltenden Proben hiermit nicht erklärt werden.

Die Absorption des langwelligeren Lichts ist abhängig vom Ausmaß des unkonjugierten Systems, sodass die in diesem Wellenlängenbereich absorbierenden Fluorophore mehr konjugierte Doppelbindungen und aromatische Ringe als grün fluoreszierende Fluorophore enthalten.^[203] Durch den damit stärker hydrophoben Charakter langwelliger Fluorophore werden sowohl intramolekulare Wechselwirkungen, welche sowohl in einer veränderten Fluoreszenz dieser Aggregate resultieren können, als auch jene zu Gefäßwänden begünstigt.^[203] Diese Wechselwirkungen können durch Zugabe eines Detergenz verhindert werden.^[203] Nach Zanetti-Domingues *et al.* besitzt CFTM633 im Vergleich zu 14 anderen Fluorophoren nur eine mittelmäßige Hydrophobizität und eine Nettoladung von -2, weshalb solche Wechselwirkungen nicht zwangsläufig zu erwarten waren. Eine fluoreszenzmindernde Wechselwirkung des in Puffer gelösten Fluorophors schien dennoch stattzufinden, da die Fluoreszenzintensität durch Zugabe des Detergenz Tween[®]20 erhöht wurde.^[232] Diese Zunahme der Fluoreszenzintensität, welche auf eine Wechselwirkung des Detergenz mit dem Fluorophor zurückzuführen ist, lieferte ebenfalls ungültige Messwert, was zeigt, dass die Fluoreszenzintensitäten

nicht die Ursache für die beobachteten, nicht mit der Fluorophorkonzentration steigenden parallelen und perpendicularen Intensitäten waren.

Die Ursache der nicht detektierbaren Fluoreszenzanisotropie lag nach den aufgenommen Spektren auch nicht an einer Verschiebung der vom Hersteller angegebenen Anregungs-/Emissionswellenlänge durch die Konjugation des Fluorophors mit CXCL8S72C (vgl. Abbildung 5.30). Bei Gittermonochromatoren kommt es zu einer Verschiebung der Wellenlängen der Emissionsspektren, die für jene der parallelen und perpendicularen Intensitäten unterschiedlich ist. Die hiermit einhergehende Formveränderung des Spektrums horizontaler Intensität führt zu einer minimalen Effizienz bei 630 nm, wobei diese Fluoreszenzanisotropieigenschaften des Gitters durch den sogenannten G-Faktor korrigiert werden sollten (vgl. Formel 1.13).^[118] Dieser wurde im Zeitraum dieser Arbeit mehrmals in unabhängigen Durchführungen nach Angaben des Herstellers mit Fluoresceinlösungen und entsprechend bekanntem Polarisationswert (20 mP) der frisch angesetzten, 1 nM Lösung in unabhängigen Durchführungen kalibriert. Eine mögliche Fehlerquelle könnte darin liegen, dass der mit Fluorescein ermittelte G-Faktor nicht auf Messungen bei höheren Wellenlängen übertragen werden kann. Dieser gerätespezifische Gewichtungsfaktor soll die unterschiedliche Empfindlichkeit des Detektorsystems für parallele und perpendicularen Intensitäten korrigieren. Die Tatsache, dass bei Messungen mit CXCL8S72C-CFTM633 kein Unterschied der parallelen und perpendicularen Intensitäten der Fluorophorlösung von jenen des Leerwerts detektiert werden konnte, passt zu oben genannter Überlegung, dass für höhere Anregungswellenlängen ein entsprechender Fluorophor zur Kalibrierung des G-Faktors verwendet werden muss. Dem widerspricht allerdings, dass die Fluoreszenzanisotropiemessung des CXCL8S72C-DL550 unter Verwendung des mit Fluorescein bestimmten G-Faktor möglich war. Allgemein ist der verwendete Reader für Fluoreszenzanisotropiemessungen bei diesen Wellenlängen auch geeignet, da die benötigte Anregungswellenlänge (630 nm) am Tecan Infinite[®]M1000 bereits als solche vorgesehen ist. Zusammenfassend ist ersichtlich, dass mit CFTM633 unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen auch bei unterschiedlichen Konzentrationen und ausreichenden Intensitäten kein emittiertes polarisiertes Licht gemessen werden konnte und somit zur Messung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung mittels Fluoreszenzanisotropie hier nicht geeignet ist.

Auch wenn dieser Fluorophor für Fluoreszenzanisotropiemessungen nicht verwendbar war, eignet sich CXCL8S72C-CFTM633 hervorragend zur Durchführung von Assays, welche auf Fluoreszenzintensitätsmessungen, vor allem mit vitalen Zellen, aufbauen, wobei die bereits erwähnten Vorteile nach Terasaki und Dailey durch eine Minderung der Zellschädigung bei dem langwelligeren Anregungslicht ergänzt werden können.^[233] Da die Spezifität der Bindung des markierten Proteins mit Zunahme der Hydrophilie steigt, zeichnet sich dieser Farbstoff zusätzlich durch die erwähnte, im Vergleich zu anderen langwelligeren Fluorophoren nur mittelmäßig ausgeprägte Hydrophobizität aus, welche einen größeren Einfluss auf unspezifische Adhäsion des Farbstoffs zur Probe hat als seine Nettoladung.^[232] Neben der durchflusszytometrischen Bestätigung der inhibitorischen Wirkung des Peptids CXCL8-RP-Loops konnte dieses Proteinkonjugat von Sabrina Wohlfahrt im Rahmen ihrer Bachelorarbeit für erste Vorversuche zur Aufnahme einer auf Messung der Fluoreszenzintensität basierenden Bindungskurve analog zu Radioligand-Bindungsassays genutzt werden.^[110]^[234] Hierzu wurde eine Suspension mit konstanter Zellzahl (540.000 Zellen/384-Kavität) mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-400 nM) CXCL8S72C-CFTM633 für 2,5 Stunden auf Eis inkubiert, ungebundenes Protein durch Waschen entfernt und die Fluoreszenzintensität gemessen (Daten im Ergeb-

nisteil nicht gezeigt). In folgenden Schritten könnte basierend auf diesen Vorversuchen eine Durchführung zur Bestimmung unspezifischer Wechselwirkungen etabliert werden, wobei der fluoreszent markierte Ligand mit unmarkiertem CXCL8 verdrängt werden sollte.

CXCL8S72C-Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)

Als Vorteil des als nächstes betrachteten Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂)-Komplexes ist die große Stokes-Verschiebung nennen, welche das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis angesichts der bei biologischen Proben auftretenden Autofluoreszenz verbessern könnte. Diese große Differenz zwischen Exzitations- und Emissionswellenlänge erhöht die Sensitivität der Fluoreszenzmessung zusätzlich durch die Eliminierung von Streulicht.^[204] Gegenüber diesen Vorteilen des Ru(II)-Komplexes ist jedoch die geringe Fluoreszenzintensität als Nachteil zu nennen, welche bei Erstellung einer Verdünnungsreihe deutlich wurde. Demnach müsste dieser Komplex in höheren Konzentrationen als die anderen Fluorophore eingesetzt werden. Als weiterer Nachteil der Proteinkonjugation mit Übergangsmetallkomplexen im Allgemeinen ist das Quenching durch Sauerstoff zu nennen, was ein Grund für die geringen Fluoreszenzintensitäten sein könnte und bei der Auswahl des Übergangsmetallkomplexes für eine potentielle Durchführung im Hochdurchsatzverfahren berücksichtigt werden muss.^[204]

Als Vorteil eines solchen Langzeitfluorophors ist laut Literatur die Möglichkeit der Fluoreszenzanisotropiemessung mit größeren Proteinen zu nennen. Fluorophore besitzen zumeist Fluoreszenzlebenszeiten von wenigen Nanosekunden (Fluorescein: etwa 4 ns).^[203] Ist die Rotationskorrelationszeit des markierten Proteins größer als die Fluoreszenzlebensdauer, weist das emittierte Licht des freien Tracers bereits eine erhöhte Anisotropie auf und ein Unterschied zwischen freiem und gebundenem Tracer ist nicht mehr detektierbar.^{[235] [197]} Die durchgeführten Fluoreszenzanisotropiemessungen mit CXCL8S72C-Fluorescein und -DL550 zeigten jedoch, dass die ausgewählten Fluorophore zur Detektion der Änderung der Beweglichkeit des 8,4 kDa großen Proteins noch einsetzbar sind. Die Fluoreszenzanisotropie des Proteinkonjugats war in Lösung detektierbar größer als jene der unkonjugierten Fluorophore. Die erfolgreiche Messung der Fluoreszenzanisotropie eines mit Fluorescein markierten Chemokins korrelierte zudem mit publizierten Fluoreszenzanisotropieversuchen des ebenfalls mit Fluorescein markierten CCL7 (8,7 kDa) und CCL14 (monomere Isoform: 8,3 kDa) und zeigte, dass die Konjugation des Chemokins mit einem Langzeitfluorophor für erste Darstellungen der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung nicht nötig war.^{[201] [236] [237]} Die Bindungsversuche zur Etablierung eines Fluoreszenzanisotropie-Assays wurden aufgrund keiner eindeutigen Vorteile des CXCL8S72C-Ru(II)(bipy)₂(bipy-NH₂) und der zu geringen Fluoreszenzintensität gegenüber den anderen Fluorophoren auf die Durchführung mit CXCL8S72C-DL550 und -Fluorescein beschränkt.

Wie in Abbildung 5.38 zu sehen, unterschieden sich die ausgewählten Fluorophore sowie deren Konjugate maßgeblich in der Fluoreszenzanisotropie des frei beweglichen Zustands. Die Unterschiede zwischen Fluorescein-5-Maleimid bzw. CXCL8S72C-Fluorescein (etwa 20-30 mAU bzw. 70-80 mAU) sowie DyLight®550 Maleimid und CXCL8S72C-DL550 (etwa 200 mAU und etwa 260 mAU) sind auf unterschiedliche Fluoreszenzlebenszeiten zurückzuführen. Diese ist laut Literatur mit etwa 4 ns bei Fluorescein größer als jene des im gelb-orangen Kanal fluoreszierenden Farbstoffes mit nur etwa 1-1,5 ns, was bei etwa gleicher Größe und Beweglichkeit in einer entsprechend höheren Fluoreszenzanisotropie resultiert.^{[230][203]}

Dieser Vergleich der in Abwesenheit eines Bindungspartner detektierbaren Fluoreszenzanisotropie, im Folgenden als A_0 bezeichnet, des Proteinkonjugats sowie des Fluorophors selbst lässt zudem Aussagen über die Eignung des Fluorophors bzw. des verwendeten Spacers zu. Ein sogenannter Propellereffekt, welcher die freie Beweglichkeit des Fluorophors innerhalb des Tracers beschreibt und beispielsweise bei einem zu langen Spacer zwischen Protein und Fluorophor auftritt, schien aufgrund der gemessenen A_0 für Fluorophor und Konjugat bei CXCL8S72C-Fluorescein unwahrscheinlich. Bei CXCL8S72C-DL550 konnte ein solcher dagegen aufgrund der bei gleichen Versuchsparametern stark variierenden Fluoreszenzanisotropie (200 bis etwa 260 mAU) in Abwesenheit eines Bindungspartner nicht ausgeschlossen werden. Diese entsprach in den niedrigsten erhaltenen Werten mit 200 mAU jener des freien Fluorophors. Diese Beobachtungen waren von jenem Anstieg der Fluoreszenzanisotropie zu unterscheiden, welcher bei sehr niedriger Tracerkonzentration sichtbar wurde und mit einer Wechselwirkung des Proteins mit den Gefäßwänden erklärt werden kann. Dieser Effekt fiel vor allem bei geringen Tracerkonzentrationen bis 50 nM ins Gewicht. CXCL8S72C-Fluorescein zeigte solche Änderungen der Fluoreszenzanisotropie des freien Fluorophors ebenfalls, allerdings in weitaus geringerem Ausmaß und temperaturabhängig.

Ogleich es sich bei der zur Konjugation verwendeten reaktiven Gruppe bei allen hier hergestellten Proteinkonjugaten um Maleimid handelt, ist nicht bekannt, wie dieses mit dem jeweiligen Farbstoff selbst verbunden ist. Die Literaturrecherche ergab lediglich die Strukturformel der entsprechenden NHS-Ester, in welcher dieser über fünf Methylengruppen mit dem Hauptteil des Farbstoffes verbunden ist.^[222] Unter Berücksichtigung der Molmassen der beiden reaktiven Gruppen (Maleimid: 97 g/mol, NHS: 115 g/mol) und kommerziell erwerbbarer funktionalisierten Farbstoffen wird ersichtlich, dass sich DyLight®550 Maleimid (1065 g/mol) und DyLight®550 -NHS (1040 g/mol) bezüglich des Spacers zwischen Farbstoff und Linker unterscheiden müssen. Da das hier verwendete DyLight®550 Maleimid nach Abzug des Molekulargewichts der reaktiven Gruppe eine höhere Molmasse besitzt, ist ein größerer Spacer zwischen Fluorophor und Linker wahrscheinlich und könnte die oftmals zu Beginn detektierbare geringe A_0 erklären. Die im Vergleich zum Farbstoff höhere Fluoreszenzanisotropie von CXCL8S72C-DL550 in TRIS-T bei 30 °C von 250 mAU widersprach auf den ersten Blick jedoch einer freien Beweglichkeit des Fluorophors innerhalb des Proteinkonjugats und wurde in etwa genauso häufig wie die genannte geringere A_0 beobachtet. Eine nicht-kovalente Bindung des Fluorophors an CXCL8S72C, abhängig von der Probenvorbereitung, die daher in unterschiedlichem Ausmaß zu beobachten war, könnte allerdings eine Erklärung für die geringere Beweglichkeit des Farbstoffes und höhere A_0 von etwa 250 mAU in einigen der Versuche darstellen. Die niedrigere Fluoreszenzanisotropie in 80%iger Glycerinlösung des Proteinkonjugats im Vergleich zu jener des Farbstoffs, kann

jedoch weder mit einer solchen Wechselwirkung noch mit einem zu langen Spacer geklärt werden, wurde jedoch im Fall der Fluorescein enthaltenden Moleküle nicht beobachtet (vgl. Abbildung 5.38). Somit stellte diese größere Beweglichkeit einen speziell bei CXCL8S72C-DL550 zu beobachtenden Effekt dar.

