

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Schrader

**Bakteriell erzeugte Bindungspeptide
für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor**

Gewinnung und Charakterisierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Oliver Elsner

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Signalverkehr durch Membranen	1
1.2 Peptide als Liganden von G-Protein gekoppelten Proteinen	2
1.2.1 Experimentell ermittelte Bindungspeptide	3
1.2.1.1 Peptidpräsentierende Phagenbanken	3
1.2.1.2 Peptidpräsentierende Bakterienbanken: die FliTrx™ Random Peptide Library	4
1.3 Die Adenosinrezeptoren-Familie	7
1.3.1 Nomenklatur	7
1.3.2 Rezeptorverteilung	7
1.3.3 Rezeptor-Effektor-Kopplung	9
1.3.4 Kardiovaskuläre Effekte	9
1.3.5 Pathophysiologische Bedeutung	11
1.3.6 Peptide als Liganden am Adenosin _{2a} -Rezeptor	11
2 Problemstellung	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Material	13
3.2 Methoden	13
3.2.1 Selektion der FliTrx™ Random Peptide Library gegen den hA _{2a} -Rezeptor	13
3.2.1.1 Puffer und Lösungen	13
3.2.1.2 Protokoll des „Panning“	16
3.2.1.2.1 Übersicht	16
3.2.1.2.2 Anzüchten der Bakterienkultur	16
3.2.1.2.3 Induktion der peptidpräsentierenden Bakterienbank	17
3.2.1.2.4 Immobilisieren des hA _{2a} -Rezeptors	17
3.2.1.2.5 Selektion der induzierten Zellen	17
3.2.1.2.6 Anzüchten einer Bakterienkultur aus den eluierten Zellen	18
3.2.1.2.7 Isolierung positiver Klone	18
3.2.2 DNA – Präparation	18

3.2.3 DNA-Sequenzierung	19
3.2.3.1 Vorbereitung des Gels	19
3.2.3.2 Annealing der Primer an doppelsträngige DNA	20
3.2.3.3 Labelling Reaction	20
3.2.3.4 Termination Reaction	20
3.2.3.5 Elektrophorese	21
3.2.3.6 Autoradiographie und Analyse	21
3.2.4 Peptidsynthese	21
3.2.4.1 Festphasen-Peptidsynthese	22
3.2.4.2 Abspaltung der Peptide vom Synthese-Harz	22
3.2.4.3 Reinigung des Rohpeptids	23
3.2.5 Bindungsstudien	23
3.2.5.1 Biacore-Messungen	23
3.2.5.2 Scatchard Plot	23
3.2.6 Funktionelle Studien	24
4 Ergebnisse	25
4.1 Klonierung des humanen Adenosin _{2a} -Rezeptors	25
4.2 Selektion der Bindungspeptide	25
4.3 Bestimmung der DNA- und Aminosäuresequenzen	26
4.4 Muster- und Ladungsanalyse der Bindungspeptide	37
4.4.1 Einführung	37
4.4.2 Musteranalyse	38
4.4.3 Ladungsanalyse	41
4.5 Peptidsynthese	48
4.6 Bindungsstudien	51
4.6.1 Oberflächenplasmonenresonanz	51
4.6.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Bindungspeptide	52
4.7 Funktionelle Studien	57
5 Diskussion	59

6 Zusammenfassung	66
7 Anhang	67
7.1 Die Kurzschreibweise der Aminosäuren	67
7.2 Verzeichnis der Tabellen	68
7.3 Verzeichnis der Abbildungen	68
8 Literatur	70
Lebenslauf	78
Danksagung	79
Abstract	80

1 Einleitung

1.1 Signalverkehr durch Membranen

Zellen aller Organismen haben Mechanismen hervorgebracht, um Reize aus der Umgebung wahrzunehmen und sie dann passend zu beantworten. Das Spektrum dieser Reize umfaßt Nährstoffe, Wachstumsfaktoren, Hormone, Neurotransmitter und sensorischen Input¹. Dabei steht die Zelle immer vor der Aufgabe, diese externen Signale aufzunehmen, sie über die Plasmamembran zu übertragen, um dann im Zellinneren einen entsprechenden Effekt auszulösen.

Die Erkennung extrazellulärer chemischer Signale erfolgt durch eine spezifische Bindung an Biomoleküle, die als „Rezeptoren“ bezeichnet werden. Stoffe, die nicht (wie z.B. Steroidhormone, für die es intrazelluläre Rezeptoren² gibt) die Zellmembran durchdringen können, vermitteln ihre intrazelluläre Wirkung über membranständige Rezeptoren. Entsprechend ihrem Signalübertragungsmechanismus lassen sich die meisten Zelloberflächen-rezeptoren in drei Klassen³ einteilen:

Zum einen gibt es Ionenkanalgekoppelte Rezeptoren, wobei sich der Ionenkanal durch Effektorbindung an den Rezeptor öffnen oder schließen kann. Insbesondere die Wirkung von Neurotransmittern wird über diesen Rezeptortyp gesteuert. Des Weiteren existieren katalytische Rezeptoren, die, sofern sie aktiviert sind, entweder selbst als Enzyme wirken, oder mit Enzymen assoziiert sind. Meistens durchspannen sie die Membran nur einmal. Dabei befindet sich die Bindungsstelle für den Liganden außerhalb, der katalytische Teil, meist eine Proteinkinase, innerhalb der Zelle. Schließlich gibt es Rezeptoren, bei denen durch den Effektor ein erhöhtes Bindungsvermögen für ein auf der Membraninnenseite gelegenes sogenanntes G-Protein (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein) induziert wird. Die Bindung des G-Proteins an den Rezeptor löst anschließend eine Aktivierung oder Hemmung von Transportvorgängen oder enzymatischen Reaktionen aus, deren Ergebnis die Bildung eines „second messengers“ ist.

Peptide als Liganden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Etwa 1-2 % der kodierenden Säugetier-DNA enthält Informationen über Rezeptorproteine, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören⁴. Ihnen allen ist eine Tertiärstruktur gemeinsam, die sich durch sieben membrandurchspannende Domänen auszeichnet. Diese Domänen werden durch jeweils drei intrazelluläre bzw. extrazelluläre „Loops“ verbunden. Die Aminogruppe befindet sich extrazellulär, die Carboxylgruppe intrazellulär.

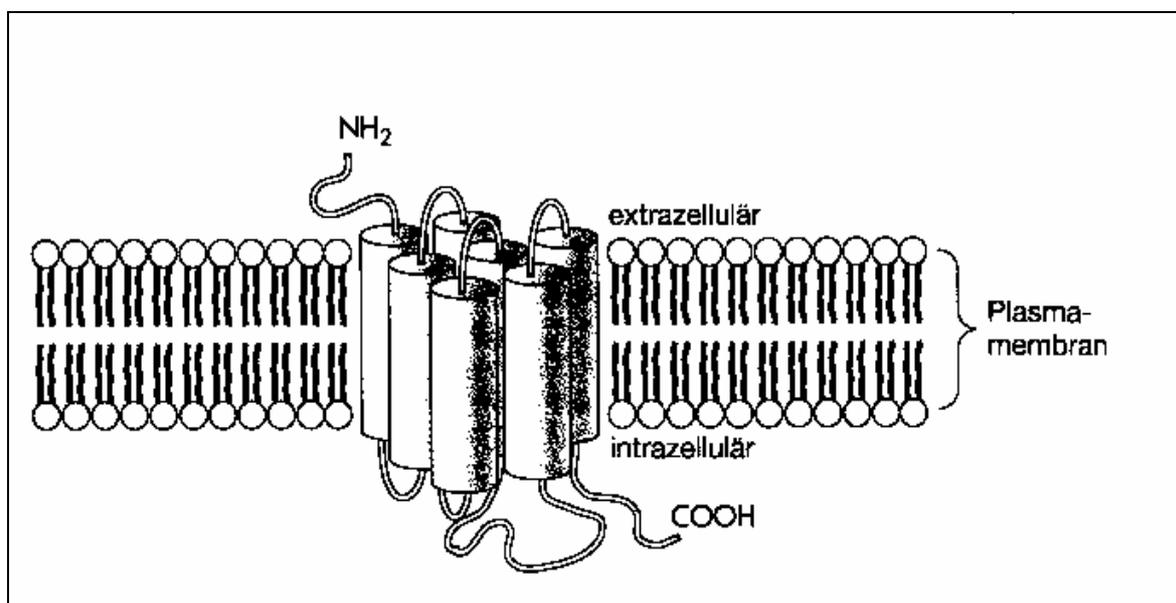


Abb. 1 G-Protein-gekoppelter Rezeptor

Trotz ihres im wesentlichen gleichen strukturellen Aufbaus sind die einzelnen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren fähig, chemisch völlig unterschiedliche Liganden zu binden, und zwar Ionen, Aminosäuren, Lipide, Monoamine, Peptide und Proteine. Während die Bindung kleinerer Moleküle, wie z.B. Monoamine, schon eingehend untersucht worden ist, weiß man über das Bindungsverhalten von Peptiden weitaus weniger^{5,6}.

Peptide sind wesentlich größere und flexiblere Liganden, die wahrscheinlich mit mehreren Stellen ihres jeweiligen Rezeptors interagieren, so dass sich diesbezügliche Studien als komplexer erweisen als solche, die sich mit kleineren Liganden beschäftigen⁴. Ausgehend von einigen Rezeptor-Peptid-Bindungsstudien (NK-1-Rezeptor/Substanz P⁷; AT₁-Rezeptor/Angiotensin II⁸; Y1-NPY-Rezeptor/NPY⁹) läßt sich feststellen, dass die Bindungsstellen für Peptide auf den nach extrazellulär weisenden Anteilen der

transmembranösen Domänen und den extrazellulären Loops liegen. Eine Ausnahme stellt das äußerst kleine Thyrotropin-Releasing-Hormon (3 Aminosäuren) dar, welches, ähnlich wie die Monoamine an ihren jeweiligen Rezeptoren, an tief in der Zellmembran gelegene Stellen der membrandurchspannenden Domänen bindet^{10,11}.

1.2.1 Experimentell ermittelte Bindungspeptide

Neben den physiologischen Liganden gibt es weitere Substanzen, die an einen Rezeptor binden können. Diese können dazu dienen, einen Rezeptor näher zu charakterisieren, z.B. Rezeptor- Subtypen herauszufinden. Aufgrund ihrer agonistischen bzw. antagonistischen Eigenschaften können sie z.T. auch therapeutisch genutzt werden. Während in der Vergangenheit solche Substanzen empirisch gefunden wurden, setzt man heute systematische Methoden ein, z.B. peptidpräsentierende Phagen- bzw. Bakterienbanken.

1.2.1.1 Peptidpräsentierende Phagenbanken¹²

Zur Konstruktion einer solchen Bank werden Nukleotidsequenzen für die an der Phagenoberfläche zu präsentierenden Peptide in das Genom von Oberflächenproteinen eines Ff (F-Pilus abhängigen) filamentösen Escherichia-coli-Bakteriophagen (z.B. M13) inseriert. In der ersten beschriebenen Phagenbank¹³ wurden dazu Genfragmente, die mittels Restriktionsenzymverdau hergestellt worden waren, später dann synthetische Nukleotidsequenzen (randomisierte Oligonukleotide unter Ausschluß nicht codierender Codons), die in ihrer Gesamtheit für alle möglichen Aminosäurekombinationen eines Peptids einer bestimmten Länge codieren, in die Sequenzen von Oberflächenproteinen kloniert. Durch den Einbau in Oberflächenproteine wird eine Oberflächenexpression der Peptide gewährleistet. Eine solche Bank, die Phagen mit jeweils unterschiedlichen Oberflächenstrukturen in einem Medium enthält, wird zu einem fixierten Zielprotein gegeben. Um die Peptide mit der höchsten Affinität zu diesem Zielprotein zu ermitteln, wird nach einer bestimmten Zeit das Medium abgezogen. Phagen, deren Peptide nicht an das Zielprotein binden, werden dabei ebenfalls entfernt. Gebunden bleiben diejenigen Phagen, deren Peptide die gesuchte hohe Affinität zum Zielprotein aufweisen. Da peptidpräsentierende

Phagenbanken die Eigenschaft besitzen, daß codierende DNA-Sequenz und präsentiertes Peptid im selben Partikel vorliegen, ist es möglich, die entsprechende DNA zu klonieren und anschließend ihre Sequenz und damit auch die Aminosäuresequenz des Peptids zu bestimmen. Außerdem können die Phagen, die in einem ersten Versuch an ein Zielmolekül binden, durch Amplifikation in *E. coli* vermehrt und erneut zu dem Zielmolekül gegeben werden. Wiederholt man dies in mehreren Zyklen, selektioniert man die Peptide mit der höchsten Affinität zum Zielmolekül aus einem großen Pool heraus. Dies wird als „Panning“ bezeichnet.

Der Einbau von Nukleotidsequenzen in das Phagen genom hat Einfluß auf das biologische Verhalten der Phagen und deren Wirtszellen, da ein verändertes Phagen genom andere Ansprüche an den Synthese- und Exportapparat der Wirtszelle stellt¹⁴. Um dieses Problem, zumindest in Bezug auf den Export zu umgehen, wurde in letzter Zeit auch mit lytischen Phagen gearbeitet, die für ihren Export nicht auf die Membran der Wirtszelle angewiesen sind, da sie diese auflösen¹⁵.

1.2.1.2 Peptidpräsentierende Bakterienbanken: die FliTrx™ Random Peptide Library¹⁶

Eine Alternative zu den peptidpräsentierenden Phagenbanken stellt die peptidpräsentierende Bakterienbank FliTrx™ dar. Hier werden Peptide im Kontext eines Fusionsproteins auf der Oberfläche von *E.-coli*-Bakterien präsentiert. Zu diesem Zweck wurde in das auf einem Plasmid gelegene Gen für Flagellin (*fliC*), welches den Hauptbestandteil der Flagellen darstellt, das Gen für (normalerweise intrazellulär gelegenes) *E.-coli*-Thioredoxin (*trxA*) inseriert. Thioredoxin besitzt einen nach außen weisenden Molekülteil, der als „active site loop“ bezeichnet und durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Die Nukleotidsequenzen ($1,77 \times 10^8$ verschiedene Klone) einer randomisierten Dodekapeptidbank wurden so in das *TrxA*-Gen eingebaut, dass die resultierenden Peptide genau innerhalb des active site loops, also in einem strukturellen Kontext, exprimiert werden (und nicht N-terminal wie bei den Phagenbanken).