Die Anregung mit polarisiertem Licht erfolgt, wie bereits beschrieben, über eine Photos Selektion, sodass nur jene Moleküle mit der entsprechenden Orientierung angeregt werden und die Änderung dieser innerhalb der Fluoreszenzhalbwegszeit detektiert wird. Die hierzu nötige Rotation der Moleküle sollte in der hochviskosen und niedrigtemperierten Umgebung des Kontrollversuchs verringert sein, was am Beispiel der Fluoresceinkonjugate auch gezeigt werden konnte. Die Beweglichkeit des CXCL8S72C-DL550 im Vergleich zum DyLight[®]550-Maleimid sollte demnach, wie dies für Fluorescein-5-Maleimid und CXCL8S72C-Fluorescein zu beobachten ist, in gleichem Ausmaß eingeschränkt sein.

Eine zur weiteren Untersuchung durchgeführte temperaturabhängige Messung der A_0 zeigte sowohl für den Fluorophor als auch CXCL8S72C-DL550 keinen Einfluss auf die Fluoreszenzanisotropie, im Gegensatz zu den Fluoresceinkonjugaten, welche als Referenz genutzt wurden und eine hohe Temperaturabhängigkeit aufwiesen. Eine mögliche Begründung dieses Unterschieds könnte in der geringeren Fluoreszenzlebensdauer des orange-gelben Fluorophors liegen. Diese Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzanisotropie wurde zudem in späteren Messungen zu Bindungsstudien gesehen, wobei die Messung einer Verdünnungsreihe einer Membranpräparation mit CXCL8S72C-Fluorescein nach durchgeführter Inkubation zur Gleichgewichtseinstellung im Abstand von wenigen Minuten und somit geringfügig längerer Inkubationszeit bei 37°C nach dem Zentrifugieren der MTP bei RT bereits einen Einfluss auf die erhaltene Fluoreszenzanisotropie ausübte (vgl. Abbildung 5.47b).

Bezüglich des gelb-orangen Fluorophors widersprachen diese Ergebnisse jedoch der in Abbildung 5.38 dargestellten großen Differenz der Fluoreszenzanisotropiemessung des DyLight[®]550-Maleimid zwischen A_{\max} und A_{\min} , in welcher eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzanisotropie von 138 mAU zu beobachten war. Diese Erhöhung der Fluoreszenzanisotropie war demnach weniger auf die Erniedrigung der Temperatur, sondern vielmehr auf die erhöhte Viskosität zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung stellte die Aggregation des freien Fluorophors in Glycerol dar. Zudem ist der größere Einfluss der Viskosität im Vergleich zur Temperatur auf die Fluoreszenzanisotropie mit den diesen Zusammenhang beschreibenden Gleichungen (vgl. Formel 1.17 und 1.18) zu erklären. Die Rotationskorrelationszeit ist sowohl zur Temperatur als auch zur Viskosität proportional, welche in die Berechnung der gemessenen Fluoreszenzanisotropie einfließen. In dieser Formel wird die absolute Temperatur in Kelvin angegeben. Eine Änderung dieses Parameters wie in diesem Experiment um etwa 20°C stellen damit prozentual nur eine vergleichsweise geringe Temperaturänderung in Kelvin dar. Dagegen stieg die Viskosität beim Vergleich der 0%igen auf die 80%ige Glycerinlösung um mehr als den Faktor 200, wobei die Viskosität verschiedener Wasser-Glycerin-Gemische in Abhängigkeit von der Temperatur tabellarisch zugänglich ist (vgl.: http://www.unimeter.net/interim/Viskositaet/Kalibrierung_Viskositaet.html, zuletzt aufgerufen am 21.4.16,19:17). Die unterschiedliche Viskosität der Proben in diesem Versuch führte - vor allem im Fall des orange-gelben Farbstoffs mit der im Vergleich zu Fluorescein kürzeren Fluoreszenzlebensdauer - somit zu einer größeren Änderung der Rotationskorrelationszeit und demnach Fluoreszenzanisotropie als eine Veränderung der Temperatur, wobei die große Temperaturabhängigkeit im Fall der Fluorescein-haltigen Proben dieser Erklärung widersprach und nicht erklärt werden konnte, wieso beide Fluorophore eine stark unter-

schiedliche Temperaturabhängigkeit aufwiesen. Des Weiteren stimmt der in der Messung größere Einfluss der Viskosität auf die Fluoreszenzanisotropie mit der Struktur des Farbstoffes überein. DyLight[®]550 gehört zur Familie der Indocarbocyaninen, bei welchen eine photoinduzierbare Cis-Trans-Isomerisierung bekannt ist (vgl. Dietz und Rentsch), welche Widengren *et al.* anhand des Farbstoffs Cy5 durch Fluoreszenzkorrelationspektroskopie zeigte und hierzu verschiedene Versuchsparameter verglich.^[238]^[239] So wurde in dieser Publikation gezeigt, dass die Polarität des Lösungsmittels/Puffers einen geringeren Einfluss als die Viskosität ausübt und die Amplituden der Isomerisierungsrelaxation mit steigender Viskosität abnehmen. Dagegen nimmt die Isomerisierungsrelaxationsrate mit steigender Temperatur zu.^[238] Diese Cis-Trans-Isomerie hat sowohl auf spektrale Eigenschaften, die Quantenausbeute und somit Fluoreszenzfluktuationen als auch die Fluoreszenzlebenszeit Auswirkungen. Da mit einer Zunahme der Flexibilität des Polymethin-Rückgrads wiederum die Anzahl an Isomerisierungsmöglichkeiten steigt, übt die Viskosität auch an dieser Stelle indirekt einen Einfluss auf die Fluoreszenzanisotropie aus. Dieser These widersprach jedoch wiederum, dass neben dieser Viskositätsabhängigkeit auch eine vergleichbare Temperaturabhängigkeit auf die Isomerisierungsrate vorhanden ist und wiederum die Viskosität selbst eine von der Temperatur beeinflusste Größe darstellt.^[229]^[238] Inwiefern sich dieser genau äußert, ist jedoch für DL550 nicht publiziert, sondern wurde für Cy5 näher untersucht.^[238]

Eine weitere Überlegung für die bei CXCL8S72C-DL550 stark variierende A_0 basierte auf einem Einfluss des im Puffer bei Fluoreszenzanisotropieversuchen enthaltenen Detergenz Tween[®]20. Eine Umstrukturierung der von diesem gebildeten Micellen könnte eine bereits erläuterte mögliche Wechselwirkung des Fluorophors mit dem Protein ebenfalls beeinflussen. Das Protein wurde jedoch stets in Niedrigsalz-PBS gelagert und die Verdünnungen in TRIS-T unmittelbar vor jedem Versuch frisch angesetzt. Eine zur Prüfung über mehrere Tage durchgeführte Messung des Proteinkonjugats in verschiedenen Puffersystemen mit und ohne Detergenz zeigte keine Systematik bezüglich A_0 (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend scheint die Kombination beider Effekte, einer zu hohen Beweglichkeit des Fluorophors im Konjugat (geringe Fluoreszenzanisotropie) und Wechselwirkungen von diesem mit CXCL8S72C (hohe Fluoreszenzanisotropie) eine mögliche Erklärung für die unerwarteten Ergebnisse der verschiedenen Messungen von A_0 darzustellen. CXCL8S72C-DL550 war demnach für Fluoreszenzanisotropiemessungen unbrauchbar, was zusätzlich mit den durchgeführten Bindungsstudien bestätigt wurde.

6.4.2 Bindungsstudien mittels Fluoreszenzanisotropie

Die bereits erläuterte Schwankung der Fluoreszenzanisotropie des frei beweglichen CXCL8S72C-DL550 spiegelte sich auch bei den mit diesem Tracer durchgeführten Bindungsversuchen wider, wobei der Nachweis der Wechselwirkung des Proteins mit Bindungspartnern nur dann möglich war, wenn der Startwert gering war. Trotz dieser ebenfalls bei CXCL8S72C-Fluorescein beobachteten, jedoch nur geringfügig unterschiedlichen Fluoreszenzanisotropie des freien Tracers (vgl. Abbildung 5.42d, 5.47b, 5.46b und 5.45b) war ein Einfluss auf die Messung der Bindung bei diesem Tracer nicht zu sehen. Insbesondere aus Abbildung 5.42d wurde ersichtlich, dass trotz steigender A_0 und somit verringerter dynamischer Breite, eine Bindung ohne signifikante Unterschiede bezüglich der Affinitätskonstante detektierbar war. Zusätzlich wurde bei CXCL8S72C-Fluorescein eine Schwankung der A_0 oftmals bei der Messung an verschiedenen Geräten

(M1000 und F200) beobachtet, sodass dieser Effekt hierbei auf Unterschiede in den Geräten zurückzuführen sein könnte. Des Weiteren wird durch den oben bereits erläuterten Einfluss der Temperatur auf die Fluoreszenzanisotropie, welcher sich auf CXCL8S72C-Fluorescein im Gegensatz zu CXCL8S72C-DL550 nachweislich auswirkte (vgl. Abbildung 5.39b), deutlich, dass die Ursache der variierenden A_0 bei beiden Tracern auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein muss.

Bezüglich CXCL8S72C-DL550 entsprach die oben genannte Hypothese eines zu beweglichen Fluorophors, welcher mit dem Protein selbst wechselwirken kann und somit zwei Konformationen, ein am Protein verankertes und ein frei an diesem bewegliches Fluorophor, den in Bindungsversuchen erhaltenen Ergebnissen. So kann erklärt werden, dass eine Zunahme der Fluoreszenzanisotropie nur dann möglich war, wenn die zu Beginn detektierte Fluoreszenzanisotropie mit etwa 200 mAU jener des Farbstoffs ähnelte (vgl. z.B. Abbildung 5.42b). Basierend auf der erläuterten Vermutung würde die betrachtete Bindungskurve bei Zugabe einer Verdünnungsreihe an Membranpräparation auf eine Wechselwirkung des durch den langen Spacer sehr flexiblen DyLight[®]550-Maleimid an die Membranpräparation zurückzuführen sein. Da sich die Fluoreszenzanisotropie des DL550-Maleimid nicht von jener des CXCL8S72C-DL550 unterschied, würde sich diese aufgrund des zu beweglichen Fluorophors auch dann nicht ändern, wenn CXCL8S72C-DL550 an die Membranpräparation bindet - es sei denn der Fluorophor selbst ist in die Bindung involviert oder die Ligand-Rezeptorbindung begünstigt die Wechselwirkung des Fluorophors zum Protein und verringert auf diese Weise die Beweglichkeit des Fluorophors. Die Verwendung des unkonjugierten Farbstoffs als Tracer deutete ebenfalls auf die Richtigkeit dieser Hypothese hin (vgl. Abbildung 5.44b und 5.43). Nach dem technischen Ratgeber (*technical resource guide*) der Firma PanVera ist eine durch die Bindung ausgelöste Änderung der Quantenausbeute nur zu beobachten, wenn der Fluorophor selbst in die Wechselwirkung involviert ist.^[132] Diese Annahme wird durch die durch Messung der Fluoreszenzintensität erhaltene Bindungskurve bestätigt und bekräftigt die These, dass der Farbstoff selbst mit der Membranpräparation wechselwirkte (vgl. Abbildung 5.44a). Des Weiteren wird diese Erklärung durch die in Abbildung 5.44b nicht zu sehende Bindung des CXCL8S72C-DL550 (A_0 : etwa 250 mAU) gestärkt, da es sich hierbei um eine Membranpräparation der als Positivkontrolle eingesetzten HEK293/CXCR1-EGFP handelt. Bei zwei unabhängigen Experimenten und einer mit etwa 250 mAU höheren A_0 konnte keine Bindungskurve aufgezeichnet werden, wohingegen der unkonjugierte Farbstoff eindeutig mit der Membranpräparation wechselwirkte. Unter Umständen verringert die Konjugation die Bindung des Farbstoffs an die Membranpräparation. Eine Reaktion des Maleimid-funktionalisierten Farbstoffs mit freien Aminen und Thiolen transmembraner Proteine musste zwar in Betracht gezogen werden, wurde allerdings aufgrund der Spezifität der Reaktion bei diesem pH-Wert (pH 7,5) als unwahrscheinlich angesehen.

Lag der Fluorophor bereits zu Beginn in einer starren Wechselwirkung mit CXCL8S72C vor (A_0 : etwa 250 mAU), konnte keine Bindung des Fluorophors an die Membranpräparation mehr detektiert werden. Im Gegensatz zu den niedrigen Fluoreszenzanisotropiewerten reflektierte dieser Zustand jedoch aufgrund der nicht mehr vorhandenen freien Bewegung des Fluorophors die Rotation des Proteins. Die geringe dynamische Breite (Differenz A_{max} und A_{min}) schien demnach entsprechend der in Abbildung 5.38 gezeigten Daten der Fluoreszenzanisotropie in 80% Glycerin nicht zu genügen, um die Bindung von CXCL8S72C-DL550 an die Membranpräparation zu detektieren. Zudem war ein Einfluss der Bindung des Fluorophors an das Protein auf das Bindungsverhalten des Chemokins nicht auszuschließen.