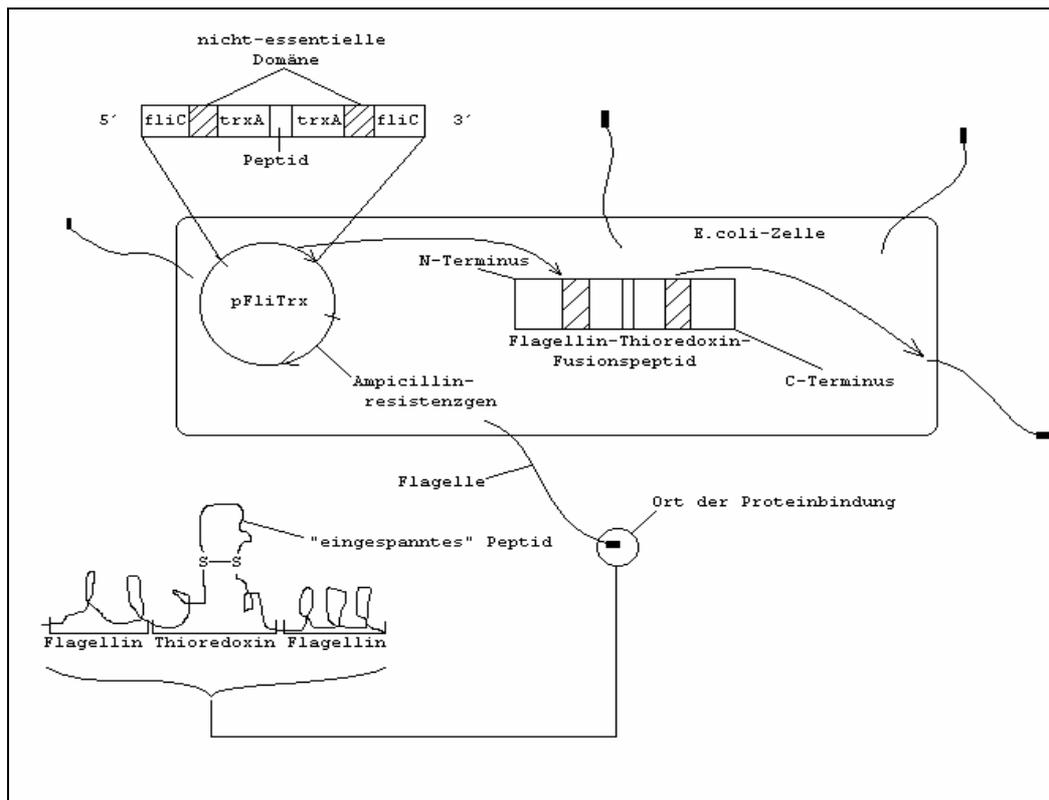


Abb. 2 Konstruktionsschema der FliTrx™ Random Peptide Library

Dieser definierte räumliche Kontext ist einer der wesentlichen Vorteile der FliTrx™-Bank. Auch diese Bank eignet sich zum „Panning“ (s.o.), allerdings entfällt die Amplifikation der Phagen in Wirtszellen, da die Bakterien selbst in Kultur vermehrt werden können. Außerdem bietet diese Bank den Vorteil einer hohen Expressionsrate. So gehen die Erstbeschreiber davon aus, dass mehr als 90 % der jeweiligen Fusionspeptide in funktionellen Flagellen eingebaut werden, und dass diese einen Anteil von 10 - 20 % des Gesamtproteins der Zellen ausmachen¹⁷.

Um sicherzustellen, daß alle Fusionspeptide zum gleichen Zeitpunkt präsentiert werden und um Plasmiddeletionen und Rearrangements zu vermeiden, besitzt die FliTrx™-Bank folgenden Regulationsmechanismus:

Das Plasmid, das die genetische Information für die FliTrx - Fusionspeptide enthält, pFliTrx™, enthält den P_L -Promotor des Bakteriophagen λ , um die Expression zu starten. Dieser Promotor ist einer der effizientesten Promotoren in Bezug auf bakterielle Expression und wird seinerseits durch den Bakteriophagen- λ -cI-Repressor reguliert, welcher an die Operatorregion vor dem P_L -Promotor bindet und so die Transkription von diesem Promotor

aus verhindert. Auch die Expression des cI-Repressors wird reguliert: die E.-coli-Zellen, die bei dieser Bank verwendet werden (GI826), enthalten das Gen für den cI-Repressor auf ihrem Bakterienchromosom, wo es unter der Kontrolle des trp-Promoters steht. Vor diesem gibt es wiederum eine trp-Operatorregion, an die ein trp-Repressor binden kann. Wachsen die Zellen in tryptophanfreiem Medium, wird das cI-Repressorgen transkribiert, das cI-Repressorprotein bindet an den Operator vor dem P_L-Promotor und verhindert so die Transkription der Fusionspeptide. Deren Expression wird induziert durch Zugabe von Tryptophan, so dass ein Tryptophan/trp-Repressor-Komplex entsteht. Dieser bindet an den trp-Operator, unterbindet die Expression des cI-Repressors und erlaubt so die Transkription vom P_L-Promotor aus.

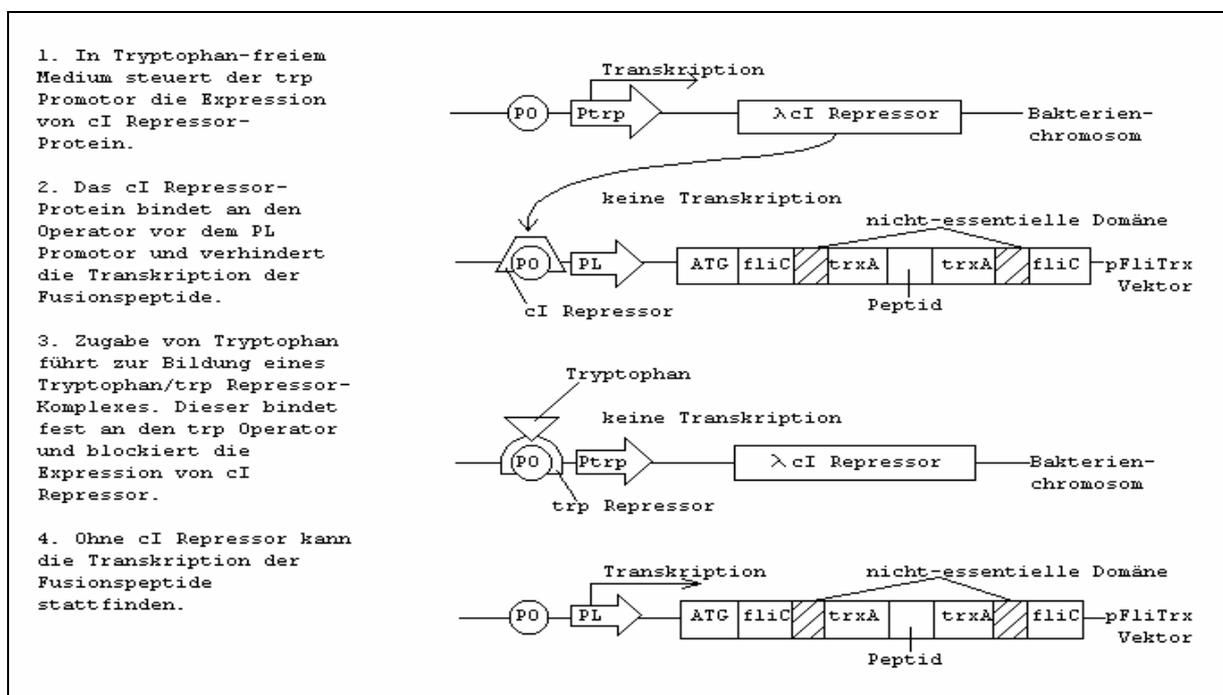


Abb. 3 Induktion der Peptidexpression durch Tryptophan

In dieser Arbeit wurde die FliTrxTM-Bank dazu benutzt, Peptide zu ermitteln, die mit hoher Affinität an den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor binden.

1.3 Die Adenosinrezeptoren-Familie

1.3.1 Nomenklatur^{18,19}

1929 beschrieben Drury und Szent-Györgyi verschiedene kardiovaskuläre Effekte des Adenosins²⁰. Im Laufe der Zeit wurde deutlich, daß diese Effekte über Adenosinrezeptoren vermittelt werden. Adenosinrezeptoren zählen zu den Purinrezeptoren. Sie werden auch als „P1-Rezeptoren“ bezeichnet und damit von den P2-Rezeptoren abgegrenzt, die die Wirkung von ATP und verwandten Nukleotiden vermitteln.

Schon vor der Einführung rekombinanter Techniken wurden Adenosinrezeptor-Subtypen mit Hilfe pharmakologischer Methoden (Affinitätsrangfolgen von Agonisten bzw. Antagonisten) charakterisiert. Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden ließ sich die Existenz von drei vorhergesagten Subtypen bestätigen, außerdem wurde ein bis dahin unbekannter Subtyp identifiziert. Diese bis jetzt bekannten Adenosinrezeptor-Subtypen werden als A₁-, A_{2a}-, A_{2b}- und A₃-Rezeptor bezeichnet.

1.3.2 Rezeptorverteilung

Alle vier Rezeptor-Subtypen konnten kloniert und ihre Basensequenz ermittelt werden (s. Abb. 4). Damit ist es möglich, durch Analyse der Transkriptionsraten in den verschiedenen Geweben und den Einsatz der in situ Hybridisierung Aussagen hinsichtlich der Verteilung der Subtypen im menschlichen Körper zu machen.

A₁-Transkripte (2,9 kb) finden sich in Gehirn, Herz, Niere, Lunge und Hoden, wobei die höchste Transkriptionsrate im Gehirn beobachtet wird. Außerdem wird bei der Analyse von Hirngewebe noch eine zweite, schwächere Bande (4,3 kb) festgestellt²¹. A_{2a}-Transkripte (2,8 kb) kommen ebenfalls vor in Gehirn, Herz, Niere und Lunge. Die in situ Hybridisierung in Bezug auf das Gehirn zeigt ein Vorkommen in Nucleus caudatus, Putamen, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium. Die Expression findet in mittelgroßen Neuronen statt, die auch (Dopamin-)D₂-Rezeptoren und Enkephalin exprimieren^{22,23}. Dagegen ist die Expression des A₁-Rezeptors nicht so sehr lokalisiert, sie findet im gesamten Kortex,

Hippocampus und Kleinhirn statt²³. Für den A_{2b}-Rezeptor existieren zwei Transkripte (1,7 und 2,1 kb), seine Expression läßt sich in Gehirn, Herz, Lunge und besonders im Dickdarm, nicht aber in der Niere nachweisen¹⁸. Der A₃-Rezeptor schließlich weist ein völlig anderes Verteilungsmuster auf: die höchste Transkriptionsrate findet sich in Lunge und Leber, etwas weniger in Gehirn und Aorta, am wenigsten in Herz und Hoden¹⁸.

I							
A3	MPNNSTALSL	ANVTYITMEI	FIGLCAIVGN	VLVICVVKLN	PSLQITTFYF		50
A1	MPPSISAFQA	A...YIGIEV	LIALVSVFGN	VLVIWAVKLN	QALRDATHCF		47
A2a	MP.....IM	GSSVYITVEL	AIWVLAAILGN	VLVCWAVVLN	SNLQNVTFYF		44
A2bMLLET	QDAILYVALET	VIALVSVVGN	VLVCAAVGTA	NILQVTFNYF		45
II				III			
A3	IVSLAIAADIA	VGVLVMPPLAI	VVELGITHIF	YSCLEMTCLL	LITTHASIMS		100
A1	IVSLAVADVA	VGALVIPLAI	LINIGPQTFE	HCILWACEV	LILTQSSILA		97
A2a	VVSLAAADIA	VGVLAIFFAI	TISIGFCAAC	HGCLFIACFV	LVLTOSSIFS		94
A2b	LVSLAAADVA	VGLFAIFFAI	TISLGFCTIE	YGCLHIACFV	LVLTOSSIFS		95
IV							
A3	LLAIAVDRYL	RVKLTVRYNR	VITHRNIIWA	LGLCWLVSFL	VGLTPMFGWN		150
A1	LLAIAVDRYL	RVKIPLRYNM	VVTHRRAAVA	IAGCWILSFV	VGLTPMFGWN		147
A2a	LLAIAVDRYI	AIRIPLRYNG	LVTGTRANGI	IACWVLSFA	IGLTPMLGWN		144
A2b	LLAIAVDRYL	AICVPLRYKS	LVTGTRANGV	IADVWVLAEG	IGLTFPLGWN		145
V							
A3	MK....LTSE	YHRMVFLLSC	QVVS.....	VMRDYMVYF	SRLTRIFDPI		190
A1	NL....SAVE	RAWAANGSNG	EPYIKCEFEK	VISMVMVYF	NFFVWVLPPI		193
A2a	NC....GQPK	EGKMSOGQG	EGQVACLFEF	VVPMVMVYF	NFFACVLPPI		190
A2b	SKDSATNMCT	EPWDGTTNES	CCIVKCLFEN	VVPMVMVYF	NEEGCVLPPI		195
A3	VVMCAIYLDI	FYIIRNLSL	NLSNSKETGA	FY...GREFK	TAKSLGIVLF		237
A1	LLMVIYILEV	FYIIRNQLNK	KVSASSGDPO	KY...GKELK	IAKSLALILE		241
A2a	LLMIGVYLDI	FIAARRQLKQ	MESQPLPGER	ARSTLQKQVH	AAKSLAIVG		240
A2b	LIMLVYIINI	FIVACROLQ	...RTEIMDH	SRTLQREIH	AAKSLAMIVG		241
VI				VII			
A3	LFALSWLPLS	IINCIIYFNG	...EVPQLV	IYMGILLSHA	NEMMNPPIYA		283
A1	LFALSWLPLH	IINCITLFCF	..SCHKPSIT	TYIAIFITNG	NSAMNPPIYA		289
A2a	LFALCWLPFH	IINCITLFCF	.DCSHAPLW	MYLAIVLSET	NSVVNPIYA		289
A2b	IFALCWLEVF	AVNCVTLFCF	AQGKNKPKWA	ENKAILLSHA	NSVVNPIYA		291
A3	YKIKKKEKY	ILILKACVVC	HFSDSIDTSI	EKNSE			318
A1	FRICKFRVTF	LKIWNDFEFC	QFAPPEEDL	PEERPDD			326
A2a	YRIRFRCTF	KKIRSHVLR	QREFFKAAGT	SARVLAHGS	DGEQVSLRLN		339
A2b	YRNSDFRVTE	KKISRYLIC	QADVKSNGQ	AGVQPALGVG	L		332
A2a	GHPPGVWANG	SAPHPERRPN	GYALGLVSGG	SAQESQGNTG	LPDVELLSHE		389
A2a	LKGVCEPPPG	LDDFLAQDGA	GVS				412

Abb. 4 Sequenzen der vier humanen Adenosin-Rezeptoren

1.3.3 Rezeptor-Effektor-Kopplung²⁴

Alle vier Mitglieder der Adenosinrezeptor-Familie gehören zu der oben beschriebenen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Wie in Tabelle 1 zu erkennen, können sie zum Teil mit verschiedenen G-Proteinen interagieren. Für den A₁-Rezeptor konnte dies für Pertussistoxin-sensitive G-Proteine, besonders G_{iα1,2,3} und G_{oα}²⁵, gezeigt werden. Ungeklärt ist, ob er mit G_q-Proteinen (nicht Pertussistoxin-sensitiv) interagiert. Sicher jedoch ist, dass es für den A₁-Rezeptor mindestens drei Effektorsysteme gibt: Adenylatcyclase, Phospholipase C und Kaliumkanäle^{26,27}. Der A_{2a}-Rezeptor aktiviert über ein G_{sα}-Protein die Adenylatcyclase, ebenso der A_{2b}-Rezeptor. Letzterer kann über dieses Protein auch Calciumkanäle öffnen. Schließlich konnte für den A₃-Rezeptor eine Interaktion sowohl mit G_{iα2}- als auch G_{iα3}-Proteinen nachgewiesen werden²⁸, es kommt zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und einer Aktivierung der Phospholipase C.