Die Markierung erfolgte am für die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung nicht maßgeblich beteiligten C-Terminus, weshalb eine sterische Hinderung durch den konjugierten, am Protein frei beweglichen Fluorophor ausgeschlossen werden konnte und der Einfluss des mit der Proteinoberfläche wechselwirkenden Fluorophors auf die Ligand-Rezeptorwechselwirkung unwahrscheinlich erschien. Eine Beeinträchtigung der Rezeptorbindung durch die Proteinmodifizierung wurde zudem durch die Tatsache entkräftigt, dass laut Literatur das mittels Iodacetamid fluoreszent markierte CXCL8S72C keine Unterschiede bezüglich der Bindung an die Rezeptoren zeigt.^[122] Spezifische Wechselwirkungen mit Glykosaminoglykanen, welche mit den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht unterbunden wurden und damit zur Gesamtbindung beitrugen, sind dagegen auf den C-Terminus und die α -Helix zurückzuführen und hätten somit durch diese Modifizierung beeinträchtigt werden können.^{[84] [85]} Ein Bindungsversuch mit den hier genutzten Proteinkonjugaten sowie mit am N-Terminus-markiertem CXCL8 und einzelnen Glykosaminoglykanen könnte diesbezüglich Aufschluss geben.

Die Bindung des Chemokins an die Membran basiert neben unspezifischen Wechselwirkungen sowohl auf spezifischen Bindungen zu Glykosaminoglykanen als auch zu den Rezeptoren, wobei bei letzteren der N-Terminus und der N-Loop (Wechselwirkung zu den Rezeptoren) und bei den GAGs der hier modifizierte C-Terminus (Wechselwirkung zu GAGs) involviert sind. Beeinflusst eine Bindung des Fluorophors an die Proteinoberfläche die Bindung an Glykosaminoglykane, so kann nur noch die hoch affine Bindung an die Rezeptoren beobachtet werden, was genau jene Wechselwirkung darstellt, die untersucht werden soll. Insgesamt würden somit jedoch weniger Tracermoleküle gebunden und mehr frei beweglich vorliegen, sodass die Bindung bei den hier nötigen Konzentrationen an Tracer (mehr als das 100-fache der Affinitätskonstante) in einer zu geringen Änderung der Fluoreszenzanisotropie resultieren würde, um diese detektieren zu können und die eingesetzten Konzentrationen der Komponenten angepasst werden müssten.

Zusammenfassend ist folgendes Modell zur Bindung des Proteinkonjugats CXCL8S72C-DL550 an die Membranpräparation vorstellbar: Aufgrund des zu großen Spacers zwischen CXCL8S72C und DyLight[®] 550 ist der Fluorophor innerhalb dieses Proteinkonjugats noch immer frei beweglich und bindet selbst unspezifisch an die Membranpräparation. Nimmt dieser Fluorophor jedoch eine unbeweglichere Konformation durch die Wechselwirkung mit CXCL8S72C selbst ein, so wird die Bindung des Fluorophors an die Membranpräparation unterbunden.

Die mit HEK293/CXCR1-EGFP parallel durchgeführte FRET-Messung ließ ebenfalls keine Aussage bezüglich der Bindung von CXCL8S72C-DL550 zu und entspricht somit den Fluoreszenzanisotropiemessungen, in welchen ebenfalls keine Bindung dieses Tracers an die Membranpräparation detektiert werden konnte. Aufgrund des zur Fluoreszenzanisotropiemessung benötigten Versuchsaufbaus mit konstanter Ligandkonzentration und titrierter Rezeptorkonzentration war die Berechnung der Effizienz des Energietransfers allerdings nicht möglich. Die Messung der Emission des Tracers (Akzeptor) nach Anregung mit der Wellenlänge des Rezeptors (Donor) zeigte keinen eindeutigen Anstieg der Fluoreszenzintensität des Tracers mit zunehmender Rezeptorkonzentration und somit konnte keine spezifische Bindung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenzintensität der Verdünnungsreihe zeigte eine Zunahme mit steigender Konzentration an Membranpräparation. Subtrahiert man jedoch die in Abwesenheit des Tracers detektierte Fluoreszenzintensität von jener nach Zugabe des Tracers, so war keine Änderung der Intensität mit steigender Konzentration an Membranpräparation mehr zu beobachten. Zur Optimierung eines FRET-Assays

mit diesem Ligand-Rezeptorpaar und Bestätigung der Bindung zwischen Chemokin und Rezeptor sollte der Versuchsaufbau in zukünftigen Arbeiten an diese Methode angepasst werden (Titration des Tracers bei konstanter Rezeptorkonzentration) und beide Methoden (FRET im Vergleich zur Fluoreszenzanisotropiemessung) mit einer ausreichenden Menge an Membranpräparation simultan durchgeführt werden.

Zur näheren Analyse des Tracers CXCL8S72C-DL550 und oben erläuteter Hypothese wäre eine Bestimmung der maximalen Zahl von Bindungsstellen hilfreich. Hierzu sind unterschiedliche Ansätze denkbar. Neben einem klassischen Radioligand-Bindungsassay, kann die Rezeptoranzahl auch mit der hier vorgestellten Fluoreszenzanisotropie bestimmt werden, allerdings muss eine Methode zur Bestimmung oder Eliminierung der unspezifischen Wechselwirkungen und spezifischen Bindungen an GAG, beispielsweise mit einem Überschuss an einer nicht-dimerisierenden Mutante des CXCL8, etabliert werden. Eine solche Monomervariante (CXCL8L25NMe) wurde von Rajarathnam *et al.* bereits chemisch synthetisiert, wobei an der Dimerisierung beteiligte Wasserstoffbrückenbindungen durch Methylierung des Leu25 unterbunden werden. CXCL8L25NMe zeigte in verschiedenen Aktivitätsassays (Calcium-Assay, Chemotaxis neutrophiler Granulozyten) und einem Kompetitionsassay mit radioaktiv markiertem CXCL8 vergleichbare Ergebnisse wie das native CXCL8.^[240] Ebenso ist die von Joseph *et al.* publizierte Mutante V27P/E29P zu nennen. Bei dieser sind Prolinreste der β -Faltblätter ersetzt, die Wasserstoffbrücken bilden, welche an der Dimerisierung beteiligt sind.^[241]

Des Weiteren könnten CD-Spektren der CXCL8S72C-DL550-Lösungen angefertigt werden, welche unterschiedliche A_0 -Werte aufweisen, bzw. eine Vielzahl an unterschiedlichen Proben bezüglich evtl. struktureller Unterschiede gemessen werden. Die nicht erkennbare Systematik zwischen den verschiedenen A_0 , welche vermutlich auf geringe Unterschiede in der Lagerung und Probenvorbereitung zurückzuführen sind, macht die Auswahl der Proben für eine solche Messung sowie die Zuordnung der erhaltenen Ergebnisse zu den gemessenen Fluoreszenzanisotropiewerten schwierig. Da durch die Schwankung der A_0 , die geringe dynamische Breite und die Wechselwirkung des Fluorophors mit der Membranpräparation die Etablierung eines Fluoreszenzanisotropie-Assays mit CXCL8S72C-DL550 nicht möglich war, wurden die vorgeschlagenen weiteren Analysen nicht durchgeführt. Durch Bindungsversuche mit CXCL8S72C-Fluorescein und dem unkonjugierten Fluorophor (vgl. Abbildung 5.45), in welchen keine entsprechende Wechselwirkung des Fluorescein-5-Maleimid mit der Membranpräparation zu sehen war, wird ersichtlich, dass das Chemokin an diese bindet. Die oftmals hohe Fluoreszenzanisotropie in den mit CXCL8S72C-DL550 durchgeführten Bindungsstudien war somit auf den mit dem Protein wechselwirkenden Fluorophor und nicht auf eine bereits gesättigte Bindung des Proteinkonjugats an die Membran zurückzuführen.

Unter Berücksichtigung des bisher dargestellten Vergleichs der verschiedenen Tracer sind nur die mit CXCL8S72C-Fluorescein erstellten Bindungskurven sicher auf eine Wechselwirkung des Chemokins mit der Membranpräparation und ihren Bestandteilen zurückzuführen.

Versuchsparameter bei Fluoreszenzanisotropiemessungen zur Untersuchung der Ligand-Rezeptorwechselwirkung

Die Dauer der Gleichgewichtseinstellung einer Bindung wird durch die Geschwindigkeitskonstanten von Dissoziation und Assoziation beeinflusst. Bei einer hohen Affinität erfolgt die Assoziation sehr schnell, wohingegen die Dissoziation langsamer verläuft. Das Gleichgewicht ist jedoch erst dann eingestellt, wenn die

Inkubationszeit mehrere Halbwertszeiten der Assoziation und Dissoziation übersteigt.

In der Literatur werden bei Radioligand-Bindungsassays Inkubationszeiten auf Eis von zwei bis vier Stunden sowie eine Stunde bei Raumtemperatur bei fluoreszenzbasierten Messungen angegeben.^{[42] [92] [146]} Anhand dieser Angaben wurden die Proben eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Bezüglich der Gleichgewichtseinstellung bei Aufnahme einer Bindungskurve nach unterschiedlichen Inkubationszeiten konnten zumeist, mit Ausnahme der in Abbildung 5.46b gezeigten Ergebnisse, anhand der frühesten Messungen die Bindungskurven am besten gefittet werden (vgl. 5.45, 5.47b) Insbesondere bei Betrachtung der in Abbildung 5.47b gezeigten Graphen der Wechselwirkung zwischen HEK2937/CXCR2-IIH8 und CXCL8S72C-Fluorescein wird allerdings deutlich, dass keine einheitliche Schlussfolgerung gezogen werden konnte, da bei Messung derselben Proben zeitlich unmittelbar aufeinander an zwei verschiedenen Geräten die Bindungskurven oft gegeneinander verschoben waren.

Die Multititerplatten wurden während der Inkubation bei 37°C mit Folie abgedichtet und sowohl vor dem Entfernen dieser als auch danach zentrifugiert, um sowohl Flüssigkeitstropfen an der Klebefolie als auch aus der Mitte verschobene Menisken auszuschließen. Trotz dieser Maßnahmen können bei dieser Durchführung Volumenverluste nicht ausgeschlossen werden, da Flüssigkeitsreste trotz Zentrifugation deutlich sichtbar an der Klebefolie zurückblieben. Da diese Fehlerquelle alle Kavitäten gleichermaßen betraf, sollte sie lediglich zu einer Verschiebung der Bindungskurve zu niedrigeren Konzentrationen führen, da nun in allen Wells eine höhere Konzentration als die ursprünglich eingegebene vorlag. Aus diesem Grund sollten die Versuche mit einer Inkubation in verschließbaren Reaktionsgefäßen und Überführung in die MTP nach erfolgter Inkubation wiederholt und so die Ergebnisse überprüft werden. Ein solcher Versuchsaufbau mit einem größeren Ansatz, aus welchem zu verschiedenen Zeitpunkten des zur Messung benötigte Volumen jeweils in die MTP pipettiert wird, ermöglicht zudem die zeitabhängige Messung der Fluoreszenzanisotropie und zusätzlich die Überprüfung der Gleichgewichtseinstellung, da eine mögliche Volumenänderung der Proben über die Zeitdauer der Inkubation ausgeschlossen werden könnte.^{[125] [202]} Unter Berücksichtigung der benötigten Zeit zur Zusammenstellung der Proben auf Eis, welche bis zu einer Stunde betrug, ist es möglich, dass eine Einstellung des Bindungsgleichgewichts zumindest bei den zuerst pipettierten Proben bereits bis zum Zeitpunkt dieser ersten Messung erfolgt war.

Während die Durchführung zweier unabhängiger Experimente (Wechselwirkung des CXCL8S72C-Fluorescein mit unmarkierten CXCL8) am F200 zu vergleichbaren Affinitäten führte, wird deutlich, dass die aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelten Affinitäten bei Messung an zwei verschiedenen Geräten wie zu erwarten nicht vergleichbar war (M1000 Experiment A: $1,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$ gegen F200 Experiment B: $0,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (im Vergleich Experiment A: $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$)). Diese Messung verschiedener Bindungskurven an beiden Multititerplattenlesegeräten verdeutlicht, dass eine gerätespezifische Abweichung der Ergebnisse stets in Betracht gezogen werden muss. Zur näheren Bestimmung dieser Unterschiede sollte das Experiment mit einer sehr großen Wiederholungszahl und einem stabilen, gut zugänglichen, preisgünstigen und bereits in der Literatur mit diesem Assay etablierten Ligand-Rezeptorpaar (beispielsweise mit einem anderen membrangebundenem Rezeptor) zur Erstellung einer Statistik durchgeführt werden. Unter Berücksichtigung der bereits diskutierten Temperaturabhängigkeit (vgl. 5.39a) des Fluoresceinkonjugats könnte der beobachtete Unterschied auch mit einem solchen Effekt begründet werden, weshalb die mit den Proben befüllte MTP bei jeder Messung eine genau eingehaltene Zeitspanne bei 37°C im Reader erwärmt werden sollte, um

sicherzustellen, dass stets bei der gleichen Temperatur gemessen wird.

Zusätzlich muss beim Vergleich der Wendepunkte des sigmoidalen Kurvenverlaufs bedacht werden, dass sich die berechnete Größe auf die Konzentration der Membranpräparation bezieht, welche wiederum ebenfalls einen Fehler, zumeist von etwa 10 % aufwies. (Die zugehörigen Fehlerbalken wurden in den Diagrammen nicht aufgetragen, da sie bei logarithmischer Darstellung nicht mehr sichtbar sind.) Ein Einfluss der Membranpräparation auf die gemessenen perpendicularen und parallelen Intensitäten kann dagegen aufgrund der durchgeführten Korrektur nach Harris *et al.* ausgeschlossen werden, welche trotz der Tatsache, dass die Hintergrundfluoreszenz nach Abbildung 5.33a vernachlässigbar gering war, durchgeführt wurde, da verschiedene Chargen an Membranpräparation verwendet wurden und die maximalen Konzentration durchaus einen Beitrag zu den Intensitäten lieferten.^[174]

Die Auswahl des Puffers stellt bei Fluoreszenzanisotropiemessungen einen weiteren wichtigen Versuchsparmeter dar. Bei der hier verwendeten Zusammensetzung (50 mM TRIS, pH 7,5) handelt es sich um ein bei dieser Methode mit Membranpräparationen gängiges Puffersystem, wobei der einzige Unterschied im hier nicht zusätzlich zugegebenen MgCl_2 liegt.^{[124][174][125]} Eine Durchführung zu Beginn der Optimierungen zeigte keine Unterschiede bezüglich dem Zusatz dieses Salzes, weshalb vermutet wurde, dass in der Literaturangabe das Salz aufgrund der zuvor durchgeführten Präparation der Plasmamembran im Puffer noch enthalten war. In Zukunft könnte ein Vergleich des Puffers in An- und Abwesenheit des Salzes durchgeführt werden, um den Einfluss von MgCl_2 auf die Fluoreszenzanisotropie zu untersuchen. Tween[®]20 wurde entsprechend der Durchführung nach Lee und Bevis in einer Konzentration von 0,0005 % (v/v) zugesetzt.^[124] Ein weiterer Punkt, der bei der Durchführung von Bindungsstudien bedacht werden muss, ist die sogenannte Rezeptor- oder Ligandverarmung (*Depletion*). Während die konstant gehaltene Komponente mit zunehmender Konzentration des Bindungspartners gesättigt wird, muss sichergestellt werden, dass sich die freie Konzentration der variablen Komponente, hier der Rezeptor $[R]$, auch nach Gleichgewichtseinstellung, d.h. Bindung des Tracers, nicht von jener des Ausgangszustands $[R]_0$ unterscheidet (vgl. Gleichung 1.8). Die Bestimmung der Bindungsparameter erfolgt durch Auftragen des Messsignals (Fluoreszenzanisotropie) gegen die Ausgangskonzentrationen des Rezeptors $[R]_0$, wobei die Messung nach Einstellung des Gleichgewichts erfolgt. Die zur (nicht-linearen) Regression getroffenen Vereinfachung setzen somit voraus, dass sich die Konzentration des Rezeptors trotz sättigender Bindung des Tracers nicht nennenswert ändert. Liegt dagegen eine Rezeptordepletion vor, so muss dies bei der Erstellung einer Bindungskurve durch entsprechende Berechnungen berücksichtigt werden, weil die unter 1.2.1 beschriebene Vereinfachung nicht durchgeführt werden kann und sich eine quadratische Gleichung ergibt (vgl. *Technical Resource Guide*, Invitrogen Corporation).^[132] Bei zukünftigen Versuchen des Assays sollte dieser Punkt berücksichtigt werden.

Mit dem Proteinkonjugat CXCL8S72C-Fluorescein war die Detektion der Bindung des Chemokins an die Membranpräparation möglich. Die hierzu aufgrund geringer Fluoreszenzintensitäten eingesetzten Tracerkonzentrationen lagen mit 50-100 nM allerdings weit über der zur Aufnahme von Bindungsstudien empfohlenen Konzentration, welche im Bereich der Dissoziationskonstanten (2 nM) liegen und den doppelten Wert dieser nicht übersteigen sollten.^{[132][242][243]} Andernfalls findet eine stöchiometrische Titration des Liganden statt, bei welcher eine korrekte Berechnung des K_D nicht mehr möglich ist.^[242] Im Vergleich hierzu sind bei Radioligand-Bindungsassays Ligandkonzentrationen von beispielsweise 0,1 nM möglich.^[56] Selbst bei bekannter Rezeptorzahl und/oder Bestimmung nicht Rezeptor vermittelter Bindungen wäre eine

Berechnung der Dissoziationskonstanten mit diesem Tracer unter den gegebenen Versuchsparametern nicht möglich.

Unspezifische Wechselwirkungen bei Bindungsstudien durch Messung der Fluoreszenzanisotropie

Der Vergleich der mit Membranpräparationen der CXCR1-stark exprimierenden HEK293/CXCR1-C11 mit jenen der nach konfokaler Mikroskopie CXCR1 nur geringfügig bis gar nicht aufweisenden HEK293/CXCR1-A7 macht deutlich, dass ein Großteil der durch Zunahme der Fluoreszenzanisotropie detektierten Gesamtbindung auf unspezifische Wechselwirkungen und die Bindung an GAGs zurückzuführen sein muss. Zur besseren Beurteilung der unterschiedlich starken Rezeptorexpression auf der Oberfläche könnte eine durchflusszytometrische Analyse dieser mit den in der konfokalen Mikroskopie erfolgreich verwendeten geringeren Antikörperkonzentrationen oder fluoreszent-markiertem CXCL8 durchgeführt werden. Die hierbei erhaltene Quantifizierung der Rezeptoren könnte helfen, zu beurteilen, ob die erhaltenen Bindungskurven auf unspezifische oder spezifische Bindungen zurückzuführen sind.

Die simultane Inkubation des Tracers mit einem Überschuss an unmarkiertem Liganden (kalter Ligand) zur Unterscheidung der spezifischen von unspezifischen Wechselwirkungen stellt bei Fluoreszenzanisotropiemessungen und Bindungsstudien mit CXCL8 eine gängige Methode zur Erstellung von Bindungskurven dar, obwohl sie nur als Näherung eingesetzt werden kann.^{[42] [168] [206]} Hierbei wird die spezifische Bindung stets als sättigbar, die unspezifische als nicht sättigbar angenommen, woraus sich für erstere eine Sättigungskurve, für letztere ein linearer Verlauf ergibt.^[115] Die gemessene Gesamtbindung stellt demnach eine Summe aus sättigbarer, spezifischer und nicht sättigbarer, unspezifischer Bindung dar. Damit unspezifische Bindungen nicht sättigbar erscheinen, wird jedoch vorausgesetzt, dass die Konzentration des freien Liganden viel kleiner als die Dissoziationskonstante der unspezifischen Bindung ist. Nach Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem Ligand gegenüber markiertem Ligand ist diese Näherung nicht mehr gegeben, da sich die Konzentration an freiem Liganden erhöht, wodurch unspezifische Bindungen ebenfalls einen sättigbaren Beitrag zur Gesamtbindung leisten. Die spezifischen Bindungsstellen werden somit überbewertet und die ermittelte Affinität unterschätzt.^[244] Zur Abschätzung der unspezifischen Bindungsstellen wurde diese Methode jedoch trotzdem in Betracht gezogen.

Da es sich bei Fluoreszenzanisotropiemessungen um einen homogenen Assay handelt, beinhaltet der ermittelte Wert auch die Fluoreszenzanisotropie der unter Umständen mit unmarkiertem CXCL8 wechselwirkenden Tracer, da mit dem unmarkierten Liganden in der Lösung spezifische Bindungsstellen angeboten werden, die mit den unspezifischen Bindungsstellen konkurrieren. Die Dimerisierung des Chemokins müsste demnach ebenfalls bei der Korrektur mit einberechnet werden. In der Literatur sind verschiedene Dimerisierungskonstanten von 120 nM bis 21 μ M angegeben.^{[36] [37] [38] [245]} Diese große Diskrepanz ist auf die Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von den experimentellen Bedingungen zurückzuführen. Bei Salzkonzentrationen, Temperaturen und pH-Werten unterhalb der physiologischen Bedingungen verschiebt sich der K_D -Wert zu geringeren Konzentrationen.^[246] Aufgrund der Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen wurde der K_D -Wert für den hier genutzten Puffer, TRIS-T, experimentell bestimmt. Mit einer Dimerisierungskonstanten von etwa 1 μ M (vgl. Abbildungen 5.42) wurde die Verwendung von CXCL8 als kalter Ligand ausgeschlossen, da eine massive Bindung des Tracers an unmarkiertes CXCL8 zu erwarten war. Ebenso konnte hiermit eine Dimerisierung des fluoreszent markierten CXCL8S72C bei den eingesetz-

ten Tracerkonzentrationen (50 bis 400 nM) ausgeschlossen werden. In zukünftigen Experimenten könnte eine der nicht dimerisierenden Mutanten des Chemokins, die von Rajarathnam *et al.* (CXCL8L25NMe) oder die von Joseph *et al.* publizierte Mutante V27P/E29P, beide bereits unter 6.4.2 beschrieben, zur näherungsweise Bestimmung unspezifischer Wechselwirkungen eingesetzt werden. Zur Etablierung des Fluoreszenzanisotropie-Assays mit CXCR2-exprimierenden Zellen ist aufgrund der mehreren zur Verfügung stehenden Liganden zusätzlich die Zugabe eines solchen wie beispielsweise CXCL1 möglich, sofern eine Heterodimerisierung mit CXCL8 ausgeschlossen werden kann.^[3]^[1]

Ein weiterer Ansatzpunkt besteht in der Vorinkubation der Membranpräparation mit Glukosidasen wie beispielsweise Heparinase und Chondroitinase. Ein solcher enzymatischer Abbau der GAGs würde die Wechselwirkung des CXCL8 zu diesen unterbinden.^[44]^[247]^[248] Bei diesen Überlegungen muss allerdings stets der Einfluss der GAG-Bindung auf die Rezeptorbindung mit berücksichtigt werden, da die Bindung zu GAGs zu einer Oligomerisierung und somit lokalen Anreicherung des Chemokins führt.^[44] Die Bindung des Chemokins an die Rezeptoren wird somit durch GAGs reguliert. Obgleich die aus der Wechselwirkung mit GAGs entstehenden Oligomere eine geringere Affinität zu den Rezeptoren haben, würde eine Verhinderung der Wechselwirkung mit diesen GAGs laut Hoogewerf *et al.* zusammen mit einer geringeren lokalen Chemokinkonzentration in einer geringeren Affinität zu den Rezeptoren resultieren und eine verfälschte Bestimmung der Bindungsaffinität mit sich ziehen. In der erwähnten Literatur wurden entsprechend höhere Dissoziationskonstanten von Chemokinen mit ihren Rezeptoren ermittelt, wenn die verwendeten Zellen zuvor mit Glukosidasen behandelt worden waren.^[44] Zusätzlich muss die Komplexität dieser Stoffgruppe beachtet werden, was evtl. die Verwendung einer Vielzahl unterschiedlicher Glukosidasen erfordert. Neben der Bindung zu GAGs ist zusätzlich eine Wechselwirkung zu Sulfatiden, sulfatierten Glycosphingolipiden bekannt.^[249] Sollen die Bindungen des Chemokins zu solchen auf der Plasmamembran lokalisierten Verbindungen unterbunden werden, muss sichergestellt sein, dass alle Wechselwirkungen dieser Art erfasst werden. Bezüglich eines geplanten Inhibitorscreenings ist diese Vorgehensweise demnach aufgrund des großen Einflusses auf die Ligand-Rezeptorbindung und Entfernung der Versuchsbedingungen vom physiologischen System zu bedenken. Dient die Messung der Fluoreszenzanisotropie jedoch der Analyse einer Ligand-Rezeptorbindung, so sollte diese enzymatische Behandlung der Membranpräparation durchaus durchgeführt und mit Ergebnissen der unbehandelten Membranen verglichen werden. Zugleich könnte eine solcher Vergleich Aufschluss über den Anteil der Bindungen zu GAGs zur Gesamtbindung geben.