Tabelle 1 Rezeptor-Effektor-Kopplung²⁴

Rezeptor	G-Protein	Effektor	Effekt (Aktivierung: + Inaktivierung: -)
A ₁	G _{iα1, 2, 3}	Adenylatcyclase	-
	G _{qα} ?	Phospholipase C	+
	G _{oα} ?	K ⁺ -Kanäle	+
A _{2a}	G _{sα}	Adenylatcyclase	+
A _{2b}	G _{sα}	Adenylatcyclase	+
		Ca ⁺⁺ -Kanäle	+
A ₃	G _{iα2, 3}	Adenylatcyclase	-
		Phospholipase C	+

1.3.4 Kardiovaskuläre Effekte^{29,30,31}

Die durch Adenosin bedingten kardiovaskulären Effekte können in zwei Gruppen eingeteilt werden: in direkte und indirekte Effekte. Direkte Effekte treten auf ohne vorherige

Stimulation durch Katecholamine. Dazu gehören (1) negative Chronotropie, (2) negative Dromotropie, (3) negative atriale Inotropie und (4) koronare Vasodilatation. Während die ersten drei (supraventrikulären) Effekte durch A_1 -Rezeptoren unter Einbeziehung von Kaliumkanälen vermittelt werden, wird für die koronare Vasodilatation die Existenz von A_2 -Rezeptoren (A_{2a} und A_{2b}) sowohl auf glatten Gefäßmuskelzellen als auch auf Endothelzellen verantwortlich gemacht. Dabei vermitteln die Endothel-assoziierten A_2 -Rezeptoren die Freisetzung von NO, welches seinerseits zur Gefäßrelaxation beiträgt.

Auf der anderen Seite existieren indirekte Adenosin-Effekte, die erst nach vorangehender Erhöhung des cAMP-Gehaltes im entsprechenden Gewebe zum Tragen kommen. Dabei kann die Erhöhung des cAMP durch Katecholamine, aber auch durch andere geeignete Substanzen wie Forskolin oder Phosphodiesterasehemmer erfolgen. Ein Beispiel für einen indirekten Adenosin-Effekt ist die negativ inotrope Wirkung an ventrikulärer Herzmuskulatur, deren cAMP-Gehalt durch Katecholamingabe erhöht wurde³². Über A_1 -Rezeptoren und anschließend über inhibitorische G-Proteine bewirkt Adenosin eine Aktivitätssenkung der Adenylatcyclase. Dies führt zu einem cAMP-Abfall, der die positiv inotrope Wirkung der zuvor gegebenen Katecholamine reduziert. An ventrikulärer Herzmuskulatur, die zuvor nicht mit Katecholaminen behandelt wurde, hat Adenosin keinen negativ inotropen Effekt.

A_2 -Rezeptoragonisten weisen über eine Aktivitätssteigerung der Adenylatcyclase einen positiv inotropen Effekt auf ventrikuläre Myozyten von Hühner-Embryonen auf, wenn man die A_1 -Rezeptoren durch selektive Antagonisten blockiert³³. Dieser Effekt tritt im Vorhofmyokard nicht auf, so dass davon auszugehen ist, daß A_2 -Rezeptoren in der ventrikulären, nicht aber in der atrialen Herzmuskulatur vorkommen. Bisher nicht geklärt ist die Frage, ob es sich dabei um A_{2a} - oder A_{2b} -Rezeptoren handelt. Möglicherweise ist das Vorhandensein stimulatorischer A_2 -Rezeptoren die Erklärung für die fehlende direkte negativ inotrope Wirkung von Adenosin im Bereich der Ventrikel.

Die Existenz des A_3 -Rezeptors im Herzen schließlich ist aufgrund verschiedener Studien wahrscheinlich, seine physiologische Rolle jedoch bislang noch unklar.

1.3.5 Pathophysiologische Bedeutung

Eine Reihe pathophysiologischer Vorgänge scheint ebenfalls über Adenosinrezeptoren vermittelt bzw. beeinflusst zu werden. Diskutiert werden unter anderem eine Rolle im Zusammenhang mit chronischen Schmerzen³⁴, Entzündungen³⁵, Diabetes mellitus³⁶, Drogen-Mißbrauch³⁷, Schlafstörungen³⁸ und Angina pectoris³⁹.

1.3.6 Peptide als Liganden am Adenosin_{2a}-Rezeptor

Mit Hilfe der oben beschriebenen Bakterienbank sollten in dieser Arbeit Liganden für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor ermittelt werden. Durch Phagen- oder Bakterienbanken gefundene Peptide wurden schon für eine Reihe von Rezeptoren, deren Liganden auch in vivo Peptide sind, gewonnen.⁴⁰ Auch für die intrazellulär gelegenen Steroid-Rezeptoren war es möglich, Peptide als Liganden zu ermitteln.⁴¹ In dieser Arbeit sollte exemplarisch gezeigt werden, dass es auch für einen membranständigen Rezeptor, dessen Liganden in vivo Nicht-Peptide (hier: Purine) sind, möglich ist, Peptid-Liganden zu gewinnen,

2 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, Liganden für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor zu finden. Zu diesem Zweck wurde die peptidpräsentierende Bakterienbank FliTrx™ eingesetzt .

Die DNA der Bakterien, die aufgrund entsprechender Oberflächenpeptide eine hohe Affinität zum immobilisierten Rezeptor aufwiesen, sollte präpariert und sequenziert werden, um die Aminosäurefolge der zugehörigen Bindungspeptide zu bestimmen.

Ein weiteres Ziel war es, diese Peptide zu synthetisieren, um sie hinsichtlich ihrer Ladungseigenschaften und ihres Bindungsverhaltens mit der Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse zu charakterisieren.

Schließlich wurde der Einfluss dieser Peptide auf den koronaren Fluss am isolierten Mäuseherzen unter Verwendung der Langendorff-Technik untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die verwendeten Chemikalien wurden über die Hochschullieferung in p.a.-Qualität bezogen. Der humane Adenosin_{2a}-Rezeptor (hA_{2a}-Rezeptor) wurde von M. Broad, University of Virginia, mit folgender Konzentrationsangabe zur Verfügung gestellt:

hA_{2a}-Rezeptor: 94µg in 170 µl NaCl/Hepes – Lösung , pH=7,4

Als peptidpräsentierende Bakterienbank kam die FliTrxTM Random Peptide Library (Invitrogen[®]) zum Einsatz.

Zum Sequenzieren wurde der FQ3 Sequenzer (Hoefer[®]) und das T⁷SequencingTM Kit (Pharmacia[®]) verwendet.

Die Peptide wurden mit dem Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems[®], die Bindungsstudien mit dem Gerät Biacore[®] X (Biacore[®]) durchgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Selektionieren der FliTrxTM Random Peptide

Library gegen den hA_{2a}-Rezeptor¹⁶

3.2.1.1 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden vor dem „Panning“ hergestellt:

<u>10x M9 Salts</u>	60 g Na ₂ HPO ₄
	30 g KH ₂ PO ₄
	5 g NaCl
	10 g NH ₄ Cl in 900ml aqua bidest
	eingestellt auf pH=7,4 mit 10 M NaOH, ad 1l, autoklaviert
	(Lagerung bei Raumtemperatur)

<u>1 M MgCl₂</u>	20,33 g MgCl ₂ in 100 ml aqua bidest, autoklaviert (Lagerung bei Raumtemperatur)
<u>100 mg/ml Amp</u>	1 g Ampicillin in 10 ml aqua bidest gelöst und steril filtriert, aliquotiert (je 1 ml) (Lagerung bei – 20° C)
<u>50 %ige Glucoselsg.</u>	50 g Glucose in 100 ml aqua bidest gelöst und steril filtriert (Lagerung bei Raumtemperatur)
<u>10 mg/ml Trp</u>	100 mg L-Tryptophan in 10 ml aqua bidest gelöst und steril filtriert, aliquotiert (je 1 ml) (Lagerung bei + 4° C)
<u>5 M NaCl</u>	autoklaviert (Lagerung bei Raumtemperatur)
<u>20 %ige α-Methyl- mannosidlösung</u>	steril filtriert (Lagerung bei Raumtemperatur)
<u>IMC Medium</u> (Induktionsmedium) - für 1 l -	1 x M9 Salts 0,2 % Casein (Tryptophan-frei) 0,5 % Glucose 1 mM MgCl ₂ 100 µg/ml Ampicillin 2 g Casein wurden in 885 ml Wasser gelöst, autoklaviert, dann die restlichen Komponenten zugegeben (Lagerung bei + 4° C, 1 Monat haltbar)

RM Medium

- für 1 l -

1 x M9 Salts
2 % Casein
1 % Glycerin
1 mM MgCl₂
100 ug/ml Ampicillin

20 g Casein, 10 ml Glycerin und 880 ml Wasser wurden autoklaviert, anschließend die anderen Komponenten hinzugefügt (Lagerung bei + 4° C, 1 bis 2 Wochen haltbar)

RMG-Amp Platten

- für 1 l -

1 x M9 Salts
2 % Casein
0,5 % Glucose
1 mM MgCl₂
100 ug/ml Ampicillin
1,5 % Agar

20 g Casein, 15 g Agar und 875 ml Wasser wurden autoklaviert, dann die restlichen Komponenten zugegeben und die Mischung in 100 mm Platten gegossen.

Nach dem Aushärten des Agars wurden die Platten umgedreht. (Lagerung bei + 4° C in Dunkelheit, 1 bis 2 Wochen haltbar)

Blocking Solution

IMC Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
1 % Magermilchpulver
150 mM NaCl
1 % α-Methylmannosid
(immer frisch angesetzt)

Wash Solution

IMC Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
1 % α-Methylmannosid
(immer frisch angesetzt)

0,1 M Glycin mit HCl auf pH=2,2 eingestellt, steril filtriert
(Lagerung bei Raumtemperatur)

3.2.1.2 Protokoll des „Panning“ (Wiederholte Selektion gegen ein immobilisiertes Protein)

3.2.1.2.1 Übersicht

Tabelle 2 Protokoll des Pannings

Tag	Schritt	Tätigkeit
1	1	Anzüchten der Bakterienkultur
2	2	Erstes Panning: Induktion der FliTrx™ Bank
	3	Immobilisierung des hA _{2a} -Rezeptors
	4	Zugabe der induzierten FliTrx™ Bank zum Rezeptor
	5	Entfernen der ungebundenen Zellen
	6	Elution der gebundenen Zellen durch Scherkraft, Adenosin bzw. Säure
	7	Anzüchten einer neuen Bakterienkultur aus den eluierten Zellen
	3	8
4	9	Drittes Panning
5	10	Viertes Panning
6	11	Fünftes Panning
7	12	Ausplattieren der nach dem fünften Panning eluierten Zellen, um Einzelkolonien zu erhalten
8	13	Isolation von Plasmid-DNA aus Einzelkolonien und deren Sequenzierung

3.2.1.2.2 Anzüchten der Bakterienkultur

50 ml IMC Medium wurden mit Bakterien aus einem Vial FliTrx™ Bank versetzt und über Nacht 15 Stunden bei + 25°C inkubiert.

3.2.1.2.3 Induktion der peptidpräsentierenden Bakterienbank

Nach den 15 Stunden wurde die Zellzahl eines 1:10 verdünnten Aliquots durch Messung der OD₆₀₀ bestimmt (1 OD₆₀₀ = 10⁹ Zellen), 10¹⁰ Zellen zu 50 ml IMC Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) gegeben und die Expression der FliTrx™ Bank durch Zugabe von 100 µg/ml Tryptophan induziert. Die Zellen wurden danach 6 Stunden bei 25°C inkubiert, anschließend wiederum die OD₆₀₀ ermittelt.

3.2.1.2.4 Immobilisieren des hA_{2a}-Rezeptors

In der Zwischenzeit wurde eine 60 mm Kulturplatte mit 1 ml einer hA_{2a}-Rezeptorlösung der Konzentration 20 µg/ml beschichtet und für eine Stunde bei 50 rpm auf einen Schüttler gestellt. Danach wurde die Rezeptorlösung abgezogen (und für weitere Selektionen bei – 20°C aufbewahrt), die Platte mit 10 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach dem Abziehen des Wassers wurde die Platte mit 10 ml Blocking Solution beschichtet und 1 Stunde bei 50 rpm geschüttelt.

3.2.1.2.5 Selektion der induzierten Zellen

Nach der 6 stündigen Inkubation wurden 0,5 g Magermilchpulver, 1,5 ml 5M NaCl und 2,5ml 20 %ige α-Methylmannosid-Lösung zu den 50 ml induzierten Zellen gegeben. Endkonzentration: 1 % Magermilchpulver, 150 mM NaCl, 1 % α-Methylmannosid. (α-Methylmannosid verhindert die Bildung Fimbrien tragender E. coli. Fimbrien tragende E. coli könnten sich aufgrund von lektinartigen Wechselwirkungen an das Zielprotein binden und so zu falsch positiven Ergebnissen führen.)

Die Blocking Solution wurde von der Kulturplatte entfernt und 10 ml der induzierten Zellen hinzugegeben. Zunächst wurde diese Platte 1 Minute bei 50 rpm geschüttelt, anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. An dieser Stelle war es wichtig, keine übermäßigen Scherkräfte auf die Platte einwirken zu lassen, was über das Abreißen von Flagellen zum Verlust positiver Klone geführt hätte.

Nach dem Entfernen der Bakterienkultur (d.h. der ungebundenen Zellen) wurde die Platte mit 10 ml Wash Solution 5 Minuten bei 50 rpm gewaschen. Die Waschlösung wurde entfernt und dieser Waschschrift viermal wiederholt. Nachdem die Wash Solution zum fünften Mal entfernt worden war, wurden die (gebundenen) Zellen eluiert: je nach Versuchsreihe mit Hilfe von Scherkräften (durch Vortexen über 30 Sekunden und Aufnahme der Zellen in der verbliebenen Wash Solution), durch Zugabe von 1ml 0,1 M Glycin pH 2,2 oder von 2 ml 10 mM Adenosin.

3.2.1.2.6 Anzüchten einer Bakterienkultur aus den eluierten Zellen

Zu den eluierten Zellen wurden 10 ml IMC Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) gegeben. Diese 10 ml Kultur wurde 15 Stunden bei 25°C unter Schütteln (225-250 rpm) inkubiert. Aus dieser Kultur wurden wiederum 10^{10} Zellen zu 50 ml IMC Medium gegeben und sämtliche Schritte ab der Induktion viermal wiederholt.

3.2.1.2.7 Isolierung positiver Klone

Nach dem fünften Panning wurden die eluierten und in 10 ml IMC Medium suspendierten Zellen auf RMG Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert.