Membranpräparation versus Ganzzellassay

Die Verwendung von Membranpräparationen weist im Vergleich zu Bindungsstudien mit lebenden Zellen einen Nachteil in Bezug auf den Materialverbrauch und die notwendigen Arbeitsschritte auf. Im Gegenzug kann durch die Verwendung einer einzelnen Membranpräparation für mehrere Bindungsstudien die Reproduzierbarkeit erhöht werden, da beispielsweise der Einfluss einer zellzyklusabhängigen Expression umgangen werden kann. Insbesondere bei Übertragung des Bindungsassays auf andere Ligand-Rezeptorpaare oder auf Zellsysteme, die die Chemokinrezeptoren endogen exprimieren, ist dieser Aspekt von Bedeutung. Neben den die Chemokinrezeptoren exprimierenden gängigen Immunzellen, ist die zellzyklusabhängige Expression des CXCR3 in Endothelzellen publiziert, was verdeutlicht, dass eine solche Regulierung bei

endogen exprimierten Chemokinrezeptoren in Betracht gezogen werden muss.^[250] Zudem kann die konstitutive Expression von CXCR4 in Endothelzellen und - allerdings mit sich widersprechenden Angaben in der Literatur - in HEK293-Zellen nachgewiesen werden (6.1.2), sodass solche Zellen für die Identifizierung von Inhibitoren der Wechselwirkung des Rezeptors zu dem ebenfalls in unserem Arbeitskreis exprimierten CXCL12 (SDF-1 α) eingesetzt werden könnten.^{[251] [207] [186] [208]}

Ein weiterer Vorteil von Membranpräparationen ist, dass die entstehenden Rezeptor-Ligandbindungen bestehen bleiben, da regulierende Mechanismen wie die Rezeptorinternalisierung mit einer möglichen erneuten Präsentation des Rezeptors auf der Zelloberfläche und Degradation des Liganden nicht mehr berücksichtigt werden müssen. Sowohl CXCR1 als auch CXCR2 internalisieren nach Bindung von CXCL8, wobei ein Großteil der Rezeptoren schon in den ersten Minuten internalisiert wird und oftmals ab 30 Minuten bei 37°C ein Plateau erreicht ist.^{[91] [90] [92]} Auf die Endozytose des Rezeptor-Ligandpaares folgend, stehen die Rezeptoren in Abwesenheit des Liganden bereits nach einer Zeitspanne von 30 bis 120 Minuten durch Transport der endozytierten Rezeptoren an die Plasmamembran für eine erneute Bindung wieder zur Verfügung. Diese hier genannten dynamischen Prozesse beeinträchtigen die Einstellung und Messung eines Bindungsgleichgewichts.^[91]

Zur Vermeidung der Rezeptorinternalisierung muss die Inkubation bei niedrigen Temperaturen und somit aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung mit einer längeren Inkubationszeit durchgeführt werden. Die Internalisierung selbst würde vorerst keinen Einfluss auf die Fluoreszenzanisotropie des Ligand-Rezeptorkomplexes nehmen, allerdings muss geprüft werden, ob bei einem der verschiedenen Varianten dieses Vorgangs das Signal-zu-Rauschen Verhältnis beeinträchtigt wird. Im Weiteren wird der internalisierte Rezeptor entweder über das späte Endosomenkompartiment abgebaut oder wieder an die Plasmamembran gebracht (rezyklierter Rezeptor).^[252] Die Fluoreszenzanisotropie würde durch die hiermit einhergehende Dissoziation des Ligand-Rezeptorkomplexes an dieser Stelle jedoch maßgeblich beeinflusst werden, da die Beweglichkeit des mit dem Rezeptor internalisierten Liganden wieder zunehmen würde. Die gemessene Fluoreszenzanisotropie würde somit eine Summe aus extra- und intrazellulärem, gebundenen und ungebundenen Liganden darstellen, wobei der ungebundene, intrazelluläre Tracer durch Degradation langsam aus dem Bindungsgleichgewicht entfernt werden würde. Des Weiteren muss bei der Übertragung eines auf ganzen Zellen aufbauenden Fluoreszenzanisotropie-Assays beachtet werden, dass die Rezeptorinternalisierung vom Zelltyp abhängt und beispielsweise bei CXCR2 exprimierenden HEK293 langsamer als bei Leukozyten verläuft.^{[252] [93]}

Des Weiteren gestaltet sich die Wahl der Pufferbedingungen im Ganzzellassay schwierig, da Fluoreszenzanisotropiemessungen meist in Niedrigsalz-Puffern (beispielsweise 35mM NaCl, 40mM Na₂HPO₄) durchgeführt werden, wohingegen geeignete Zellpuffer wie beispielsweise der in Aktivitätsassays oftmals verwendete HBSS oder PBS unter anderem zur Vermeidung osmotischer Effekte höhere Salzkonzentrationen aufweisen. Die Zugabe von Tween[®]20 (z.B. 0,2%) stellt dagegen kein Problem bei der Durchführung des Assays mit lebenden Zellen dar.

Aufgrund dieser Aspekte besitzen Bindungsstudien mit Membranpräparationen einige Vorteile, da oben genannte Effekte bei einem Fluoreszenzanisotropie-Assay mit lebenden Zellen beachtet und die Versuchsbedingungen entsprechend angepasst werden müssen.

Nach vollständiger Etablierung des Fluoreszenzanisotropie-Assays mit optimierter Reproduzierbarkeit und

Identifizierung der nicht rezeptorabhängigen Bindung scheint eine Übertragung des zurzeit auf Membranpräparationen aufbauenden Assays aufgrund der größeren Nähe zum physiologischen System durchaus sinnvoll und realisierbar.

Stand der Assay-Etablierung und Vergleich verschiedener Assaymethoden

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Bindung von CXCL8S72C-Fluorescein an die Membranpräparation CXCR1 oder 2 exprimierender Zellen mittels Messung der Fluoreszenzanisotropie nachweisbar ist. Die erhaltenen Bindungskurven ermöglichen allerdings zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussage bezüglich der Bindungskonstanten. Zum einen eignete sich CXCL8S72C-Fluorescein zwar im Vergleich zu den anderen untersuchten Proteinkonjugaten am besten zur Erstellung einer Bindungskurve, die notwendigen Konzentrationen, um ausreichende Intensitäten und ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu erhalten, waren jedoch um fast zwei Größenordnungen zu groß, sodass weitere Fluorophore untersucht werden sollten. Andererseits müssen zur Berechnung der unspezifischen Bindungen an die Membran und spezifischen Bindungen zu Glykosaminoglykanen die Rezeptorzahl bezogen auf die Gesamtproteinmenge an Membranpräparation beispielsweise in Radioligand-Bindungsassays bestimmt werden, wie dies zur Miniaturisierung eines Fluoreszenzanisotropie-Assays von Harris *et al.* getan wurde.^[174] Für verlässliche Daten sollte die Abweichung der Rezeptorzahl zwischen verschiedenen Membranpräparationen untersucht und diese Messung gegebenenfalls bei jeder Anfertigung von Membranpräparationen durchgeführt werden, was jedoch mit großem Arbeitsaufwand und Materialverbrauch verbunden wäre und die Vorteile des Fluoreszenzanisotropie-Assays wiederum in Frage stellen würde. Alternativ ist die Bestimmung der Rezeptorzahl mittels ELISA denkbar, wobei mit dem in dieser Arbeit getesteten Kit der Firma Bluegene (*Human Chemokine C-X-C Motif Receptor 1 CXCR1 ELISA Kit*, Daten nicht gezeigt) auch mit neutrophilen Granulozyten keine nachweisbare Rezeptorkonzentration ermittelt werden konnte, was einen Vergleich mehrerer Kits voraussetzt.

Eine alternative Methode zur Bestimmung der Bindungskonstanten, bei welcher die Rezeptorzahl nicht benötigt wird, wird von Kecskes *et al.* anhand des Adenosin_{2A}-Rezeptors beschrieben und stellt ein kinetisches Experiment dar, bei welchem die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation zur Berechnung ermittelt werden.^[125] Da gezeigt werden konnte, dass die Bindung des fluoreszent-markierten CXCL8 an die Membran durch eine Messung der Fluoreszenzanisotropie möglich ist, könnte ein solches Kinetikexperiment auch auf das hier vorgestellte Ligand-Rezeptorpaar übertragen werden. Die ermittelte Bindungskonstante würde auch hier die Summe der verschiedenen, möglichen Wechselwirkungen des markierten CXCL8 zur Membran wiedergeben, da im Fluoreszenzanisotropie-Assay alle Bindungen des Tracers - nicht nur jene an den Rezeptor - erfasst werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass potentielle Inhibitoren mit der Intention des späteren Einsatzes als Medikamente identifiziert werden sollen, könnte dieser Assay nach Optimierung auch in seiner derzeitigen Form eingesetzt werden. Weder unspezifische noch die spezifische Bindung zu Glykosaminoglykanen und Sulfatiden wird bei der Inhibierung in Organismen unterbunden, sodass ein Assay, in welchem diese weiterhin parallel zur spezifischen Bindung an die Rezeptoren vorliegen, prinzipiell näher am physiologischen System liegt. An dieser Stelle muss jedoch angemerkt werden, dass ein FRET-basierter Assay ebenso nah am physiologischen System durchgeführt werden kann. Da nur die spezifische Wechselwir-

kung zwischen den unterschiedlich fluoreszent-markierten Komponenten Ligand und Rezeptor detektiert wird, kann die Bindungskonstante auch ohne Maßnahmen zur Verringerung unspezifischer Wechselwirkungen bestimmt werden. Der Nachteil eines solchen FRET-basierten Assays liegt gegenüber dem hier vorgestellten Fluoreszenzanisotropie-Assay in der Tatsache, dass sowohl Ligand als auch Rezeptor fluoreszent markiert werden müssen und sichergestellt werden muss, dass keine der beiden Markierungen Einfluss auf die Bindungsaffinität nimmt. Die hierzu etablierte Zelllinie mit fluoreszent-markierten Rezeptoren könnte allerdings auch in weiteren fluoreszenz-basierten Assays beispielsweise zur Untersuchung der Internalisierung oder Rezeptorexpression genutzt werden. Zur Identifizierung kleiner, inhibitorischer Moleküle für das Chemokin CXCL12 wurde von Hachet-Haas *et al.* mit HEK293-Zellen, welche das Fusionsprotein CXCR4-EGFP (Donor) exprimieren, und dem mit Texas-Red markierten CXCL12 (Akzeptor) ein FRET-Assay veröffentlicht. Der Assay wurde im 96-Wellformat durchgeführt, wobei zu der in der Kavität vorgelegten Zellsuspension sowohl fluoreszent-markiertes CXCL12 als auch jeweils eine der zu untersuchenden Komponenten gegeben wird. Bereits nach 15-minütiger Inkubation wird die Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge des EGFP: 510 nm) gemessen, wobei die Ligand-Rezeptor-Bindung aufgrund des strahlungslosen Energietransfers als Abnahme der Fluoreszenzintensität sichtbar wird.^[120] Im Gegensatz zum Fluoreszenzanisotropie-Assay wird dieser mit ganzen Zellen geführt, was die Anfertigung einer Membranpräparation erspart. Mit Ausnahme der Bereitstellung zweier fluoreszent-markierter Komponenten sind der FRET-Assay und Fluoreszenzanisotropie-Assay in der Durchführung vergleichbar, sodass zusammenfassend der FRET-Assay dem Fluoreszenzanisotropie-Assay überlegen ist, da spezifisch nur die Ligand-Rezeptor-Bindung detektiert wird.

Der Fluoreszenzanisotropie-Assay eignet sich somit aufgrund der verschiedenen spezifischen Bindungen des Tracers an die Membran, die alle simultan gemessen werden, nicht zur Bestimmung der Bindungsparameter. Allerdings soll dieser Assay auch nicht der Analyse der Ligand-Rezeptorbindung dienen, welche im Fall des hier betrachteten CXCL8/CXCR1/2 bereits hinreichend mit anderen Methoden analysiert ist.

Der Fluoreszenzanisotropie-Assay könnte dagegen das Ausmaß der Inhibierung der Wechselwirkung zwischen CXCL8 und Zellmembranen im Allgemeinen aufzeigen. Da sich die Gesamtbindung aus mehreren Komponenten zusammensetzt, sind verschiedene Annahmen möglich: Ein Inhibitor könnte einerseits lediglich die spezifische Bindung an Rezeptoren hemmen, die unspezifischen Bindungen und insbesondere die spezifische Bindung an Glykosaminoglykane würde nicht beeinflusst werden. Wird die Bindung an Rezeptoren durch einen Inhibitor verhindert, so wäre dies trotz der simultan stattfindenden Bindung des CXCL8 an GAGs detektierbar, insofern der Anteil spezifischer Bindungen an die Rezeptoren vergleichsweise hoch ist und somit eine Verringerung des Anteils an gebundenem Liganden nachweisbar ist. Aufgrund der geringeren Affinitäten zu GAGs (abhängig vom Oligomerisierungszustand des CXCL8 und der GAG selbst, unterer μ molarer Konzentrationsbereich) im Vergleich zur hochaffinen Bindung und der im unteren nanomolaren Bereich eingesetzten Ligandkonzentrationen sollte der Anteil der Rezeptorbindung größer als jener der GAG-Bindung sein.^{[253] [36] [83]}

Unter Annahme, dass der Inhibitor nicht Rezeptor vermittelte Bindungen ebenfalls beeinflusst, könnten in diesem Assay auch solche Inhibitoren ermittelt werden, die nur indirekt beispielsweise durch Inhibierung der Bindung an GAGs und damit durch Änderung der CXCL8-Konzentration am Entzündungsherd, einen Einfluss auf die durch CXCL8 ausgelöste Rezeptoraktivierung ausüben.

Eine Einschränkung besteht dagegen bezüglich der Größe möglicher Inhibitoren, da eine Wechselwirkung mit dem Liganden nicht ausgeschlossen werden kann und in der Regel nicht bekannt ist, ob eine solche eingegangen wird. Während bei Aktivitäts-Assays und nicht auf der Beweglichkeit der Liganden aufbauenden Methoden Inhibitoren jeder Größe untersucht werden können, ist diese Anwendung auf kleine Moleküle, die die Beweglichkeit des Tracers nicht selbst bereits erhöhen, beschränkt. Für größere Inhibitoren, welche ohne Zweifel nur mit der Membran wechselwirken oder die Chemokin-Rezeptorbindung durch Wechselwirkung mit dem Rezeptor inhibieren, gilt diese Einschränkung nicht.

Die Durchführung eines Inhibitorscreenings würde mit einer konstanten Menge an Membranpräparation erfolgen. Diese wird anhand einer zuvor erstellten Bindungskurve ermittelt, wobei eine Gesamtproteinmenge bei etwa 80 % Sättigung des Tracers gewählt wird. Wird zum Lösen der Testkomponenten ein Lösungsmittel benötigt, so kann nach Harris *et al.* bei Fluoreszenzanisotropiemessungen DMSO bis zu einer Konzentration von 2,5 % (v/v) zugegeben werden.^[174] Um zu untersuchen, ob ein potentieller Inhibitor an den Liganden oder den Rezeptor bindet, könnte der Versuch in zwei Testmodi durchgeführt werden und der potentielle Inhibitor sowohl mit der Membranpräparation als auch dem Liganden vorinkubiert werden. Liegt der Inhibierung eine Wechselwirkung zwischen Tracer und potentielltem Inhibitor zugrunde, so würde sich die Fluoreszenzanisotropie der Tracer/Inhibitorlösung nach Zugabe der Membranpräparation nicht ändern, wird die Ligand-Rezeptorwechselwirkung nicht inhibiert, so steigt die Fluoreszenzanisotropie durch die geringere Beweglichkeit des Tracers nach Bindung an den Rezeptor, welche nicht unterbunden wird. Wird die Ligand-Rezeptorwechselwirkung durch eine Bindung des Inhibitors an den Rezeptor unterbunden, so ändert sich die Fluoreszenzanisotropie des Tracers nach Zugabe des Inhibitor/Membranpräparationsgemisch nicht.

Dieser Assay eignet sich demnach zu einem vorläufigen Screening einer großen Anzahl potentieller Inhibitoren. Harris *et al.* veröffentlichte die Durchführung eines Fluoreszenzanisotropie-Assays (M_1 -Muskarin-Acetylcholinrezeptor, Neurokinin-Rezeptor, Fluorophor Cy3B) im Hochdurchsatzverfahren, wobei mit komponentensparenden 1536-Wellkavitäten ein Z' -Faktor größer als 0,5 erzielt werden konnte.^[174] Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich anhand der Messung der Fluoreszenzanisotropie durchaus ein robuster Assay zum Screening einer Bibliothek an Inhibitoren aufbauen lässt und somit eine Alternative zu traditionellen Radioligand-Assays darstellt, bei welchem im Gegensatz zum Fluoreszenzanisotropie- und FRET-Assay eine Trennung des gebundenem von ungebundenem Liganden nötig ist. Zusätzlich stellen die Notwendigkeit spezieller Labore zur Durchführung von Radioligand-Assays und die zeitliche Gebundenheit an die Halbwertszeit der radioaktiven Komponenten einen Nachteil gegenüber den beiden fluoreszenten Methoden dar. Mit einem Radioligand-Assay hinsichtlich der Sensitivität und Stabilität vergleichbar ist der von Inglese *et al.* publizierte Fluoreszenzassay, bei welchem CXCL8S72C mit Hilfe eines Iodacetamidderivats an einen Eu^{3+} -Chelatkomplex ($Eu^{3+}CXCL8S72C$) gebunden wird. Die Durchführung erfolgt analog zu jener im Radioligand-Assay: Nach einer Inkubation des Liganden mit den die Rezeptoren exprimierenden Zellen wird der nicht gebundene Ligand abgetrennt, die Zellen gewaschen und das gebundene Chemokin detektiert. Dies erfolgt durch Zugabe einer sogenannten *Enhancement-Solution*, durch welche die Eu^{3+} -Ionen aus dem Komplex gelöst werden und sich neue Chelatkomplexe mit der zugegebenen Lösung bilden. Diese führen zu einer detektierbaren Fluoreszenz, wobei eine zeitaufgelöste Messung die Hintergrundfluoreszenz minimiert.^[122] Obgleich der Aufwand des Arbeitens mit radioaktiven Substanzen entfällt, muss bei dieser

Methode im Gegensatz zur FRET- und Fluoreszenzanisotropiemessung die Trennung des gebundenen von freiem Liganden durchgeführt werden, was die Durchführung im Hochdurchsatzverfahren erschwert. Ein Vorteil sowohl der Radioligand- als auch dieses Fluoreszenzassays gegenüber dem Fluoreszenzanisotropie-Assay ist jedoch, dass unspezifische Bindungen des Chemokins durch die Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem CXCL8 unterbunden werden können. Eine Dimerisierung des CXCL8, welche den Einsatz im Fluoreszenzanisotropie-Assay verhindert, hat keinen direkten Einfluss auf das detektierte Signal. Es muss lediglich in Erwägung gezogen werden, dass aufgrund der Dimerisierung viel mehr Chemokin in Lösung verbleibt und evtl. mehr unmarkiertes Chemokin eingesetzt werden muss, um die unspezifischen Wechselwirkungen unvollständig zu erfassen. Im Fall des FRET-Assays ist eine solche Maßnahme gegen unspezifische Wechselwirkungen, wie bereits erläutert, nicht nötig. Beim Vergleich mit den beiden anderen fluoreszenten Methoden zeichnen sich diese (FRET-Assay und Fluoreszenzanisotropie-Assay) aus, da nach dem Zusammengeben der Komponenten und entsprechender Inkubationszeit ohne weitere Maßnahmen gemessen werden kann. Der Fluoreszenzanisotropie-Assay zeigt gegenüber dem FRET-Assay zusammenfassend jedoch keine Vorteile, weshalb die Etablierung eines FRET-Assays mit den von Prof. Jean-Luc Galzi, Ph.D., zur Verfügung gestellten HEK293-EGFP-CXCR2-Zellen nach Absprache mit selbigem und einem entsprechend fluoreszent markierten CXCL8S72C ebenfalls in Erwägung gezogen werden sollte. Die weitere Charakterisierung der im Fluoreszenzanisotropie-Assay ermittelten inhibitorischen Substanzen muss im Anschluss in weiteren Assays durchgeführt werden. Hierzu ist beispielsweise bei bekanntem und einfach durchführbarem Syntheseweg oder anderweitig einfach zur Verfügung stehender Substanzen die Fluoreszenzmarkierung der kleinen Inhibitormoleküle möglich, welche wiederum als Tracer in einem Fluoreszenzanisotropie-Assay mit variierenden Konzentrationen an CXCL8 oder Membranpräparationen analysiert werden könnten. Des Weiteren könnten viel versprechende Inhibitoren in fluoreszenzanisotropie-basierten Verdrängungsassays mit Membranpräparationen und CXCL8 eingesetzt werden. Zudem stehen die im Arbeitskreis etablierten Aktivitätsassays zur Bestätigung zur Verfügung.

7 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Bereitstellung der zur Identifizierung von Inhibitoren des inflammatorischen und angiogenetischen Chemokins CXCL8 benötigten Assaykomponenten. Aufbauend auf diesen sollte ein häufig verwendeter Aktivitätsassay basierend auf intrazellulärer Calciumfreisetzung etabliert werden und die Übertragbarkeit des für Bindungsstudien traditionell eingesetzten Radioligand-Assays auf eine auf Messung der Fluoreszenzanisotropie basierende Durchführung geprüft werden.

Durch Transfektion von HEK293-Zellen mit der cDNA des CXCR1 oder CXCR2 konnten mehrere, jeweils einen der Rezeptoren stabil exprimierende Einzelklone selektiert und kultiviert werden. Der Nachweis der Rezeptorexpression wurde durchflusszytometrisch und mittels Western-Blot-Analyse durchgeführt, wobei falsch-positive Ergebnisse letztlich mittels konfokaler Mikroskopie identifiziert wurden. In Kombination dieser drei immunologischen Nachweise wurden die Zelllinien HEK293/CXCR1-C11 und HEK293/CXCR2-IIH8 als vielversprechender Ersatz für neutrophile Granulozyten, welche eine hohe endogene Expression der beiden Rezeptoren aufweisen, bereit gestellt. Zur Bestätigung der biologischen Aktivität der Rezeptoren wurde ein Calcium-Assay mit frisch isolierten neutrophilen Granulozyten etabliert und auf die adhären, transfizierten HEK293-Zellen erfolgreich übertragen. Hierzu wurden sowohl Negativkontrollen bezüglich der Zelllinie und damit Rezeptoren mit den (humanen) CXCR1 und CXCR2 nicht endogen exprimierenden CHO-Zellen als auch der Ligandlösung durch Injektion des Tripeptids fMLP durchgeführt. Der Zusatz von BSA zum Puffer zur Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen des Proteins und der Inhibitoren zu Gefäßwänden wurde ebenfalls untersucht und ermöglichte die Inhibierung des durch CXCL8 ausgelösten Signals bei der Durchführung des optimierten Assays bei Injektion physiologischer Konzentrationen des Chemokins. In diesem Zusammenhang wurde auch bestätigt, dass BSA selbst keinen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration auslöst. Zusätzlich wurde dieser Assay sowohl mit neutrophilen Granulozyten als auch den transfizierten, CXCR1 exprimierenden Zellen, zur Bestätigung der Aktivität des im Arbeitskreis von Dorothea Helmer synthetisierten Inhibitorpeptids CXCL8-RPLoops eingesetzt.

Zusätzlich konnten die CXCR1 stabil exprimierenden Zellen im Arbeitskreis zur Etablierung eines Chemotaxis-Assays im Transwell-Format genutzt werden, durch welchen die biologische Aktivität der Rezeptoren nochmals bestätigt werden konnte.

Zur Durchführung von Bindungsstudien wurden verschiedene Methoden zur Anfertigung von Membranpräparationen der Zelllinien verglichen und die Rezeptoren mittels Western Blot-Analyse dieser Membranpräparationen in diesen in Form jeweils einer Monomer- und Dimerbande des jeweiligen Rezeptors nachgewiesen. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass die hier verwendeten HEK293-Zellen den Rezeptor des Chemokins CXCL12, CXCR4, endogen exprimieren und dieser mit CXCR1 Heterodimere bildet.

Neben dieser Etablierung der die Rezeptoren exprimierenden Zelllinien und deren Membranpräparationen wurde der Ligand, CXCL8, sowie eine Mutante, CXCL8S72C, durch Modifizierung der im Arbeitskreis bereits etablierten rekombinanten Expression hergestellt und chromatographisch gereinigt. Die genannte Proteinmutante wurde mit verschiedenen maleimid-funktionalisierten Fluorophoren, Fluorescein-5-Maleimid, CFTM633-Maleimid und DyLight[®]550-Maleimid (DL550) konjugiert. Zusätzlich wurde ein Rutheniumkomplex als Langzeitfluorophor mit einem bifunktionalen Linker versehen und ebenfalls mit CXCL8S72C konju-

giert. Ein Vergleich der verschiedenen Proteinkonjugate zeigte, dass sich CXCL8S72C-CFTM633 hier nicht zur Messung der Fluoreszenzanisotropie eignet. Sowohl mit CXCL8S72C-DL550 als auch CXCL8S72C-Fluorescein konnten Bindungskurven bei Inkubation des Proteinkonjugats mit unterschiedlichen Konzentrationen an Membranpräparation dargestellt werden, obgleich der orange-gelbe Farbstoff eine zu geringe dynamische Breite und zudem unterschiedliche Werte der Fluoreszenzanisotropie des freien Tracers zeigte. Dies könnte mit einem zu beweglichen Fluorophor am Protein (Propellereffekt) und hieraus unterschiedlichen Konformationen des Fluorophors am Protein (starr am Protein gebunden und frei beweglich) erklärt werden. Während Fluorescein selbst keine Wechselwirkung mit der Membranpräparation einging, ist die beobachtete Bindung von CXCL8S72C-DL550 zudem auf die Bindung des Farbstoffs DyLight[®]550-Maleimid zurückzuführen, weshalb sich dieses Proteinkonjugat aus mehreren Gründen zusammenfassend ebenfalls nicht zur zukünftigen Optimierung eines Fluoreszenzanisotropieassays eignet. Der Zusatz von BSA zur Reduktion unspezifischer Wechselwirkungen, ähnlich zur Durchführung des Calcium-Assays, ist wegen einer Wechselwirkung des Fluoresceinkonjugats mit diesem Protein nicht möglich. Zusätzlich wurde eine weitere Methode zur Quantifizierung unspezifischer Wechselwirkungen, die Zugabe eines Überschusses an nicht markiertem CXCL8 getestet. Aufgrund der bekannten Dimerisierung des Chemokins wurde die Bindung zwischen markiertem und unmarkiertem CXCL8 untersucht und im verwendeten Puffer (TRIS-T) mit beiden Tracern, CXCL8S72C-Fluorescein und CXCL8S72C-DL550, eine Bindungsaffinität von etwa 1 μ M ermittelt, wodurch sich die Verwendung des Chemokins als sogenannter kalter Ligand erübrigt.

Zusammenfassend stehen im Arbeitskreis nun sowohl CXCR1- als auch CXCR2-stabil exprimierende Zelllinien als auch mit verschiedenen Fluorophoren konjugierte Varianten der Chemokinmutante CXCL8S72C zur Verfügung, welche für weitere Aktivitäts- und Bindungsassays eingesetzt werden können. Die zukünftige Etablierung eines Fluoreszenzanisotropieassays zum Screening kleiner Inhibitoren des Chemokins scheint letztlich möglich, jedoch muss einerseits die Bindung des CXCL8 an GAGs als auch die Dimerisierung dieses Chemokins bei der Etablierung beachtet und hierfür geeignete Lösungen gefunden werden. Bezüglich der hier hergestellten Konjugate sollten für einen solchen Assay Fluorophore mit einer höheren Quantenausbeute gewählt werden, damit die zur korrekten Berechnung der Dissoziationskonstanten nötige Tracerkonzentration kleiner der bekannten Dissoziationskonstanten eingesetzt werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Zlotnik, O. Yoshie, *Immunity* **2012**, *36*, 705-716.
- [2] B. Moser, M. Wolf *et al.*, *Trends in Immunology* **2004**, *25*, 75-84.
- [3] S. J. Allen, S. E. Crown, T. M. Handel, *Annual Review of Immunology* **2007**, *25*, 787-820.
- [4] A. Zlotnik, O. Yoshie, *Immunity* **2000**, *12*, 121-127.
- [5] G. S. Kelner, J. Kennedy *et al.*, *Science* **1994**, *266*, 1395-1399.
- [6] J. F. Bazan, K. B. Bacon *et al.*, *Nature* **1997**, *385*, 640-644.
- [7] P. M. Murphy, H. L. Tiffany, *Science* **1991**, *253*, 1280-1283.
- [8] P. M. Murphy, M. Baggiolini *et al.*, *Pharmacological Reviews* **2000**, *52*, 145-176.
- [9] D. K. Vassilatis, J. G. Hohmann *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 4903-4908.
- [10] P. L. Yeagle, A. D. Albert, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2007**, *1768*, 808-824.
- [11] D. M. Rosenbaum, S. G. F. Rasmussen, B. K. Kobilka, *Nature* **2009**, *459*, 356-363.
- [12] P. M. Murphy, *Annual Review of Immunology* **1994**, *12*, 593-633.
- [13] A. Mantovani, *Immunology Today* **1999**, *20*, 254-257.
- [14] P. Loetscher, A. Pellegrino *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 2986-2991.
- [15] N. M. Weathington, A. H. Houwelingen *et al.*, *Nature Medicine* **2006**, *12*, 317-323.
- [16] I. Clark, Lewis, K. S. Kim *et al.*, *Journal of Leukocyte Biology* **1995**, *57*, 703-711.
- [17] I. Clark, Lewis, C. Schumacher *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 23128-23134.
- [18] B. Moser, B. Dewald *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 7125-7128.
- [19] A. E. Koch, P. J. Polverini *et al.*, *Science* **1992**, *258*, 1798-1801.
- [20] R. M. Strieter, P. J. Polverini *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 27348-27357.
- [21] A. Zlotnik, O. Yoshie, H. Nomiya, *Genome Biology* **2006**, *7*, 243.
- [22] J. G. Cyster, *Science* **1999**, *286*, 2098-2102.
- [23] J. G. Cyster, *The Journal of Experimental Medicine* **1999**, *189*, 447-450.
- [24] M. Baggiolini, I. Clark, Lewis, *{FEBS} Letters* **1992**, *307*, 97-101.