3.2.2 DNA – Präparation

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim et al.⁴² präpariert. Für jeweils einen Klon wurde eine Übernachtskultur mit 5 ml RM-Medium angesetzt und bei 30° C unter Schütteln (225-250 rpm) inkubiert, bis eine $OD_{600} = 2,0$ bis $3,0$ erreicht war. 2 ml dieser Kultur wurden im Eppendorf®-Cup 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden erneut 2 ml Kultur gegeben, 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbleibenden 1 ml Kultur wurden zu Glycerin-Stocks weiterverarbeitet. Das Pellet wurde in 100 µl Resuspensionspuffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH=8,0 , 10 mM EDTA, pH=8,0) suspendiert und 5 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl Lysis-Mix (0,2 N NaOH, 1% SDS) und eine Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Anschließend wurden 150 µl 3M KOAc, pH=4,8 hinzugefügt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und 15 Minuten bei + 4° C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (ca. 500 µl) wurde phenolisiert (250 µl CHCl₃ , 250µl Tris-gesättigtes Phenol) und 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert, die obere Phase in ein neues Eppendorf®-Cup überführt, mit 500 µl CHCl₃ versetzt und wiederum 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde die obere Phase in ein weiteres Eppendorf®-Cup gegeben, das doppelte Volumen 100 % Ethanol (-20° C)zugefügt, 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 Minuten bei + 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol (-20° C) gewaschen und 2 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Zur weiteren Reinigung wurde die Lösung mit 1 µl RNase (10 mg/ml) versetzt, 30 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 20 % PEG, 2,5 M NaCl gefällt. Nach einer Inkubation von 60 Minuten auf Eis und 10 Minuten Zentrifugation (14.000 rpm) bei +4° C wurde das Pellet mit 70 % Ethanol (-20° C) gewaschen und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden nach der Methode von Sanger et al.⁴³ unter Verwendung des ³⁵S Sequencing™ Kits (Pharmacia®) und [α -³⁵S]dATP (DuPont®) durchgeführt.

3.2.3.1 Vorbereitung des Gels

Es wurde ein 5 %igen Polyacrylamid-Gel verwendet. Dazu wurden 20 ml Acrylamidmix (19g Acrylamid, 1g Bisacrylamid ad 100 ml H₂O) mit 60 ml Harnstoffmix (56 g Harnstoff ad 100ml 1,3× TBE) gemischt, durch ein Sterifilter gegeben, 40 µl TEMED und 400 µl 10 % APS hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde blasenfrei zwischen zwei Glasplatten gegeben, die durch 0,2 mm Seiten-Spacer getrennt und durch Klammern und Tape abgedichtet waren.

Die Platten waren zuvor mit 0,1 % SDS, H₂O, 0,5 % NaOH, H₂O und 100 % Ethanol gereinigt, eine von beiden mit Repel-Silane vorbereitet worden. Nach dem Einsetzen eines 0,2 mm breiten Spacers erfolgte die Aushärtung in horizontaler Lage über Nacht.

3.2.3.2 Annealing der Primer an doppelsträngige DNA

Zu 5 µl DNA (=2 µg) wurden 2 µl 2 M NaOH und 3 µl H₂O gegeben, gevortext, kurz zentrifugiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 3 µl 3 M NaOH, 7 µl H₂O und 60 µl 100 % Ethanol hinzugefügt, 15 Minuten bei - 70° C gefällt und 15 Minuten bei + 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in 10 µl H₂O aufgenommen. Hierzu wurden 2µl Annealing Buffer und 2 µl FliTrx™ Forward Primer gegeben, gevortext, zentrifugiert und 20 Minuten bei + 37° C, anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3.3 Labelling Reaction

Zu den 14 µl Ansatz wurden 6,5 µl eines Mixes aus 3µl Labelling-Mix (dCTP, dGTP, dTTP), 1µl [α -³⁵S]dATP und 2,5 µl verdünnter T7-Polymerase (0,5 µl T7-Polymerase + 2 µl Dilution Buffer) gegeben, vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3.4 Termination Reaction

In vier Eppendorf®-Cups wurden je 2,5 µl des A, G, C bzw. T Mix-Long pipettiert und 4,4 µl Labelling-Ansatz hinzugefügt, gemixt, 5 Minuten bei + 37° C inkubiert und je 5 µl Stop Solution hinzugegeben. Die vier Cups wurden 2 Minuten bei + 80° C inkubiert und schließlich auf Eis abgekühlt.

3.2.3.5 Elektrophorese

Das ausgehärtete Gel wurde in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut, Puffer (1× TBE) eingefüllt, der Spacer entfernt und ein Vorlauf über 45 Minuten bei 40 W gestartet. Anschließend wurde ein Haifisch-Kamm eingesetzt, die Ladetaschen mit Puffer gespült, die denaturierten Proben in der Reihenfolge AGCT aufgetragen und die Elektrophorese bei 40 W gestartet. Beendet wurde sie, wenn die Bromphenolblau-Front gerade das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.3.6 Autoradiographie und Analyse

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier überführt, mit Plastikfolie abgedeckt und auf dem Vakuumtrockner getrocknet. Das auf dem Papier getrocknete Gel wurde in eine Filmkassette gelegt, nachdem die Plastikfolie entfernt worden war. Anschließend wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach einer Belichtungszeit von zwei Tagen wurde der Röntgenfilm entwickelt und die Sequenz gelesen.

3.2.4 Peptidsynthese

Folgende Bindungspeptide wurden synthetisiert:

Tabelle 3 Synthetisierte Peptide

Bezeichnung	AS-Sequenz
P 1	LSFIRQLGRRYR
P 2	TRPTLTWNRVRL
P 3	RCFLRIHRRLSR
P 4	TTISLVACLEVW
P 5	FLVRALVVYPER
P 6	GERATRWINRPI
P 7	RRVIFQWMVVAT
P 8	GRRRFGISVYHR

3.2.4.1 Festphasen-Peptidsynthese

Die Synthese der zu untersuchenden Bindungspeptide erfolgte nach der Methode der Festphasen-Peptidsynthese^{44,45,46,47} im BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Es wurde der Peptidsynthesizer 433 A der Firma Applied Biosystems[®], Weiterstadt eingesetzt.

Anschließend erfolgte die Abspaltung der Peptide vom Synthese-Harz und die Reinigung der Rohpeptide.

3.2.4.2 Abspaltung des Peptids vom Synthese-Harz

Zur Abspaltung der Peptide vom Synthese-Harz wurde das Harz/Peptid-Gemisch in eine Chromographiesäule mit eingebauter Glasfritte gefüllt. Hier wurde es dreimal mit 10 ml NMP gewaschen, bevor 6 ml eines für 15 Minuten auf Eis gekühlten Abspaltungsgemisches (10 ml TFA, 0,25 ml Ethandiol, 0,5 ml Thioanisol, 0,75 g Phenol, 0,5 ml H₂O) zugegeben wurden. Das Gemisch wurde unter Schütteln 120 Minuten mit dem Abspaltungsgemisch inkubiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel in einen Erlenmeyer-Kolben filtriert (Produkt) und das Harz noch einmal mit 2 bis 3 ml das Abspaltungsreagenzes für 15 Minuten geschüttelt und dann filtriert. Die Peptide wurden aus den vereinigten Filtraten durch Zugabe des vier- bis fünffachen Volumens Diethylether (- 20° C) gefällt, eine Stunde auf Eis zur Vervollständigung der Fällung inkubiert und anschließend 15 Minuten bei + 4° C mit 9.000 rpm im Corexröhrchen zentrifugiert. Das Pellet wurde mehrmals mit Diethylether (- 20° C) suspendiert und abzentrifugiert, bis das Pellet weiß und weitgehend geruchsneutral war. Anschließend wurde das Pellet 10 Minuten an der Luft getrocknet und in 10 ml H₂O gelöst, bei -80° C eingefroren und lyophyllisiert. Lösten sich die Peptide nicht in Wasser, konnten sie durch Zugabe von maximal 30 Vol.% Acetonitril in Lösung gebracht werden.

3.2.4.3 Reinigung des Rohpeptids

Die Reinigung und Entsalzung des Rohpeptids erfolgte mit Hilfe von Einweg-Chromatographiesäulen (Amprep™ der Firma Amersham Life Science®).⁴⁸

3.2.5 Bindungsstudien

3.2.5.1 Biacore®-Messungen

Das Bindungsverhalten der Peptide wurde mit Hilfe des Gerätes Biacore® X der Firma Biacore® charakterisiert.⁴⁹ Eine Erläuterung des zu Grunde liegenden Prinzips der Oberflächenplasmonenresonanz erfolgt im Ergebnisteil.

40 ng des humanen Adenosin_{2a}-Rezeptors wurden auf einem F 1-Chip immobilisiert (Δ RU=2400). Die Peptide wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1000 μ M.

3.2.5.2 Scatchard Plot

Die Affinitätskonstanten im Gleichgewicht (unmittelbar vor Stop der Peptidlösung) wurden durch Scatchard Plots bestimmt. In der Auftragung nach Scatchard wird als Abszisse die Menge an gebundenem Peptid, als Ordinate der Quotient aus gebundenem und freiem Peptid aufgetragen. Die Steigung der resultierenden Durchschnittsgeraden ist $-1/K_D$. Als Maßeinheit für das gebundene Peptid wird RU verwendet, für das freie Peptid die Konzentration [M] der zugeführten Peptidlösung. Bei der Berechnung der Affinitätskonstanten errechnet sich durch Kürzung ein Wert mit der Einheit [M].

3.2.6 Funktionelle Studien

Der Einfluß der Peptide auf den koronaren Fluss wurde am isolierten Mäuseherzen unter Verwendung der Langendorff-Technik⁵⁰ untersucht.

Die Tiere wurden unter Verwendung von Urethan narkotisiert (1,5 g Urethan auf 10 ml NaCl 0,9 %, davon 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal, außerdem 250 I.E. Heparin intraperitoneal). Anschließend wurden sie thorakotomiert, die Herzen unter ständiger Kühlung mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung präpariert (einschließlich Inzision der Mitralklappe) und an die Perfusionsapparatur angeschlossen. An dieser wurden sie mit einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (NaCl = 116 mM, KCl = 4,7 mM, MgSO₄ = 1,1 mM, KH₂PO₄ = 1,17 mM, NaHCO₃ = 24,9 mM, CaCl₂ = 2,52 mM, Glukose = 8,32 mM, Pyrovalat = 2,0 mM) über die Aorta retrograd perfundiert. Das Perfusionsmedium wurde bei 37 °C mit einem Carbogengasgemisch (95 % O₂, 5 % CO₂) äquilibriert. Die Flussgeschwindigkeit wurde mit einer Sonde abgeleitet. Bei konstantem Perfusionsdruck von 100 mmHg war bei diesem Versuchsaufbau die Flussgeschwindigkeit eine Funktion des koronaren Widerstandes. Die koronare Flussmessung erfolgte mittels Ultraschall durch eine 1N-Flussmesssonde gekoppelt an ein Transsonic®-Flowmeter. Durch Gabe von Pharmaka, die durch Infusion über eine in den zur Aorta führenden Zulaufschlauch eingebrachte Kanüle erfolgte, zum Perfusat konnte deren Einfluss auf den koronaren Widerstand und Fluss bestimmt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung des humanen Adenosin_{2a}-Rezeptors⁵¹

Der klonierte und aufgereinigte Rezeptor wurde von M. Broad, University of Virginia zur Verfügung gestellt (94 µg Rezeptor in 170 µl NaCl/Hepes-Lösung, pH=7,4). Die Klonierung des humanen A_{2a}-Rezeptors erfolgte unter Verwendung des Expressionsplasmids „pDoubleTrouble“ (pDT). pDT besteht aus dem Expressionsvektor CLDN 10B, in den einerseits eine Hexahistidin-Sequenz, andererseits ein FLAG-Epitop inseriert wurden. Nach dem Einbau der Rezeptor-cDNA in pDT erfolgte die Expression unter Verwendung von CHO-K1- bzw. Sf9-Zellen. Da der exprimierte Rezeptor an seinem N-Terminus an eine Hexahistidin-Sequenz und ein FLAG-Epitop gekoppelt war, konnten zwei Aufreinigungsmethoden kombiniert werden: zum einen Ni-NTA-Affinitätschromatographie (unter Ausnutzung der Hexahistidin-Sequenz), zum anderen Anti-FLAG-Affinitätschromatographie. Dadurch wurde die hohe Homogenität von über 90 % erreicht.⁴⁸

4.2 Selektion der Bindungspeptide

20 µg des humanen Adenosin_{2A}-Rezeptors wurden auf einer 60 mm Kulturplatte immobilisiert. Zur Selektion von Bindungspeptiden gegen diesen Rezeptor wurde die peptidpräsentierende Bakterienbank FliTrxTM verwendet¹⁶. Die Selektionen („Panning“, s. Einleitung) erfolgten nach dem folgenden Schema, dessen Einzelschritte im Methodenteil beschrieben werden:

Tabelle 2 Protokoll des Pannings

Tag	Schritt	Tätigkeit
1	1	Anzüchten der Bakterienkultur
2	2	Erstes Panning: Induktion der FliTrx TM -Bank
	3	Immobilisierung des hA _{2a} -Rezeptors
	4	Zugabe der induzierten FliTrx TM -Bank zum Rezeptor
	5	Entfernen der ungebundenen Zellen

	6	Elution der gebundenen Zellen durch Scherkraft, Säure bzw. Adenosin
	7	Anzüchten einer neuen Bakterienkultur aus den eluierten Zellen
3	8	Zweites Panning: Wiederholung der Schritte 2 bis 7
4	9	Drittes Panning
5	10	Viertes Panning
6	11	Fünftes Panning
7	12	Ausplattieren der nach dem sechsten Panning eluierten Zellen, um Einzelkolonien zu erhalten
8	13	Isolation von Plasmid-DNA aus Einzelkolonien und deren Sequenzierung

Es wurde dreimal eine Bakterienkultur angezüchtet (Schritt 1), beim ersten Panning wurden jeweils zwei verschiedene Elutionsmethoden (Schritt 6: Scherkraft/Glycin bzw. Adenosin/Glycin) verwendet und die eluierten Zellen anschließend getrennt (unter Beibehaltung der jeweiligen Elutionsmethode) weiterverarbeitet.

Damit ergaben sich die folgenden sechs Versuchsreihen:

Tabelle 4 Versuchsreihen

Anzüchtung Nr.	Elutionsmethode	Bezeichnung
1	Scherkraft	1S
1	Glycin	1G
2	Adenosin	2A
2	Glycin	2G
3	Adenosin	3A
3	Glycin	3G

4.3 Bestimmung der DNA- und Aminosäuresequenzen

In Schritt 13 des oben angegebenen Schemas wurde die Plasmid-DNA der selektionierten Klone präpariert⁴⁰ und anschließend sequenziert⁴¹. Danach erfolgte die Übersetzung der DNA-Sequenzen in die entsprechenden Aminosäuresequenzen. Schließlich wurde ein

Homologievergleich der Aminosäuresequenzen mit der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (am NIH / USA) durchgeführt.⁵²

Die folgenden Tabellen geben die ermittelten DNA- und die dazugehörigen Aminosäuresequenzen wieder (die Buchstabensymbole für die Aminosäuren sind im Anhang erläutert, * steht für Kettenabbruch infolge eines Stop-Codons).

Tabelle 5 DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 1S

Nr .	DNA-Sequenz	AS-Sequenz
1	ATGAGTGGGCGCGTCCAGGTCGTGAGTG CXGGG	MSGVQVVSAG
2	AGATACATTTTGCTGCATCTTAATGTTCCGGTACTA	RYILLHLNVRVL
3	AGGTCGATT CAGAGGCCATGCGAGTAGTCGGCGG	RSIQRPCE*SA
5	TAAGGGCAAAGGTTTCGATTAGGGTGGAAATTTTAA	*GQRFD*GGNF
6	ATGAGTTGGCAAGGTTTAGATGGTCACTTCTTACTG	MSWQGLDGHFLL
7	TACTGATGACGAGTTCGCAGGCTGGCCGACATGGAC	Y* *RVRRLADMD
8	GGAACGCTAGCGCCGGGTGCTTACGCTGCTTTGT	GTLAPGASRCF
11	GTGATAGGCCTATTCCTCGATAATCTGAGTCGGATG	VIGLFLDNL SRM
12	GTATGGCAAAGXCXTCAA AATATGTCGATXCAXCG	VWQXXQNXVDX
13	AGCCTAAGATTTGGGCGCGCAATCCGATCGTCTGA	SLRFGRAIRSS
14	CTGGTATGGCCATGTGCGACGCTCCATAAGGTTGAC	LVWPCATLHKVD
15	TGGGCGCAGTAGGGGTTCAATCAACGAATTGTCCTG	WAQ*GFIQRIVL
16	GTGGTATGGGGCCGAGATAGCTGGTTACAGGGAGT	VVWGPR*LVTGS
17	GGAAGGCTGCGAAGGGCAATCGAAGTAGTCCTGTGG	GRLRRAIEVVLW
18	GCGCGCGACCGTATCTTTGGCAGCCGGGCAAGGGT	ARDRIFGSRAR
19	AGACTGGGGAGC	RLGS
20	AAAGTACTGAGCTCTGTCAATTCAGAAGTACACCTT	KVLSSVNSEVHL
25	TCCGTTTCAGGCATGGATAGCCACAAACAGCTTTAT	SVSGMDSHKQLY
26	GCGTTGGGCTAGAGTCGCGCCCAATGGCTATCGTG	ALG*SRAPMAIV
27	TTCCATGGCTAAGAGCTCCAAGAATACTTCGCAGT	FHG*ELQEYFA
28	ACTGTCGAGCGGGTTAGGAGGGTGAGTGACTTT	TVERVRRVSDF
29	GCGGCCCAAATATAGAAAGCGTGCCTGATATGTAA	AAQI*KACLIC
30	TTGGAAGCT	LEA
31	GCGGTAGAAGCGAGATGAATGCACAAGATTAAGCG	AVEAR*MHKIK
32	AAGTTTTGGGGATGTGTCTCGCTCAATCGAGGA	KFWGCVSLNRG

33	TTTGTGGATAGAACAGGTACCATTTCCGGACTTGGC	FVDRTGTISGLG
35	ATCCGTTGTGCCTCCCGCCATAACCTGTTACCCGG	IRCASRHNLFTR
36	GGAACATCTACCCGAAACXGGAGTGAGCAGCTT	GTSTRNXSEQL
38	TTGGTGGGGTCGTCGGGGCTAATACGATCAGAAC	LVGSSGLIRSE
40	CAGTTCTCAGGATGCTGAGCCGCCGGAGATTTGGA	QFSGC*AAGDL
41	AGGACAATTCGTAGGTTTAAGTGTGGCAACAGACGG	RTIRRFKCGNRR
42	AGAGTCTAATGATGATGCGTTCAGGTGGATAACGG	RV***CVQVDN
43	TCCCAGCGAGCCGGGGAAAGTTAGGGGAAGTTTA	SQRAGES*GKF
46	GGCGTTTAGGGTCGGCATAGAGCAATGGGGTTCGT	GV*GRHRAMGVR
47	AGGCCGCCCTGCGCAACCGAGGAGTGACGGAGG	RPPCATEE*RR
48	GTAGCGGCGTAATAAGGAGCCGGCGCCTACGTATT	VAA**GAGAYV
49	GCCAACXGGGGCTGAGGAACGGGAAAGGGGTC	ANXG*GTGKG
51	GAAGGGCAGGGTTGCGAGTTGGCGTTTTGCTTAG	EGQGCELAFLCL
52	GGCGGCCTAGTAGACCCGGGAGAACGTAGTTAA	GGLVDPGERS*
53	TGAAGTACGTCAGCTCAGGTAAGGTT	*STSAQVR
55	GGGCAATTAGCACCGTAAATGGCGCGTGCGGCCACC	GQLAP*MARAAT
58	CAGACGTGGGAAGTGCCG	QTWEVA
59	AATACGGGGCTCCGTGCCGAGGCAAGGCACCGTACG	NTGLRAEARHRT
60	GGGATAACGTTAGAGGTTTCGCTGCCTGGCCTGCGAT	GITLEVRCLACD
61	AGCGGTGTCTGCCTCTACAGGCAGCGGGGAATGGT	SGVCLYRQRNG
62	GTTCAAAATGTAGCCTATGTAACCGCGGGACG	VHKCSLCNRGT
65	GATCACGTCGGGTCAGTGTGGTTCTCAACGCGATT	DHVGSVWFSTR
66	GACGTGCAGCXAGGGTCAAAGATTCTGGGTATAC	DVQXGVKDSGY
67	GTGGATGTGTGGAGATGAGTGAGGCGAGTTGAAAGG	VDVWR*VRRVER
68	GGTGACAGCXCGCGTGTATATCTTCAGCCGTCACTA	GDSXRVYLQPSL
69	GCCTCGTAGGTTGGGGTGATTCGACGGCATGCAGAG	AS*VGVIRRHAE
70	GGCAGATAAACGTGACACGTTAGTCGAGAGGGAGT	GR*T*HVSREG
71	ACGCCAGCCAGACCAGGTATCGACATTTGGACACG	TPARPGIDIWT
72	AACGCAGCATTCTGAAGTAGTTTACTCGTGGCTGTGT	NAAFEVYSWLC
73	TATGAAGCAATACAGGCTGAAAGGGCGCGAGGCTGC	YEA IQAERARGC
74	GAAAACCCAAGGCTCGAGGAGTAAACGCAGACGGGG	ENPRLEE*TQTG
75	ACGGCGTTTTGCGGCAAAGGGCTCAAACCGGTCTT	TAFAAKGSNRS
76	CCTAGGTAGACTATGGTAAACCAGGGCTTGAACAGA	PR*TMVNQGLNR
77	GCATCCTGGAAAGCTCCTCTXXGGTCAGCTATGG	ASWKAPLXSAM
78	AAATATGCCGAAGATGTCAGCCGCCAAGGGGTG	KYAEDVSRQGV

84	GGXTCTTGTGTAAGGAGACAGTGCCTTTACGGCGAG	GSCVRRQCLYGE
85	GACGTCGGAATTTACAACAACAGGCGCACTTCGTCT	DVGIYNNRRTSS
86	GCTCTAAGCXXGGGAGTCAGGTTGGGGXTGCACGT	ALSXGVRLGXAR
87	GTGACAAGCCGCCGTTGTAATGTCGCGGAACCGTA	VTSTTCNVAEP
88	TTGGTGGTTTACTTTTCGGCTGCXTGGATGCTTAGT	LVVYFRLXGCL
91	GCGTGGGGTGC GGTTGTTGTACAGCGAGAGTGGATG	AWGAVVVQREWM
92	AAACAAAAACATGAGGATGCGTGC GTTCGGAGTGGC	KQKHEDACVRSR
97	GCGCGCGTCCAGGAGACAGCGACGTAACAAGAGCTA	ARVQETAT*QEL
98	GTTACAAATCGCGATTTGGTGGTGTACTATCATGTG	VTNRDLVVCYHV
99	ACCGGAAGGAGCCTATGCAAGAAGGGTGCTTGTTG	TGRSLCKKGAC
100	AAGACTGGGGGGTGATGATCTTCACTCTTCGGGC	KTGG**SSLFG

Tabelle 6 DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 1G

Nr .	DNA-Sequenz	AS-Sequenz
1	GTCTCGTTAATGGGTGGCAGACAGTACTTXXXGGG	VSLMGGRQYXX
2	GAACCAAGATGCTGTCTGAGGGGCGGCCAGGAGCTCG	EPRCCRGAARSS
3	CTGCGGAGTTGGGCCCATATAACCTAGCCGGACGA	LRSWAPYNLACG
4	CTTCAGAAGCGCCAGGTGTACCAATTCGAAGCGGG	LQKRQVYQFEA
5	GGAACGATGGGCTATTTGCTAAAAGCTCGGAGCTAT	GTMGYLLKATSY
6	ACTGTTGCTTCGGTAATAATAACTTGGCAAGTGGCC	TVASVIITWQVA
7	TGGCTAGTCAACATATCACCGCCAGTCGTAGGACG	WLVNISPPVVG
8	TGATTGTGTGAGGAGAACTCGAGTGGCCACGTTTG	*LCEENS SGHV
12	AATCCAGCGTGCCATCAGGACACATGTGGTGAGGGA	NPACHWDTCGEG
13	ACGGCACGAATCAGTGAGCTGCTAAGGTGGACGG	TARISELLRWT
14	AACGCGGGTGGGTTATTGCTCACTACTATTAG	NAGLLLLTTI
16	AGGGTGACGCCGCCGGTTCGAATGGGGCCACGT	RVTPPGRMGPR
19	GGGTTGGTGGTTACGGTGTCTGTTGCTGAGCTGATGG	GLVVTVSLLS*W
21	GCTAGCCGATGAGGTTAACGTGATTTGTACTGCGGC	ASR*F*RDLYCG
22	CGGCAGTGAGGGAAGAATAACAATCGCCAAGGTTGG	RQ*GKNNNRQGW
23	CAGACCCAGAAGAATGTCGCTACGATCCGXCTGTCC	QTQKNVATIRLS
24	TAGCGTCGTGAGCGAGGACAGGGTTGGTTCGAGCTCT	*RRERGGQWSSS
27	TCTATTGCCTATAGGGAAGTGAAGGGAGCGCTAGGG	SIAYREVKGALG
28	TAGTTTCATAGGAAAGTGCTGCTGGTGGTTAAGATG	*FHRKVLLVVKM
30	TTAATGTCGCTATAGAAGATGAGATAGCGCAACCAA	LMSL*KMR*RNQ
31	GAGACACTGGGCTTGATGGGGTTCACGCATTGRNNNC	ETLGLMGSRIXX

32	GCGGGTCGGCAAAAAAAAAAGGGTTGAGATTGGTGAT	AGRQKKRVEIGD
33	TCAGAAACAGATGTTCTGGCCTGAAGCGGGTXXCA	SETDVLA*SGXX
36	GTGGTCGGGCGGTGGCGTTAATCCTGGCGGAAATCC	VVGRWR*SWRKS
40	GCTCAAATGGAGCGACGTXXAAGGGGATTAAGAT	AQMERRXRGIKD
41	TGTTGTAGAGTGCGGGAGAATGTGGTGGGGCAC	CCRVRENVVGH
43	GTAGCGGGACTCGAGGGCTTGGACGCTTGTGGGTA	VAGLEGLDACWV
46	CTTTCCTTTTATACGTCAACTGGGACGGAGGTATCGC	LSFIRQLGRRYR
49	GCTAGGCGTCCGTAAGCCGCTATGGTTATAACTA	ARRR*AAMVIT
50	GCTCGACAGGACTAAGCCCGATAGTTGGCGTTGGAA	ARQD*AR*LALE
51	TGAGAGGGCACTCAGGGGGTCGGGTAAAGCXCGGCC	*EGTQGVG*SLXA
52	XXGGGGGTTTCTGCTAACCAGCTTCGGATGGACXTT	XGVXANQLRMDX
53	ACTCGTCCGACCTTACGGTGGAAATAGGGTGAGACTA	TRPTLRWNRVRL
54	GGGGATAGGGCTCTGCTCCXCXGCGGTCTCXXCAG	GDRALLXXGLX
55	GACGGGGTCGTGCTAGTTCGAGGAAGCGTATCGAGT	DGVVLRVRSVSS
56	CATGGGAGCCTAAGTGGGGTTGTCTAATCGAGGCC	HGSLSGVVLIEA
57	ATGCCTCTCCCAAGGATGTTGAGGGCATTCTGTGGCC	MPLPRMLRAFVA
59	GAACTTGTCAAAGTTAGTAGCGACACCCACAAATA	ELVKVSSDTHK
60	AGCGCCGATACACGGGGAAGATCAGGGCAGTCGGGC	SADTRGRSGQSG

Tabelle 7 DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 2A

Nr .	DNA-Sequenz	AS-Sequenz
1	GTAGATTATGATGGGAGCGAATGTTGCAGTATTATG	VDYDGSECCSIM
2	CCCATGACGGAAGCAAGTCCATCCTAGGGACTCCGG	PMTEASPS*GLR
3	CACTGGTCACGGGCAAGCTAAGCTTGTCAAGCGC	HWSRAS*ACQA
7	CCGCATGTGAGGGTTGCGAGGCCCGGTATCCGTGGT	PHVRVARPGIRG
10	AGCAATGTCCTTGTGGCGAACATGCCTACTGCACTT	SNVLVANMPAL
11	AGGTGCTTCCTCCGATAACATAGGCGTCTTAGTAGG	RCFLRIHRRLSR
14	AATAAGGTGATTGCTTAGTACCGGCTCCTGAAAGGG	NKVIA*YRLLKG
16	GGTAGGAACCACCGTCAACTCGGGCGCCCCGTTCGT	GRNHRQLGRPVR
18	AGCGCTCAGACAGTATGGAGTAGAGCGAGACCATC	SADDSME*SETI
19	ACAACCTATTAGCCTAGTTGCGTGCCTAGAAGTGTGG	TTISLVACLEVV
22	GATTGCAGTCCTATCAACGCCAGCGCACGGCCGGCT	DCSPINASARPA
23	CGGAATGCTTTGAACCCAGCGCGTTTATCCCGGGAGC	RML*TQRVYPGS
24	TGTCCTGATCGACGGAAGCGGGATAGATAACTAAAC	CPDRRKRDR*LN
25	AGACGGGTGGGAACGGGGCGGAAAGCGTGATTCAA	RTGGNGAESVIQ