-
- [25] M. Aihara, D. Tsuchimoto *et al.*, *Infection and Immunity* **1997**, *65*, 3218-3224.
- [26] E. DiMango, H. J. Zar *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation* **1995**, *96*, 2204-2210.
- [27] S. L. Johnston, A. Papi *et al.*, *Journal of Infectious Diseases* **1997**, *175*, 323-329.
- [28] T. Murayama, Y. Ohara *et al.*, *Journal of Virology* **1997**, *71*, 5692-5695.
- [29] Y. Mahé, N. Mukaida *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 13759-63.
- [30] H. Holtmann, R. Winzen *et al.*, *Molecular and Cellular Biology* **1999**, *19*, 6742-6753.
- [31] K. Matsushima, K. Morishita *et al.*, *The Journal of Experimental Medicine* **1988**, *167*, 1883-1893.
- [32] A. K. Samanta, J. J. Oppenheim, K. Matsushima, *The Journal of Experimental Medicine* **1989**, *169*, 1185-1189.
- [33] W. E. Holmes, J. Lee *et al.*, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **1991**, *183*, 1278-1280..
- [34] E. T. Baldwin, I. T. Weber *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 502-506.
- [35] G. M. Clore, E. Appella *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 18907-18911.
- [36] B. Goger, Y. Halden *et al.*, *Biochemistry* **2002**, *41*, 1640-1646.
- [37] W. Schnitzel, U. Monschein, J. Besemer, *Journal of Leukocyte Biology* **1994**, *55*, 763-770.
- [38] S. D. Burrows, M. L. Doyle *et al.*, *Biochemistry* **1994**, *33*, 12741-12745.
- [39] V. Gross, R. Andreesen *et al.*, *European Journal of Clinical Investigation* **1992**, *22*, 200-203.
- [40] N. G. McElvaney, H. Nakamura *et al.*, *Journal of Clinical Investigation* **1992**, *90*, 1296-1301.
- [41] H. Fernando, C. Chin *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 36175-36178.
- [42] M. W. Nasser, S. K. Raghuvanshi *et al.*, *The Journal of Immunology* **2009**, *183*, 3425-3432.
- [43] G. S. V. Kuschert, F. Coulin *et al.*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12959-12968.
- [44] A. J. Hoogewerf, G. S. V. Kuschert *et al.*, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13570-13578.
- [45] K. Rajarathnam, G. N. Prado *et al.*, *Biochemistry* **2006**, *45*, 7882-7888.
- [46] A. Ravindran, P. R. B. Joseph, K. Rajarathnam, *Biochemistry* **2009**, *48*, 8795-8805.
- [47] A. Chuntharapai, K. J. Kim, *The Journal of Immunology* **1995**, *155*, 2587-2594.
- [48] A. Chuntharapai, J. Lee *et al.*, *The Journal of Immunology* **1994**, *153*, 5682-5688.
- [49] L. M. Muñoz, P. Lucas *et al.*, *The Journal of Immunology* **2009**, *183*, 7337-7346.
- [50] C. Murdoch, P. N. Monk, A. Finn, *Cytokine* **1999**, *11*, 704-712.

-
- [51] A. Sturm, D. C. Baumgart *et al.*, *Cytokine* **2005**, *29*, 42-48.
- [52] L. M. Campbell, P. J. Maxwell, D. J. Waugh, *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 929-959.
- [53] M. Lacy, J. Jones *et al.*, *Journal of Neuroimmunology* **1995**, *61*, 71-78.
- [54] R. Horuk, A. W. Martin *et al.*, *The Journal of Immunology* **1997**, *158*, 2882-2890.
- [55] F. Trettel, S. D. Bartolomeo *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 40980-40988.
- [56] S. Wilson, G. Wilkinson, G. Milligan, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 28663-28674.
- [57] M. Burger, J. A. Burger *et al.*, *The Journal of Immunology* **1999**, *163*, 2017-2022.
- [58] C. Murdoch, A. Finn, *Blood* **2000**, *95*, 3032-3043.
- [59] L. Rajagopalan, K. Rajarathnam, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 30000-30008.
- [60] S. H. Park, F. Casagrande *et al.*, *Journal of Molecular Biology* **2011**, *414*, 194-203.
- [61] R. T. Clubb, J. G. Omichinski *et al.*, *{FEBS} Letters* **1994**, *338*, 93-97.
- [62] S. R. Leong, R. C. Kabakoff, C. A. Hébert, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 19343-19348.
- [63] P. R. B. Joseph, J. M. Sarmiento *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 29262-29269.
- [64] I. Clark, Lewis, B. Dewald *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 16075-16081.
- [65] L. Rajagopalan, K. Rajarathnam, *Bioscience Reports* **2006**, *26*, 325-339.
- [66] C. A. Hébert, R. V. Vitangcol, J. B. Baker, *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 18989-18994.
- [67] S. Haldar, H. Raghuraman *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2010**, *1798*, 1056-1061.
- [68] H. Fernando, G. T. Nagle, K. Rajarathnam, *FEBS Journal* **2007**, *274*, 241-251.
- [69] R. Stillie, S. M. Farooq *et al.*, *Journal of Leukocyte Biology* **2009**, *86*, 529-543.
- [70] D. J. J. Waugh, C. Wilson, *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 6735-6741.
- [71] N. Mukaida, *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **2003**, *284*, L566.
- [72] S. A. Jones, M. Wolf *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 6682-6686.
- [73] H. Keller, P. Wilkinson *et al.*, *Cell Biology International Reports* **1977**, *1*, 391-397.
- [74] M. Baggiolini, A. Walz, S. L. Kunkel, *Journal of Clinical Investigation* **1989**, *84*, 1045-1049.
- [75] J. Barlic, J. D. Andrews *et al.*, *Nature Immunology* **2000**, *1*, 227-233.
- [76] P. A. Detmers, S. K. Lo *et al.*, *The Journal of Experimental Medicine* **1990**, *171*, 1155-1162.

-
- [77] K. M. H., Lüllmann, L. Hein, **2008**, .
- [78] J. G. Wagner, R. A. Roth, *Pharmacological Reviews* **2000**, *52*, 349-374.
- [79] M. B. Lawrence, T. A. Springer, *Cell* **1991**, *65*, 859-873.
- [80] E. Crockett, Torabi, B. Sulenbarger *et al.*, *The Journal of Immunology* **1995**, *154*, 2291-2302.
- [81] C. V. Carman, T. A. Springer, *The Journal of Cell Biology* **2004**, *167*, 377-388.
- [82] T. M. Handel, Z. Johnson *et al.*, *Annual Review of Biochemistry* **2005**, *74*, 385-410.
- [83] A. Pichert, S. A. Samsonov *et al.*, *Glycobiology* **2012**, *22*, 134-145.
- [84] L. M. Webb, M. U. Ehrengruber *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90*, 7158-7162.
- [85] G. S. V. Kuschert, A. J. Hoogewerf *et al.*, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11193-11201.
- [86] D. Spillmann, D. Witt, U. Lindahl, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 15487-15493.
- [87] E. P. Reeves, M. Williamson *et al.*, *The Journal of Immunology* **2010**, *184*, 1642-1652.
- [88] L. M. Luttrell, R. J. Lefkowitz, *Journal of Cell Science* **2002**, *115*, 455-465.
- [89] G. H. Fan, W. Yang *et al.*, *Biochemistry* **2001**, *40*, 791-800.
- [90] M. W. Nasser, S. K. Raghuvanshi *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 6906-6915.
- [91] R. Feniger, Barish, A. Z. M., Ran, A. Ben, Baruch, *Cytokine* **1999**, *11*, 996-1009.
- [92] J. Sai, G. Walker *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 35931-35941.
- [93] R. M. Richardson, R. J. Marjoram *et al.*, *The Journal of Immunology* **2003**, *170*, 2904-2911.
- [94] A. K. Samanta, J. J. Oppenheim, K. Matsushima, *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 183-189.
- [95] J. S. Lee, C. W. Frevert *et al.*, *The Journal of Immunology* **2003**, *170*, 5244-5251.
- [96] D. A. Bergin, E. P. Reeves *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation* **2010**, *120*, 4236-4250.
- [97] S. Apostolakis, K. Vogiatzi *et al.*, *Cardiovascular Research* **2009**, *84*, 353-360.
- [98] W. A. Boisvert, L. K. Curnss, R. A. Terkeltaub, *Immunologic Research* **2000**, *21*, 129-137.
- [99] P. L. Podolin, B. J. Bolognese *et al.*, *The Journal of Immunology* **2002**, *169*, 6435-6444.
- [100] A. E. Koch, S. L. Kunkel *et al.*, *The Journal of Immunology* **1991**, *147*, 2187-2195.
- [101] B. Deleuran, P. Lemche *et al.*, *Scandinavian Journal of Rheumatology* **1994**, *23*, 2-7.
- [102] A. E. Koch, S. L. Kunkel *et al.*, *Journal of Clinical Investigation* **1994**, *94*, 1012-1018.

-
- [103] P. R. Elford, P. H. Cooper, *Arthritis & Rheumatism* **1991**, *34*, 325-332.
- [104] J. R. White, J. M. Lee *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 10095-10098.
- [105] K. K. Ho, D. S. Auld *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 2724-2728.
- [106] R. W. Chapman, J. E. Phillips *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics* **2009**, *121*, 55-68.
- [107] R. Bertini, M. Allegretti *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 11791-11796.
- [108] S. Hayashi, A. Kurdowska *et al.*, *The Journal of Immunology* **1995**, *154*, 814-824.
- [109] C. Ezerzer, M. Dolgin *et al.*, *Peptides* **2009**, *30*, 1296-1305.
- [110] D. Helmer, I. Rink *et al.*, *RSC Advances* **2015**, *5*, 25657-25668.
- [111] M. R. Attwood, N. Borkakoti *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, *6*, 1869-1874.
- [112] M. R. Attwood, E. A. Conway *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7*, 429-432.
- [113] C. Bizzarri, M. Allegretti *et al.*, *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* **2003**, *2*, 67-79.
- [114] J. K. Singh, B. M. Simões *et al.*, *Breast Cancer Research: BCR* **2013**, *15*, 210.
- [115] H. Rehm, T. Letzel, **2009**, .
- [116] F. Polarization, *PanVera Corporation, Madison, WI* **2002**, .
- [117] R. M. Richardson, B. C. Pridgen *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 23830-23836.
- [118] J. R. Lakowicz, **2007**, .
- [119] A. Valenzuela, Fernández, T. Palanche *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 26550-26558.
- [120] M. Hachet, Haas, K. Balabanian *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 23189-23199.
- [121] C. Tahtaoui, F. Guillier *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 7847-7859.
- [122] J. Inglese, P. Samama *et al.*, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2372-2377.
- [123] I. A. Karpenko, R. Kreder *et al.*, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 359-363.
- [124] P. H. Lee, D. J. Bevis, *Journal of Biomolecular Screening* **2000**, *5*, 415-419.
- [125] M. Kecskés, T. S. Kumar *et al.*, *Biochemical Pharmacology* **2010**, *80*, 506-511.
- [126] N. J. Skelton, C. Quan *et al.*, *Structure* **1999**, *7*, 157-168.
- [127] D. M. Jameson, J. C. Croney, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2003**, *6*, 167-176.