26	GGCCGGGCAGAGATGTGCTTTAGCGGTGTTGCAT	GRGRDVL*RCC
27	TCTAAAGTCGCTTATCGGGTTCATGAAGTAAAGTTC	SKVAYRVHEVKF
28	ATCGGGTCGATAGTTGCAGGCGTCAAAGTCCGGCG	IGSIVAGVKSPA
31	TGGTGCGCACGTTACGGGTGAGCATTTCGCTTCGCG	WCARYG*AFafa
32	TGGATAATTGAAGGGATCGCAGTGCCGCGGATTTGG	WIIEGIGVPRIW
35	GGTTGATGGGCCGATCGCGCGAGGGCGATATCACA	G*WADRARAIS
36	AAAATGATCAGGAAGACTGATAGCGGGCTTGGTGTA	KMIRKTD SGLGV
42	GGGGAGTGGCAGCCGATGACGAATCGCACCAAGTGT	GEWQPMNRTKC
45	CAAGAGTAGGTTCCAGGGCTCGAGCGGCGTCGAGGC	QE*VPLERRRG
46	GATGGGGAGGAGAACCAGCCGGGGACGACTGAGGGT	DGEENQPGTTEG
49	AAGCGGCTAGTGCGTAGCCATGAGTGAGTGAGCCCT	KRLVRSHE*VSP
51	TTTCTCGTACGAGCACTTGTAGTCTATCCGGAAAGA	FLVRALVVYPER
54	CTCGCTTAAGATTGGTGTAGTCAGAGACAAGTTCGC	LA*DWCSQRQVR
55	GGCTCAAACGCCGCGTTGGCTTTTGACAAGAAAGTT	GSNAALAFDKKV
56	GTTTGGAATACAGGTGTGTACGAACAGCGTAGTATT	VWNTGVYEQRSI
58	GCTTCCTCCTCGCAGTGATCGAGGGCTCAGCAGAAC	ASSSQ*SRAQQN
67	CTTAAGAGTGGCGGTCCGTCTTGAGACAACATTGG	LKSGGPSLRQHW
68	GTTCGAATAACCGTGGCTATTAAGGCAGACTACTG	VRITVAIKADY
70	CTAGTGCCTATCTGTCTAATCGTCGACGCGAGATA	LVPICPNRRREI
71	GTAAAGGAGTGTGTGGGTCGGGGAAGTGTGCACCGC	VKECVGRGSVHR
76	AGCGCATTTTCGCGACTAGGATCACGGGCATCGGATA	SAFRD*DHGHRI
77	AGAGCATTCGCGACTAGGATCACGGGATCGGATA	RAFATRITGSD
79	AGGATTGGATAAGTTAAGGAGGGGTCGATGTAGGCT	RIG*VKEGSM*A
85	GAAGAAGGCTCAGGGGCTCATGGTTAGTCACTAAGG	EEGSGAHG*SLR
87	AATGTGGAACCTAAGATTGTCGGTGCGGCAGGGAGG	NVELKIVGAAGR
88	GGGTAGGGCGGATCCACAGCGTTACGTTAGCGCAC	G*GGSHSVTLAH
96	GCTTTTAGGAGGAGTGTGGTATTGCGGGTGGGCCCC	AFRRSVVLRVGP
97	CCGCCAAGTACCACGGTGCTCCTTTGGCGTGTAGAC	PPSTTVLLWRVD
98	CTCAAACAGGCGCGGCGCCGTAGGGTGGCGGCCTAG	LKQARRRRVAA*
99	ACCGGTTAGCGGGCACGAATATTAAGCGGGGGTAC	TD*RARILRRGY
103	GGAGAACGGGCCACACGGTGGATTAATCGACCAATT	GERATRWINRPI
104	CTTGGGCAGCGGGAGTAGAGGTTAGTTCATAGGGCC	LGQRE*RLVHRA
105	GGCCCGCATTGGTTTCTGAATGTAGTATTAGTGGTG	GPHWFLNVLLAV
106	GGTTGGGGCAAGGGGCTGGGTAGATAGGTGTTCGCG	GWGQGAG*IGVA

Tabelle 8 DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 2G

Nr .	DNA-Sequenz	AS-Sequenz
1	AGGAGGGTAATTTTTCAATGGATGGTGGTAGCTACG	RRVIFQWMVVAT
2	AGGAGGCTGGATTTTAGCCAGAAGGAACGCGCCAG	RRLDFSQKERAQ
5	AGGAGGGTAATTTTTCAATGGATGGTGGTAGCTACG	RRVIFQWMVVAT
8	AGGAGGATAGGGGGGTGATGCGGACAGACAGCTCCC	RRIGG*CGQTAP
25	AGAAGACGGAAGCTGCGGATATCCGTATTGGGGAATT	RRRNCGYPYWGI
26	CTTACGAATGATCTGAGAAGACTAGGGTTTGAAAT	LTNDLRRLLGFGN
27	GGTATTAAACCTCACGGCAGTAGAAGGAGATGGTGC	GIKPHGSRRRWC
28	GGTGATTATGGTTTGCAGGTTGGGGTAAGGAGGGTG	GDYGLQVGVRRV
30	GACTGGAATCGCTGAGCTCGACGTCGAGCAGCCAAT	DWNR*ARRRAAN
33	GTTGGGGTGATCTATTGCGGCTTGGAAGAAGACAG	VGVIYCGLARRQ
34	CTCACAGATCTCAGCAAACGACTTGAGATGGCGGAT	LTDLSKRLEMAD
35	CGGATTGAGCTGTCCAGACTAGAAGGATCGGGAGG	RIELSQTRRIGR
37	CTGCTAGGGGGACAAGCCGCTGGTTGGCGGTGGAA	LLGGQAAGWRW
38	AGGAGGGTAATTTTTCAATGGATGGTGGTAGCTACG	RRVIFQWMVVAT
41	ACAGTCACGGGAACAGCGACCTGGGGCGTATAATA	TVTGTATWGV*
46	CAGGGGAGGAGGCGGAAACGAAAGAAGATTTGTCGG	QGRRRKRKKICR
47	TGGGATGGAGTGCGGGTGCGGAGAAGACGGACG	WDGVRVRRRRT
50	CTGCTAGGGGGACAAGCCGCTGGTTGGCGGTGGAA	LLGGQAAGWRW
54	GGCAGAAGACGGTTTGGGATCAGTGTATCACAGG	GRRRFGISVYHR
57	GTAGTAGCGAGCCCTGACAGAAGGAGGGTCTGTGGT	VVASPDRRRVCG
58	CTTACGAATGATCTGAGAAGACTAGGGTTTGAAAT	LTNDLRRLLGFGN
59	GATACCCGCCGACTATAATCTGCCTGGGTGGCGGG	DTRRL*FCLGGG
62	GGACAGGAGAGAAGGAGGTTCAAAAAGGGGGCTGG	GQERRRFKKGW
66	AGAAGACTGGATCGTGGGTGCGGACCTGCGCTC	RRLDRGSGPAL
68	AAGGGTGGCCCTTCTAGTGGCGAGGAGGAATAGGG	KGGPF*WRGGIG
72	AGAAGACAGGCGAACAGAACCTCTCGGAAGGTACG	RRQANTRTSKRV
73	TGGGATGGAGTGCGGGTGCGTGGGAGAAGACGGACG	WDGVRVRGRRRT
76	AGAAGACGGGCTGTGCGATAAAAAATTAATGATGGC	RRRAVG*KINDG
79	GGTCAGGAGGGCTGCTTCGAAGAAGGAGAGTGGGA	GQEGCFEEGEW
80	GGTCAGGAGGGCATGCTTCGAAGAAGGAGAGTGGGA	GQEGMLRRRRVG
81	ACGACATGGTCTAGGAAGACGTGGCATGCTGCTGCTA	TTWSRRRGMLLL
84	CAGAGAAGACGCGCGTGATAAACCGACTCGGGACAC	ARRRA**NRLGT
85	AGAAGGAGAAACGATAGAATGGATAGAGGAGCACGA	RRRNDRMDRGAR

86	AGAAGGAGAGACCGATAGAAATGGATAGAGGAGCAGA	RRRDR*NG*RSR
96	ACTGGGAAAATAATAGTACGTAATGACGTGGGGCA	TGKIIVRNDVG
100	TTTGGATTGGTAGCTATAGGGACAAGAAGGAGGG	FGLVAIGTRRR
102	ACCAGGGTGGTAGGCCGCCGCGATAATACACCTCCTT	TRVVGAAIIHLL

Tabelle 9 DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 3A

Nr .	DNA-Sequenz	AS-Sequenz
11	AACGCCTCCTGTTGTGCAAGAAGCGCCTGCGGAGAA	NASCCARSLRR
23	ATGTGAGGCCGATACTTGCCGGCCCGTGCCTATTGG	M*GRYLPARAYW
24	ANTACTTATTGTCCCAGCTAGTTTCAAACCGGGGGTG	XRYCPS*FQTGG
26	ATCGATAGCTGGCGTGAGGGGAGTTCGGGTCATGAC	IGSWREGSSGHD
28	ATTGGGGCAGATATGGGCCTGATCAGCCACGGGAG	IGADMGLISPRE
29	CATCGAGCACCGACAGCAGCTAAGCTTAATGTGAGC	HRAPTAAKLNVS
30	CACCCTCTTTGCCTATTACGAGTCGCCTAAGGGGAC	HPLCLLRVA*GD
31	GAGGGGGGGCAGGGGAGGCGGATTTCGCATTACACAT	EGGQGRRIRITH
32	GCTTGGGTTGGGTATCTGCCCGTGGCTATGGTCCGT	AWVGYPVAMVR
33	GCGCTATGGACACGCAGGACTTCTCCCTCCCGGCGCC	ALWTRRTSPSRR
35	GCTAGGGCTCTTAGATGCCGCGTACCACGTGAGCGG	ARALRCRVPRER
36	AATGACGTCATTTGGGAGTGAACGTAGCCTCTTTAT	NDVIWE*T*PLY
38	AGGCTTCATAATTTGTTAGGACGAACTAGGAGGAA	RCDNLLRRN*EE
39	AATTATGGTGAGGCTTTCGCCAGCTGGACGGGGCG	NYGEAFRQLDGA
43	CAAGGTGGACATGACAGAAGATGGTGAACCGAGAAG	QGGHRRW*TEK
44	GCTAGGGCTCTTAGATGCCGCGTACCACGTGAGCGG	ARALRCRVPRER
47	CGGTGGCGGCACGGCACCTGTCAGCCGGACCGTGCA	RWRHGTCQPDRA
49	AGTAAGGGTTAGCGAGGGTTCGTGACAAGTTTCTC	SKGGARVRDKFL
50	TGTGTGGTGGCCGCCGACGCATAAGAGACGTGATA	CVVAAGRIRDVI
51	TCCAGGATCAGGCCGGGCTTGGGCTGGGGCTTTCGG	SRIRPGLGWGFR
53	CGAGGATACTGGGTGTCCTGGGGTGAAGAGGTGAA	RGSWVSWGEEV
55	GTCGCCCTAACCAGCCGACAGAGAAGCGCTAAGAAC	VALTSRQRSKN
56	GTGCGGAACCGTAGGGCGCGTTGGGGACTGTAGCGT	VRNRRARWGG*R
57	TCAGTCATGCCGCTAATGTTAGGCCGCTGTTCAAGT	SVMPMLGRLSS
58	TGTTTGAGCTGATGAGTACCATTGCATCTTGTTTGC	CLS**VPLHLVC
60	TGGATAGTCGGCGGTGGGCAACAGGGCCTCACGACG	WIVGGGQQGLTT
61	AACGGGGGGCGTAATAAAGCACTCCGGGGCGGAGTC	NGGRNKALRGGV
63	GCCCCGTGGTGGGTGGGAATTTGAAGCCTTAGGGAA	APWWVGI*SLRE

64	GATTAGTGGTGAAGCATAAAATGAGTGTAGCAGCTT	D*W*SIK*V*QL
65	CTGATTGTAGCTCAGTATTGGGTAACGCGGGGAATC	LIVAQYWVTRGI
68	GGCGAGCGATTGAGTAGGATGGAAAGCCCTGTACGG	GERLSRMESPVR
69	AAGTGGAGGATAGGCTATGAGGAGCAGAGCTACAAA	KWRIGYEEQSYK
70	ATGAGCCACCAGGATGGGGGAAGCGATGGTAATACG	MSHQDGGSDGNT
72	ATGCCACAAAAGGGAAGCTCTATCAGAAGGGCACGC	MPQKGSSIRRAR
74	TCAGAGAAGATTCTCGAAGGAGCTGGAAAGCACGG	SEKILEGAGKH
75	GTCGCCCTAACCAGCCGACAGAGAAGCGCTAAGAAC	VALTSRQRSAKN
76	GCAGATACGCCTACGATGGGAGGTAGTTTGCGGAAG	ADAPTMGGSLRK
77	TAGATGGGCCGTTAAAAATCTGGTTCACTTCTGCAA	*MGR*KSGSLLQ
78	GCTCGGAGAGCAATCAAGAACGGTTGAATTGCGAGC	ARRAIKNG*IAS
79	ACTTCTGATCGCGGGCCACTCGAGCTCTTTATAGAT	TSDRGPLELFID
80	CTTCAGGGCTCGTTAATGTAGCTCACACCTGAGATC	LQGSML*LTPEI
83	ACTTACAATGAGGAGATTTGGCAGAATGCGGAGGAT	TYNEEIWQNAED
84	CAGCGAAGTTAGTGACCGGGCCAAAGGGTTACAGTG	QRS**PGQRVTV
85	GTGATGCTCGGGTTGCAGATGTTACGCCAGGCGGAG	VMLGLQMLRQAE
86	CGGGCTCAGGGTGTGCTGAGTACATCGTAAGCGTG	RAQGVLSTS*A
87	ACAGTTAGGTTTGTGGCGCTTGCCCACAAGTGTCCG	TVRFVALAHKLR
90	ATACATGATCGTGACGTCCAGTCATTTCGAAAGGTG	IHDRDVQSFRKV
92	CCGTAGCAGAGTTTGTAAACGAGGGGCGCATGCGC	P*QSL*TRGRMR
93	CAGCACTAACGGCTCCGACCTGTTAAGGGATAAGGT	QH*RLRPVKG*G

Tabelle 10 DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 3G

Nr .	DNA-Sequenz	AS-Sequenz
3	ATAGGGGGTAGGGTTCAAAGTAGGCTCATCTTAGTG	IGGRVQSRLTLV
4	CTGGACGCGCGGGTCTGTCGTTGACAAATTCCGCAA	LDARVCR*QIPQ
5	GGGGCACTCAAGATACCTATGTGCGTAGTGCTCATC	GALKIPMLVLI
6	GATAGCATCAGGTCGGGTGGTATCTCTATACTGCTC	DSIRSGGISILL
7	CGTCTTATTGAAGTGCGAAGAAGGTCACGAATTTG	RLIEVRRRSRIS
11	AAGCTGCGGGTACGGCTTCCGAAATTGACTGAGCTC	KLRVRLPKLTEL
13	GTACCGTATTCATCACGAGGCAGCTGCGTCTTCGC	VPYSSRGSCVF
14	GAACAGAACCCGGTGTAGGCGGCGATCGGGATAGGA	EQNPV*AAIGIG
15	GTGTGCGGCCTTTACCGGGAGATGAACTAAGCGCCG	VSRLYREMN*AP
19	CGGAGCTTGCAATATGCTCGTAGCTAGATGAAAGTA	RSLQYARS*MKV
20	ATGGCTAGGCAGGCCGATGAATAGGCGTAACGTGCA	MARQADE*A*RA