-
- [128] F. Perrin, *J. Phys. Radium* **1926**, 7, 390-401.
- [129] G. Weber, *Biochemical Journal* **1952**, 51, 145-155.
- [130] A. Jablonski, *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. sci. math. astr. phys* **1960**, 8, 259-264.
- [131] G. J. Gatto, E. L. Maynard *et al.*, *Biochemistry* **2003**, 42, 1660-1666.
- [132] I. Corporation, *Fluorescence Polarization Technical Resource Guide, fourth edition* **2006**, .
- [133] W. B. Dandliker, M. L. Hsu *et al.*, *Methods in Enzymology* **1981**, 74, 3-28.
- [134] R. Zhang, X. Xie, *Acta Pharmacologica Sinica* **2012**, 33, 372-384.
- [135] Z. Cheng, D. Garvin *et al.*, *Current Chemical Genomics* **2010**, 4, 84-91.
- [136] J. H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg, *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, 4, 67-73.
- [137] R. J. Lefkowitz, S. K. Shenoy, *Science* **2005**, 308, 512-517.
- [138] R. I. W. Osmond, A. Sheehan *et al.*, *Journal of Biomolecular Screening* **2005**, 10, 730-737.
- [139] B. E. Hawes, T. Biesen *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, 17148-17153.
- [140] L. M. Luttrell, *Journal of Molecular Endocrinology* **2003**, 30, 117-126.
- [141] L. Jialie, Z. Yingmin *et al.*, *Journal of Visualized Experiments* **2011**, .
- [142] M. Weber, L. Muthusubramaniam *et al.*, *Assay and Drug Development Technologies* **2007**, 5, 117-126.
- [143] C. Chambers, F. Smith *et al.*, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2003**, 6, 355-362.
- [144] S. T. K., Liu, N. Southall *et al.*, *Current Chemical Genomics* **2008**, 1, 70-78.
- [145] F. Zanella, J. B. Lorens, W. Link, *Trends in Biotechnology* **2010**, 28, 237-245.
- [146] J. Inglese, R. L. Johnson *et al.*, *Nature Chemical Biology* **2007**, 3, 466-479.
- [147] R. M. Richardson, R. A. DuBose *et al.*, *Biochemistry* **1995**, 34, 14193-14201.
- [148] M. Wolff, S. Kredel *et al.*, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2010**, 13, 3-15.
- [149] R. David, Z. Machova, A. G. Beck, Sickinger, *Biological Chemistry* **2003**, 384, 1619-1630.
- [150] R. M. Richardson, B. Haribabu *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 28717-28724.
- [151] M. A. Kron, S. Cichanowicz *et al.*, *Protein Science* **2008**, 17, 983-989.
- [152] A. Li, S. Dubey *et al.*, *The Journal of Immunology* **2003**, 170, 3369-3376.
- [153] O. Gasser, A. Missiou *et al.*, *Blood* **2005**, 106, 3718-3724.

-
- [154] J. J. Campbell, S. Qin *et al.*, *The Journal of Cell Biology* **1996**, *134*, 255-266.
- [155] L. Wu, N. Ruffing *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 31202-31209.
- [156] T. Miyoshi, K. Yamashita *et al.*, *Immunology* **2010**, *131*, 331-339.
- [157] D. Wu, G. J. LaRosa, M. I. Simon, *Science (New York, NY)* **1993**, *261*, 101-103.
- [158] H. M. Korchak, K. Vienne *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259*, 4076-4082.
- [159] W. Schorr, D. Swandulla, H. U. Zeilhofer, *European Journal of Immunology* **1999**, *29*, 897-904.
- [160] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 3440-3450.
- [161] M. W. Roe, J. J. Lemasters, B. Herman, *Cell Calcium* **1990**, *11*, 63-73.
- [162] D. L. Groden, Z. Guan, B. T. Stokes, *Cell Calcium* **1991**, *12*, 279-287.
- [163] A. Malgaroli, D. Milani *et al.*, *The Journal of Cell Biology* **1987**, *105*, 2145-2155.
- [164] F. D. Virgilio, T. H. Steinberg *et al.*, *The Journal of Immunology* **1988**, *140*, 915-920.
- [165] T. E. Gunter, D. Restrepo, K. K. Gunter, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **1988**, *255*, C304-C310.
- [166] W. J. Valentine, G. Tigy, *Methods in Molecular Biology* **2012**, *874*, 77-87.
- [167] M. Gouwy, S. Struyf *et al.*, *Molecular Pharmacology* **2008**, *74*, 485-495.
- [168] Z. Zhang, G. Cherryholmes *et al.*, *European Journal of Immunology* **2009**, *39*, 3181-3194.
- [169] A. Takahashi, P. Camacho *et al.*, *Physiological Reviews* **1999**, *79*, 1089-1125.
- [170] D. Thomas, S. Tovey *et al.*, *Cell Calcium* **2000**, *28*, 213-223.
- [171] L. Sanchez, *Protocols on line* **2001**, .
- [172] B. Sánchez, S. Chaignepain *et al.*, *FEMS Microbiology Letters* **2009**, *295*, 226-229.
- [173] F. Graham, J. Smiley *et al.*, *J. Gen. Virol.* **1977**, *36(1)*, 59-74.
- [174] A. Harris, S. Cox *et al.*, *Journal of Biomolecular Screening* **2003**, *8*, 410-420.
- [175] S. A. Albrecht, *Stiffness variation in microcavities based 3D cell culture*, *Fachbereich Biologie, TU Darmstadt* **2015**, .
- [176] H. Plattner, J. Hentschel, **2006**, .
- [177] J. O'Brien, I. Wilson *et al.*, *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 5421-5426.
- [178] J. Davies, A. Jimenez, *The American journal of tropical medicine and hygiene* **1980**, *29*, 1089-1092.

-
- [179] S. Bar, Nun, Y. Shneyour, J. S. Beckmann, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* **1983**, *741*, 123-127.
- [180] C. Hadfield, B. E. Jordan *et al.*, *Current genetics* **1990**, *18*, 303-313.
- [181] T. Murakami, S. Kumakura *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53*, 2940-2948.
- [182] H. Soto, W. Wang *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 8205-8210.
- [183] J. Sai, G. H. Fan *et al.*, *Journal of Cell Science* **2004**, *117*, 5489-5496.
- [184] I. Kufareva, B. S. Stephens *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, E5363-E5372.
- [185] T. W. J. Huizinga, C. E. Schoot *et al.*, **1988**, .
- [186] B. K. Atwood, J. Lopez *et al.*, *BMC Genomics* **2011**, *12*, 14.
- [187] M. Bai, S. Trivedi, E. M. Brown, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 23605-23610.
- [188] D. A. Hall, I. J. M. Beresford *et al.*, *British journal of pharmacology* **1999**, *126*, 810-818.
- [189] C. Bordier, *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 1604-1607.
- [190] L. Ilkhani, Glidjai, *Methodenoptimierung zur Untersuchung der Wechselwirkungen von CXCL8 mit seinen Rezeptoren, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, TU Darmstadt* **2014**, .
- [191] L. W. Chen, C. R. Jan, *International immunopharmacology* **2001**, *1*, 1341-1349.
- [192] H. M. Miettinen, J. M. Gripentrog, A. J. Jesaitis, *Journal of cell science* **1998**, *111*, 1921-1928.
- [193] R. Buser, A. E. I. Proudfoot, *Chemokine Protocols* **2000**, .
- [194] W. Yang, W. P. Schraw *et al.*, *Biochemistry* **1997**, *36*, 15193-15200.
- [195] D. Wiese, K. Schmitz, *Journal of Immunological Methods* **2011**, *364*, 77-82.
- [196] Y. Wan, J. Lu, Z. Cui, *Separation and Purification Technology* **2006**, *48*, 133-142.
- [197] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1995**, *51*, L7-L21.
- [198] J. E. Aubin, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1979**, *27*, 36-43.
- [199] J. T. Lin, P. C. Chen *et al.*, *PloS one* **2012**, *7*, e36086.
- [200] P. Cornelius, E. Lee *et al.*, *Journal of Biomolecular Screening* **2009**, *14*, 360-370.
- [201] S. J. Allen, S. Ribeiro *et al.*, *Protein Expression and Purification* **2009**, *66*, 73-81.
- [202] S. Veiksina, S. Kopanchuk, A. Rincken, *Analytical Biochemistry* **2010**, *402*, 32-39.

-
- [203] K. L. Vedvik, H. C. Eliason *et al.*, *Assay and Drug Development Technologies* **2004**, *2*, 193-203.
- [204] E. Terpetschnig, J. D. Dattelbaum *et al.*, *Analytical Biochemistry* **1997**, *251*, 241-245.
- [205] T. Group, *Instructions for use for infinite M1000* **2011**, .
- [206] L. Prystay, M. Gosselin, P. Banks, *Journal of Biomolecular Screening* **2001**, *6*, 141-150.
- [207] F. Sierro, C. Biben *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 14759-14764.
- [208] Y. Ding, M. Li *et al.*, *Molecular Pharmacology* **2006**, *69*, 1269-1279.
- [209] S. H. Park, B. B. Das *et al.*, *Nature* **2012**, *491*, 779-783.
- [210] M. Farzan, G. J. Babcock *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 29484-29489.
- [211] A. J. Sloane, V. Raso *et al.*, *Immunology and Cell Biology* **2005**, *83*, 129-143.
- [212] N. C. Kaneider, A. Agarwal *et al.*, *Nature Medicine* **2005**, *11*, 661-665.
- [213] C. C. Hsu, H. P. Li *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *402*, 228-234.
- [214] V. V. Tschärner, B. Prod'Hom *et al.*, **1986**, .
- [215] A. Mortier, N. Berghmans *et al.*, *PloS one* **2011**, *6*, e23913.
- [216] B. Haribabu, R. M. Richardson *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 28726-28731.
- [217] P. Hodder, R. M. J., Cassaday *et al.*, *Journal of Biomolecular Screening* **2004**, *9*, 417-426.
- [218] M. Goebel, Stengel, A. Stengel *et al.*, *Analytical Biochemistry* **2011**, *414*, 38-46.
- [219] P. M. McDonough, D. C. Button, *Cell Calcium* **1989**, *10*, 171-180.
- [220] F. DiVirgilio, T. H. Steinberg *et al.*, *Clinical Research* **1987**, *35*, A619-A619.
- [221] D. Abboud, F. Daubeuf *et al.*, *Scientific reports* **2015**, *5*, .
- [222] B. J. K. S. M. C., L., Etienne, J. S. Schultz, **2012**, .
- [223] P. K. Smith, R. II. Krohn *et al.*, *Analytical Biochemistry* **1985**, *150*, 76-85.
- [224] K. J. Wiechelman, R. D. Braun, J. D. Fitzpatrick, *Analytical Biochemistry* **1988**, *175*, 231-237.
- [225] M. Brinkley, *Bioconjugate Chemistry* **1992**, *3*, 2-13.
- [226] H. Szmecinski, E. Terpetschnig, J. R. Lakowicz, *Biophysical Chemistry* **1996**, *62*, 109-120.
- [227] T. Koshiyama, N. Kawaba *et al.*, *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 264-269.
- [228] J. S. Kang, G. Piszczek, J. R. Lakowicz, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* **2002**, *1597*, 221-228.

-
- [229] V. Buschmann, K. D. Weston, M. Sauer, *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 195-204.
- [230] M. Sauer, C. Zander *et al.*, *Applied Physics B: Lasers and Optics* **1997**, *65*, 427-431.
- [231] T. C. Turek, Etienne, E. C. Small *et al.*, *Journal of Biomolecular Screening* **2003**, *8*, 176-184.
- [232] L. C. Zanetti, Domingues, C. J. Tynan *et al.*, *PloS one* **2013**, *8*, e74200.
- [233] M. Terasaki, M. E. Dailey, *Handbook of biological confocal microscopy* **1995**, 327-346.
- [234] S. C. Wohlfart, *Nachweis und Bestimmung der Rezeptorzahl von CXCR1 auf transfizierten HEK293 Zellen*, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, TU Darmstadt **2014**, .
- [235] E. Terpetschnig, H. Szmecinski, J. R. Lakowicz, *Analytical Biochemistry* **1995**, *227*, 140-147.
- [236] K. Y. Blain, W. Kwiatkowski *et al.*, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10008-10015.
- [237] U. Forssmann, H. J. Mägert *et al.*, *Journal of Leukocyte Biology* **2001**, *70*, 357-366.
- [238] J. Widengren, P. Schwille, *The Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 6416-6428.
- [239] F. Dietz, S. K. Rentsch, *Chemical physics* **1985**, *96*, 145-151.
- [240] K. Rajarathnam, B. D. Sykes *et al.*, *Science* **1994**, *264*, 90-92.
- [241] P. R. B. Joseph, K. Poluri *et al.*, *Biophysical journal* **2013**, *105*, 1491-1501.
- [242] X. Huang, *Journal of Biomolecular Screening* **2003**, *8*, 34-38.
- [243] R. H. J., Lee, G. C. Rice *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 16283-16287.
- [244] C. M. Mendel, D. B. Mendel, *Biochem. J* **1985**, *228*, 269-272.
- [245] J. F. Paolini, D. Willard *et al.*, *The Journal of Immunology* **1994**, *153*, 2704-2717.
- [246] H. B. Lowman, W. J. Fairbrother *et al.*, *Protein Science: A Publication of the Protein Society* **1997**, *6*, 598-608.
- [247] T. Kawamura, B. Stephens *et al.*, *PloS one* **2014**, *9*, e81454.
- [248] F. Caccuri, C. Giagulli *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 14580-14585.
- [249] R. Sandhoff, H. Grieshaber *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2005**, *1687*, 52-63.
- [250] P. Romagnani, F. Annunziato *et al.*, *Journal of Clinical Investigation* **2001**, *107*, 53-63.
- [251] C. Feil, H. G. Augustin, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, *247*, 38-45.
- [252] N. F. Neel, E. Schutyser *et al.*, *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2005**, *16*, 637-658.
- [253] D. P. Witt, A. D. Lander, *Current Biology* **1994**, *4*, 394-400.





Marina Jöst

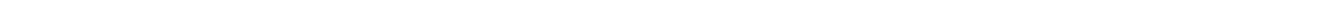
Darmstadt, den 19.05.2016

Schwanheimer Straße 93
64625 Bensheim

Erklärung

Hiermit erkläre ich, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Marina Jöst



Marina Jöst

Darmstadt, den 19.05.2016

Schwanheimer Straße 93
64625 Bensheim

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Marina Jöst