21	GTTTTAGGTAAGATCAGCGCTTACATAGTAAGGTGA	VLGKISQYIVR*
22	TATTCAGAGAAAAACGGGGCATTTTGAGGCCCCAG	YSEKKRLILRPQ
23	GGCAGACGATTTTCGTAACATGTAGGCTCCAGGGGGG	GRRFRNM*APGG
24	GCACGAACCAGAACCACAAGGTGAGTTCGATGCAA	ARTRTHKVSSMQ
26	TAAAGACACCATAAGATGAAACGTGTGCGAACTTGAA	*RHHKMKRVELE
27	CCCGTCCTTACGGAGGTGATGCAGAATCTCTCGATG	PVLTEVMQNLISM
28	GGCTACTGGTTTCGTACGCGGGCGGGCCGAGTCGC	GYWVVRGGRPSR
29	GGCAGAGGGATTTTCAGGCATAAGGAGCTTACGCTGC	GRGISGIRSLRL
30	GTGGTGAAATGGCCGGCCCTGTGTCGTCGTCAGGTG	VVKWPALCRRQV
31	CTCTTGACAGGACGAGTTCGCAACACGCTCTGACAC	LLTGRVRNTL*H
32	CCGAGCTGGCGGAGCATATAAAGTTCGCTCCACCAC	PSWRSI*SSLHH
34	CCGTCAAATATAGCTGTAGCTGGGGACTACGCAAGA	PSNIAVAGDYAR
35	GGGATTGAGCTTGTGCGGGAAACACGCATAGCCAAA	GIELVRETRIAK
36	GATGGGTAGTATCTCCGGAATGGCGAGCGACATACA	DG*YLRNGERHT
37	AGAGGCATGATGCGTCAGGGGAACAGTCCTCACCTG	RGMMRQGNSPHL
39	CGGAATGATGAGTCCGACTTCCGAGGCAGGCTATG	RNDESDFRGL
41	CGGCAGCCACGGACAAAGTTATAGCGTCCGTATCCA	RQPRTKL*RPYP
42	AGCTGAGAAGGATCTATGACGCGCTGGGGAAAGAGG	S*EGSMTRWGKR
45	TTCCGCTGGCTGTTGAATGGGCGTTTTGTAAAGCCTA	FRWLLNGRFVSL
46	GAGTGCAGACATGAAATCGCCGGAATGCACAGCGGG	ECRHEIAGMHSG
47	GGTCAGCAATTAAGAAACGTGCCCTGCGAACTGAA	GQQLRNVPLRTE
48	AGGGGGTTTCATCGATTGCTCGCGCGGAGGGGACGG	RGFHRL LARRGR
50	CCGGCTCCGTCCTGCCGAGACCGGTGAGGTATTGAT	PAPSCRDR*GID
51	CAGCTTTCGCTGATACATCACGCGATGCTGGTGGGG	QLSLIHHAMLVG
52	CGGGGGTGGCAACAACCAGATAATCGACGAGGCTCG	RGWQQPDNRRGS
53	GTTACTAATATCAGCGCGCGGACAGCCTGGTTGGCA	VTNISARTAWLA
54	CGTGCCAGGGTAGGGCGCTGATTGCGCACGGAAGCT	RARVGR*LRTEA
55	GTGCGTGAACGGGGCGGGTAAACGCATTCCATGTAG	VRERGG*THSM*
56	TTGCTGGTGCGCCTTATTTAAGAGAGTCTTCGCGGA	LLVRLI*ESLRG
57	AAAGCGAGGTGGAGTTGGCACACGGCTAGGGAAATA	KARWSWHTAREI
59	ATGGAAATTAAGCGATGGGAAATGGTAATAGCTAAC	MEIKRWEMVIAN
60	AAGGGGGAAGCTCGCTATATGATTAGGAGCTCTCTG	KGEARYMIRSSL
61	GGTATAAAAGGGTAGCGGGAGGGAGCATTACCCCGT	GIKG*REGALPR
62	GACAGGGTGAAATCTGGTGCGGTTGAGGATATCGGA	DRVKSGAVEDIG
63	TTGCATGGTCAGTACGGCCAGGTCTCGTGACGCTGG	LHGQYGQVS*RW

64	CGCAGGAACAGGGAAGGTGAGTGAGTATTCAGTAAT	RRNREGE *VFSN
66	GGGAAGGTTGGTTAAGTTTAACACGTTAGGTGTAAG	GKVG *V *HVRLK
67	GTGATAAGTGCAGGGCAGCAGCGTTAGGCAATGATA	VIDAGQQR *AMI
68	GAAGTACAAAAACCGGGCCGGTGGACGGGGACGCGG	EVQKPGRWGTGR
69	GGGCTCGGTATAGTTCTGTTCCAGTTGGTAATTAGG	GLGIVLFQLVIR
70	ACGGCCGCACCGGAAGGCTTATGACATAATCGCCGG	TAAPEGL *HNRR
72	TAGGTTCCGGGAATCGGCGGAGTGGGATCGTAGAAG	*VPGIGGVGS *K
73	CTGATTCGCTAGATGTGCACGCTTCAGCGGCTGCAA	LIR *MLTLQRLQ
74	CGGAGGGTGGAAAAACGAGACTGAACCGCTCACACG	RREVKRD *TAHT
75	GATGGGTAGTATCTCCGGAATGGCGAGCGACATACA	DG *YLRNGERHT
77	CAGGCGAACTGGATAAGGAACGGGGGCTAGCGCTCA	QANWIRNGG *RS
78	CAAACGAGATGGATAGGGCCTTCTGCCAGAGGTCA	QTRWIGAFQRS
80	GAGGCGGTGGGGAATAAATGGAGCCAGGTCATAGTT	EAVGNKWSQVIV
81	GCTAAAAGTGGCCAAGTGGAGGAAAATACTGTCGTT	AKSGQVEENTVV
82	ATACTAGTCACATATCAGGTTGCGGACGTGCGGCGC	ILVTYQVADVRR
83	GAGCAGAGGCGCACTGAATCGTAACTTATCGTGACG	EQRRTES *LIVI
84	GACTCTACCCTACAGATTGAAAGTGGAGCGGTGAAG	DSTLQIGK *AVK
85	TTAGTTCTCCCGCGCCAGATGAGAGGGAGGTGATAA	LVLPRQMRGR **
86	GACGGCGAGGTTTTTCGAGTGGTTGGCAGTTCCAATG	DGEVFEWLAVPM
87	CGGATATTTAGGTTTCGACGGAGCGCGGCCGATGCTA	RIFRFDGARPML
89	GCTACGTACAGTGTGGGCCGGGACGGGTGAGTAAAG	ATYSVGRDG *VK
92	ATTATTACCACGTGGTGTACGCTGCGGAGAGTCCGG	IITTWCTLRRVR
93	TCTCATAGTGGCCAAAATTAAGGGATGTGCACACGA	SHSGQN *GMCTR
95	GTTGCCCAAAGAAGTAGAACCACAGCGTGAAATAT	VAQKK *NHSVKY
96	TTGCTGGTGCGCCTTATTTAAGAGAGTCTTCGCGGA	LLVRLI *ESLRG

Ein Teil der Sequenzen konnte trotz wiederholter Sequenzierung nicht gelesen werden, so dass in der fortlaufenden Numerierung einige Klone fehlen. Von den insgesamt 580 gewonnenen Bindungspeptiden konnten 315 in ihrer DNA- und Aminosäuresequenz aufgeklärt werden.

Einige DNA-Sequenzen (n=119) enthalten ein Stop-Codon (in der Aminosäuresequenz als * dargestellt), andere nicht genau 36 Nukleotide, so daß die entsprechenden Sequenzen nicht für ein 12 Aminosäuren umfassendes Peptid codieren bzw. zu einer Verschiebung des Lesemusters führen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden nur die 12 Aminosäuren umfassenden Peptide ohne Verschiebung des Lesemusters (n=143) betrachtet.

Der anschließend durchgeführte Homologievergleich der Aminosäuresequenzen mit der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information (am NIH/USA) ergab keine relevanten Homologien.

4.4 Muster- und Ladungsanalyse der Bindungspeptide

4.4.1 Einführung⁵³

Während makromolekulare Ketten durch *kovalente* Bindungen zusammengehalten werden, ermöglichen schwächere, *nicht-kovalente* Bindungen die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Teilen von (Makro-) Molekülen (Bestimmung der dreidimensionalen Struktur) und die Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen. Sie besitzen etwa 1/20 der Stärke kovalenter Bindungen.

Diese nicht-kovalenten Bindungen, zu denen Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Bindungen gehören, sind auch für die Interaktionen zwischen Rezeptoren und Liganden verantwortlich. Treffen Ligand und Rezeptor aufeinander, bilden sich eine Reihe nicht-kovalenter Bindungen aus, es kommt zur Bildung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes. Dieser Komplex besteht so lange, bis zufällige thermische Bewegungen bewirken, daß die Moleküle wieder dissoziieren. Je stärker die Bindung der Moleküle des Komplexes im Vergleich zu den thermischen Bewegungen ist, desto geringer ist die Geschwindigkeit ihrer Dissoziation.

Ob und welche nicht-kovalenten Bindungen sich zwischen Peptiden und Proteinen ausbilden können, wird von deren Aminosäuresequenz bestimmt, da sich die Aminosäurereste in ihren physiko-chemischen Eigenschaften (Ladungszustand, Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken, etc.) unterscheiden.

Im folgenden werden zunächst die Aminosäuresequenzen der Bindungspeptide auf Wiederholungen und Muster untersucht. Anschließend werden die Ladungen der einzelnen Aminosäuren analysiert und die Nettoladungen der Bindungspeptide bestimmt, um Hinweise

darauf zu erhalten, welche Faktoren für die Wechselwirkungen zwischen den gefundenen Peptiden und dem humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor verantwortlich sind.

4.4.2 Musteranalyse

Zunächst wurde untersucht, ob sich einige Sequenzen vollständig wiederholen. Dies trifft zu für die Sequenzen 2G/1, 2G/5 und 2G/38 (jeweils RRVIFQWMVVAT), die Sequenzen 3A/35 und 3A/44 (ARALRCRVPRER), sowie für die Sequenzen 3A/55 und 3A/75 (VALTSRQRSACKN). Bei diesen Sequenzpaaren stimmt auch die DNA-Sequenz überein, so dass man davon ausgehen kann, dass die Sequenzwiederholung das Ergebnis einer Selektion durch das „Panning“ (s.o.) ist.

Anschließend wurde jede einzelne Aminosäuresequenz mit allen übrigen (142) Sequenzen, auch unter Verschiebung des Leserasters, verglichen, um Muster in den Sequenzen zu identifizieren. Hier ließ sich die Teilsequenz VVL an verschiedenen Positionen der Sequenzen 1S/17, 1G/55, 1G/56, 2A/96 und 3G/5 ausmachen, darüber hinaus konnten keine weiteren Muster ermittelt werden.

Um zu erkennen, ob einzelne Aminosäuren (AS) an bestimmten Stellen der Aminosäuresequenzen bevorzugt vorkommen, wurde für jede der 12 Positionen der Sequenz die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren ermittelt und statistisch ausgewertet:

Tabelle 11 Häufigkeitsverteilung der Aminosäuren

AS	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)	12 (%)
A	9 (6)	8 (6)	11 (8)	8 (6)	7 (5)	12 (8)	13 (9)	7 (5)	12 (8)	8 (6)	13 (9)	8 (6)
R	17 (12)	21 (15)	16 (11)	19 (13)	23 (16)	19 (13)	23 (16)	16 (11)	32 (22)	32 (22)	14 (10)	26 (18)
N	6 (4)	1 (1)	9 (6)	2 (1)	5 (3)	4 (3)	5 (3)	8 (6)	4 (3)	2 (1)	2 (1)	5 (3)

D	7 (5)	4 (3)	5 (3)	5 (3)	4 (3)	4 (3)	5 (3)	2 (1)	5 (3)	4 (3)	1 (1)	8 (6)
C	1 (1)	3 (2)	2 (1)	4 (3)	4 (3)	4 (3)	1 (1)	7 (5)	4 (3)	2 (1)	4 (3)	4 (3)
Q	4 (3)	4 (3)	4 (3)	6 (4)	4 (3)	12 (8)	6 (4)	8 (6)	3 (2)	5 (3)	1 (1)	5 (3)
E	5 (3)	5 (3)	10 (7)	5 (3)	7 (5)	3 (2)	7 (5)	7 (5)	6 (4)	2 (1)	9 (6)	4 (3)
G	21 (15)	18 (13)	14 (10)	12 (8)	13 (9)	19 (13)	12 (8)	16 (11)	8 (6)	10 (7)	16 (11)	14 (10)
H	2 (1)	2 (1)	2 (1)	5 (3)	2 (1)	3 (2)	4 (3)	2 (1)	3 (2)	3 (2)	7 (5)	1 (1)
I	8 (6)	11 (8)	9 (6)	14 (10)	4 (3)	6 (4)	4 (3)	10 (7)	2 (1)	8 (6)	8 (6)	8 (6)
L	9 (6)	6 (4)	9 (6)	18 (13)	11 (7)	12 (8)	15 (10)	13 (9)	16 (11)	11 (7)	14 (10)	15 (10)
K	7 (5)	5 (3)	3 (2)	7 (5)	4 (3)	5 (3)	2 (1)	7 (5)	4 (3)	4 (3)	6 (4)	3 (2)
M	5 (3)	2 (1)	3 (2)	1 (1)	3 (2)	4 (3)	6 (4)	5 (3)	3 (2)	2 (1)	2 (1)	5 (3)
F	3 (2)	1 (1)	4 (3)	3 (2)	8 (6)	2 (1)	2 (1)	2 (1)	2 (1)	5 (3)	2 (1)	1 (1)
P	4 (3)	6 (4)	2 (1)	7 (5)	5 (3)	6 (4)	3 (2)	3 (2)	5 (3)	7 (5)	5 (3)	1 (1)
S	9 (6)	9 (6)	10 (7)	5 (3)	14 (10)	3 (2)	5 (3)	9 (6)	16 (11)	7 (5)	14 (10)	9 (6)
T	8 (6)	13 (9)	3 (2)	9 (6)	6 (4)	3 (2)	5 (3)	6 (4)	3 (2)	8 (6)	5 (3)	7 (5)
W	3 (2)	5 (3)	7 (5)	6 (4)	1 (1)	3 (2)	9 (6)	1 (1)	3 (2)	3 (2)	2 (1)	5 (3)
Y	2 (1)	4 (3)	2 (1)	1 (1)	6 (4)	4 (3)	3 (2)	1 (1)	2 (1)	4 (3)	3 (2)	2 (1)

V	13	15	18	6	12	15	13	13	10	16	15	12
	(9)	(10)	(13)	(4)	(8)	(10)	(9)	(9)	(7)	(11)	(10)	(8)

Bei 20 Aminosäuren beträgt die statistische Wahrscheinlichkeit für eine Aminosäure, an einer bestimmten Position der Sequenz vorzukommen, 5 %, sofern man von einer Zufallsverteilung ausgeht. In der Tabelle ist zu erkennen, dass die Werte für einige Aminosäuren deutlich darüber liegen. In der folgenden Aufstellung sind die Aminosäuren berücksichtigt, deren Werte mindestens das Doppelte des Zufallswertes, also mindestens 10 % betragen:

Tabelle 12 Häufigkeitsverteilung der überdurchschnittlich oft vorkommenden Aminosäuren

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AS (%)	G (15)	R (15)	V (13)	R (13)	R (16)	R (13)	R (16)	R (11)	R (22)	R (22)	G (11)	R (18)
AS (%)	R (12)	G (13)	R (11)	L (13)	S (10)	G (13)	L (10)	G (11)	L (11)	V (11)	V (10)	G (10)
AS (%)		V (10)	G (10)	I (10)		V (10)			S (11)		R (10)	L (10)
AS (%)											L (10)	
AS (%)											S (10)	

Es zeigt sich, daß sechs Aminosäuren überdurchschnittlich häufig vorkommen: Arginin (R), Glycin (G), Leucin (L), Isoleucin (I), Valin (V) und Serin (S). Am häufigsten ist Arginin, das zu den Aminosäuren mit basischer Seitenkette gehört und eine positive Ladung besitzt. Arginin kommt an allen Positionen überdurchschnittlich häufig vor, besonders im hinteren Teil der Sequenz (Pos. 9: 22 %, Pos. 10: 22 %, Pos. 12: 18 %). Den übrigen fünf Aminosäuren ist gemeinsam, dass sie zur Gruppe der Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette gehören (Serin hat zudem noch eine Hydroxylgruppe).

Die genannten Aminosäuren zeigen Präferenzen für bestimmte Positionen, allerdings über die gesamte Sequenz verteilt (Glycin zum Beispiel für die Positionen 1, 2, 3, 6, 8, 11 und 12). Dies und die Tatsache, daß nur drei Wiederholungen gefunden wurden, läßt vermuten, dass

das Vorhandensein von Arginin und den genannten Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette an sich einen Selektionsvorteil beim „Panning“ darstellt, unabhängig von einem bestimmten Muster.

4.4.3 Ladungsanalyse

Zu den nicht-kovalenten Bindungen, die die Bildung von Rezeptor-Ligand-Komplexen ermöglichen, gehören die Ionenbindungen und die hydrophoben Bindungen. Ionische Wechselwirkungen treten zwischen zwei (unterschiedlich) geladenen Molekülen auf, während hydrophobe Bindungen dadurch zustande kommen, daß ungeladene (hydrophobe) Gruppen in wäßriger Lösung von Wassermolekülen abgestoßen und so zusammengeballt werden. In den folgenden Tabellen werden die einzelnen Aminosäuren hinsichtlich ihrer Ladung analysiert. Dabei sind Arginin (R) und Lysin (K) bei neutralem pH-Wert positiv (+), Aspartat (D) und Glutamat (E) negativ (-) geladen. Die restlichen Aminosäuren sind ungeladen (0). Die ebenfalls wiedergegebene Nettoladung (NL) der Peptide ist die Differenz aus positiven und negativen Ladungen.

Tabelle 13 Ladungen der Peptide aus den Versuchsreihen 1S und 1G

	1S			1G	
Klon Nr.	AS-Sequenz Ladungen	NL	Klon Nr.	AS-Sequenz Ladungen	NL
2	RYILLHLNVRVL +00000000+00	+2	2	EPRCCRGAARSS -0+00+000+00	+2
6	MSWQGLDGHFLL 000000-00000	-1	3	LRSWAPYNLACG 0+0000000000	+1
11	VIGLGLDNLSRM 000000-000+0	0	5	GTMGYLLKATSY 0000000+0000	+1
14	LVWPCATLHKVD 000000000000	0	6	TVASVIITWQVA 000000000000	0
17	GRLRRAIEVVLW 0+0++00-0000	+2	12	NPACHWDTCCEG 000000-000-0	-2
20	KVLSSVNSEVHL +0000000-000	0	23	QTQKNVATIRLS 000+00000+00	+2

25	SVSGMDSHKQLY 00000-00+000	0	27	SIAYREVKGALG 0000+-0+0000	+1
33	FVDRTGTISGLG 00-+00000000	0	32	AGRQKKRVEIGD 00+0+++0-00-	+2
35	IRCASRHNLFTR 0+000+00000+	+3	43	VAGLEGLDACWV 0000-00-0000	-2
41	RTIRRFKCGNRR -00--0-000--	+6	46	LSFIRQLGRRYR 0000+000++0+	+4
59	NTGLRAEARHRT 0000+0-0+0+0	+2	53	TRPTLTWNRVRL 0+000000+0+0	+3
60	GITLEVRCLACD 0000-0+0000-	-1	55	DGVVLVRGSVSS -00000+00000	0
61	SGVCLYRQRGNG 000000+0+000	+2	56	HGSLSGVVLIEA 0000000000-0	-1
72	NAAFEVVYSWLC 0000-0000000	-1	57	MPLPRMLRAFVA 0000+00+0000	+2
73	YEA IQAERARGC 0-0000-+0+00	0	60	SADTRGRSGQSG 00-0+0+00000	+1
84	GSCVRRQCLYGE 0000++00000-	+1			
85	DVGIYNNRRTSS -000000++000	+1			
91	AWGAVVVQREWM 00000000+-00	0			
92	KQKHEDACVRSG +0+0-000+00	+1			
98	VTNRDLVV CYHV 000+-0000000	0			

Tabelle 14 Ladungen der Peptide aus den Versuchsreihen 2A und 2G

	2A			2G	
Klon Nr.	AS-Sequenz Ladungen	NL	Klon Nr.	AS-Sequenz Ladungen	NL
1	VDYDGSECCSIM 0-0-00-00000	-3	1	RRVIFQWMVVAT ++0000000000	+2

7	PHVRVARPGIRG 000+00+000+0	+3	2	RRLDFSQKERAQ ++0-000+--+00	+2
10	SNVLVANMPTAL 000000000000	0	5	RRVIFQWMVVAT ++0000000000	+2
11	RCFLRIHRRLSR +000+00++00+	+5	25	RRRNCGYPYWGI +++000000000	+3
16	GRNHRQLGRPVR 0+00+000+00+	+4	26	LTNDLRRLGFGN 000-0++00000	+1
19	TTISLVACLEVW 000000000-00	-1	27	GIKPHGSRRRWC 00+0000++++00	+4
22	DCSPINASARPA -00000000+00	0	28	GDYGLQVGVRRV 0-0000000++0	+1
25	RTGGNGAESVIQ +000000-0000	0	33	VGVIYCGLARRQ 000000000++0	+2
27	SKVAYRVHEVKF 0+000+00-0+0	+2	34	LTDLSKRLEMAD 00-00++0-00-	-1
28	IGSIVAGVKSPA 00000000+000	+1	35	RIELSQTRRIGR +0-0000++00+	+3
32	WIIEGIGVPRIW 000-00000+00	0	38	RRVIFQWMVVAT ++0000000000	+2
36	KMIRKTDSEGLV +00++0-00000	+2	46	QGRRRKRKKICR 00++++++00+	+8
42	GEWQPMNRTKC 0-000000+0+0	+1	54	GRRRFGISVYHR 0+++0000000+	+4
46	DGEENQPGTTEG -0-000000-0	-4	57	VVASPDRRRVCG 00000-+++000	+2
51	FLVRALVVYPER 000+000000-+	+1	58	LTNDLRRLGFGN 000-0++00000	+1
55	GSNAALAFDKKV 00000000-++0	+1	62	GQERRRFKKGW 00-+++0++000	+4
56	VWNTGVYEQRSI 0000000-0+00	0	73	WDGVRVRGRRRT 0-00+0+0+++0	+4
67	LKSGGPSLRQHW 0+000000+000	+2	80	GQEGMLRRRRVG 00-000++++00	+3
70	LVPICPNRRRDI 0000000++++0	+2	81	TTWSRRRGMLLL 0000+++00000	+3

71	VKECVGRGSVHR 0+-000+0000+	+2	85	RRRNDRMDRGAR +++0-+0-+00+	+4
87	NVELKIVGAAGR 00-0+000000+	+1	102	TRVVGAAIIHLL 0+0000000000	+1
96	AFRRSVVLRVGP 00++0000+000	+3			
97	PPSTTVLLWRVD 000000000+0-	0			
103	GERATRWINRPI 0-+00+000+00	+2			
105	GPHWFLNVLLAV 000000000000	0			

Tabelle 15 Ladungen der Peptide aus den Versuchsreihen 3A und 3G

3A			3G		
Klon Nr.	AS-Sequenz Ladungen	NL	Klon Nr.	AS-Sequenz Ladungen	NL
26	IGSWREGSSGHD 0000+-00000-	-1	3	IGGRVQSRLTLV 000+000+0000	+2
28	IGADMGLISPRE 000-000000+-	-1	5	GALKIPMLVCLI 000+00000000	+1
29	HRAPTAAKLNVS 0+00000+0000	+2	6	DSIRSGGISILL -00+00000000	0
31	EGGQRRIRITH -0000++0+000	+2	7	RLIEVRRRSRIS +00-0+++0+00	+4
32	AWVGYPVAMVR 00000000000+	+1	11	KLRVRLPKLTEL +0+0+00+00-0	+3
35	ARALRCRVPRER 0+00+0+00+-+	+4	22	YSEKKRLILRPQ 00-+++000+00	+3
39	NYGEAFRQLDGA 000-00+00-00	-1	24	ARTRTHKVSSMQ 0+0+00+00000	+3
44	ARALRCRVPRER 0+00+0+00+-+	+4	27	PVLTEVMQNLSM 0000-0000000	-1
47	RWRHGTCQPDR +0+000000-+0	+2	28	GYWFVRGGRPSR 00000+00+00+	+3

49	SKGGARVRDKFL 0+000+0+-+00	+3	29	GRGISGIRSLRL 0+00000+00+0	+3
50	CVVAAGRIRDVI 000000+0+-00	+1	30	VVKWPALCRRQV 00+00000++00	+3
51	SRIRPGLGWGFR 0+0+0000000+	+3	34	PSNIAVAGDYAR 00000000-00+	0
55	VALTSRQRSASN 00000+0+00+0	+3	35	GIELVRETRIAK 00-00+-0+00+	+1
57	SVMLMLGRLSS 00000000+000	+1	37	RGMMRQGNPHL +000+0000000	+2
60	WIVGGGQQGLTT 000000000000	0	45	FRWLLNGRFVSL 0+00000+0000	+2
61	NGGRNKALRGGV 000+0+00+000	+3	46	ECRHEIAGMHSG -0+0-0000000	-1
65	LIVAQYWVTRGI 000000000+00	+1	47	GQQLRNVPLRTE 0000+0000+0-	+1
68	GERLSRMESPVR 0-+00+0-000+	+1	48	RGFHRLLRARRGR +000+000++0+	+5
69	KWRIGYEEQSYK +0+000-000+	+1	51	QLSLIHHAMLVG 000000000000	0
70	MSHQDGGSDGNT 0000-000-000	-2	52	RGWQQPDNRRGS +00000-0++00	+2
72	MPQKGSSIRRAR 000+0000++0+	+4	53	VTNISARTAWLA 000000+00000	+1
75	VALTSRQRSASN 00000+0+00+0	+3	57	KARWSWHTAREI +0+000000+-0	+2
76	ADAPTMGGSLRK 0-00000000++	+1	59	MEIKRWEMVIAN 0-0++0-00000	0
79	TSDRGPLELFID 00-+000-000-	-2	60	KGEARYMIRSSL +0-0+000+000	+2
83	TYNEEIIWQNAED 000-00000--	-4	62	DRVKSGAVEDIG -+0+0000--00	-1
85	VMLGLQMLRQAE 00000000+00-	0	68	EVQKPGRWTGTR -00+00+0000+	+2
87	TVRFVALAHKLR 00+000000+0+	+3	69	GLGIVLFLQLVIR 00000000000+	+1

90	IHDRDVQSFRKV 00-+-0000++0	+1	78	QTRWIGAFQCQRS 00+0000000+0	+2
			80	EAVGNKWSQVIV -0000+000000	0
			81	AKSGQVEENTVV 0+0000-0000	-2
			82	ILVTYQVADVRR 00000000-0++	+1
			86	DGEVFEWLAVPM -0-00-000000	-3
			87	RIFRFDGARPML +00+0-00+000	+2
			92	IITTWCTLRRVR 00000000++0+	+3

Summiert man die Ladungen an den einzelnen Positionen und berechnet man den prozentualen Anteil von positiv geladenen, negativ geladenen und ungeladenen Aminosäuren, erhält man die folgende Aufstellung:

Tabelle 16 Übersicht der Ladungen je Position

Ladung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
+	23	26	19	25	26	24	24	23	36	34	19	28
(%)	(16)	(18)	(13)	(17)	(18)	(17)	(17)	(16)	(25)	(24)	(13)	(20)
-	13	9	25	11	12	7	13	9	11	6	11	12
(%)	(9)	(6)	(10)	(8)	(8)	(5)	(9)	(6)	(8)	(4)	(8)	(8)
0	107	108	109	107	105	112	106	111	96	103	113	103
(%)	(75)	(76)	(76)	(75)	(73)	(78)	(74)	(78)	(67)	(72)	(79)	(72)

Ginge man auch bei dieser Betrachtung von einer Zufallsverteilung aus, so müßten bei 20 Aminosäuren, von denen jeweils zwei positiv bzw. negativ geladen sind, je Position durchschnittlich 10 % positiv geladene, 10 % negativ geladene und 80 % ungeladene Aminosäuren vorkommen. Dieses Verhältnis ist im vorliegenden Fall zugunsten der positiv geladenen Aminosäuren und zuungunsten der beiden anderen Gruppen verschoben. Besonders im hinteren Drittel häufen sich die positiven Ladungen. Hier zeigte sich in der

Häufigkeitsanalyse der Aminosäuren ein vermehrtes Vorkommen von (positiv geladenem) Arginin (R). Tatsächlich ergibt ein Vergleich der Tabellen 12 und 17, dass Arginin für 83 % der positiven Ladungen verantwortlich ist. Auch die Peptide, bei denen es zu einem Kettenabbruch aufgrund eines Stop-Codons in der DNA-Sequenz kommt (n=119), besitzen einen überdurchschnittlich hohen Anteil an positiv geladenem Arginin. 17 % der Positionen bis zum Kettenabbruch sind bei diesen unvollständigen Peptiden mit Arginin besetzt (bei den vollständigen 12er Peptiden beträgt der über die 12 Positionen gemittelte Anteil von Arginin 15 %). Das läßt vermuten, dass der strukturelle Kontext der Peptide im Thioredoxin nicht entscheidend für die Ausbildung einer Bindung ist.

Eine Aufstellung der Nettoladungen ist in Tabelle 17 wiedergegeben:

Tabelle 17 Nettoladungen der Bindungspeptide

Versuchsreihe	1S	1G	2A	2G	3A	3G	Gesamt
Klone mit NL = -2 (%)	0 (0)	2 (13)	0 (0)	0 (0)	2 (7)	1 (3)	5 (3)
Klone mit NL = -1 (%)	3 (15)	1 (7)	1 (4)	1 (5)	3 (11)	3 (9)	12 (8)
Klone mit NL = 0 (%)	8 (40)	2 (13)	7 (28)	0 (0)	2 (7)	5 (15)	24 (17)
Klone mit NL = +1 (%)	3 (15)	4 (27)	5 (20)	4 (19)	8 (29)	6 (18)	30 (21)
Klone mit NL = +2 (%)	4 (20)	4 (27)	6 (24)	6 (29)	3 (11)	9 (26)	32 (22)
Klone mit NL = +3 (%)	1 (5)	1 (7)	2 (8)	4 (19)	6 (21)	7 (21)	21 (15)
Klone mit NL = +4 (%)	0 (0)	1 (7)	1 (4)	5 (24)	3 (11)	1 (3)	11 (8)
Klone mit NL = +5 (%)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	2 (1)
Klone mit anderer NL (%)	1 (5)	0 (0)	2 (8)	1 (5)	1 (4)	1 (3)	6 (4)
Summe der Klone	20	15	25	21	28	34	143
Summe der Nettoladungen	+17	+14	+24	+55	+33	+46	+189
Durchschnittliche Nettoladung	+0,85	+0,93	+0,96	+2,62	+1,18	+1,35	+1,32

Im Durchschnitt sind die gefundenen Bindungspeptide positiv geladen (durchschnittliche Nettoladung = +1,32), wobei 96 % der Peptide eine Nettoladung zwischen -2 und +5 mit einem Maximum bei +2 (22 %) aufweisen. 43 % der Peptide besitzen eine NL von +1 oder +2.

Die Häufigkeiten der einzelnen Nettoladungen gibt Abbildung 5 wieder.

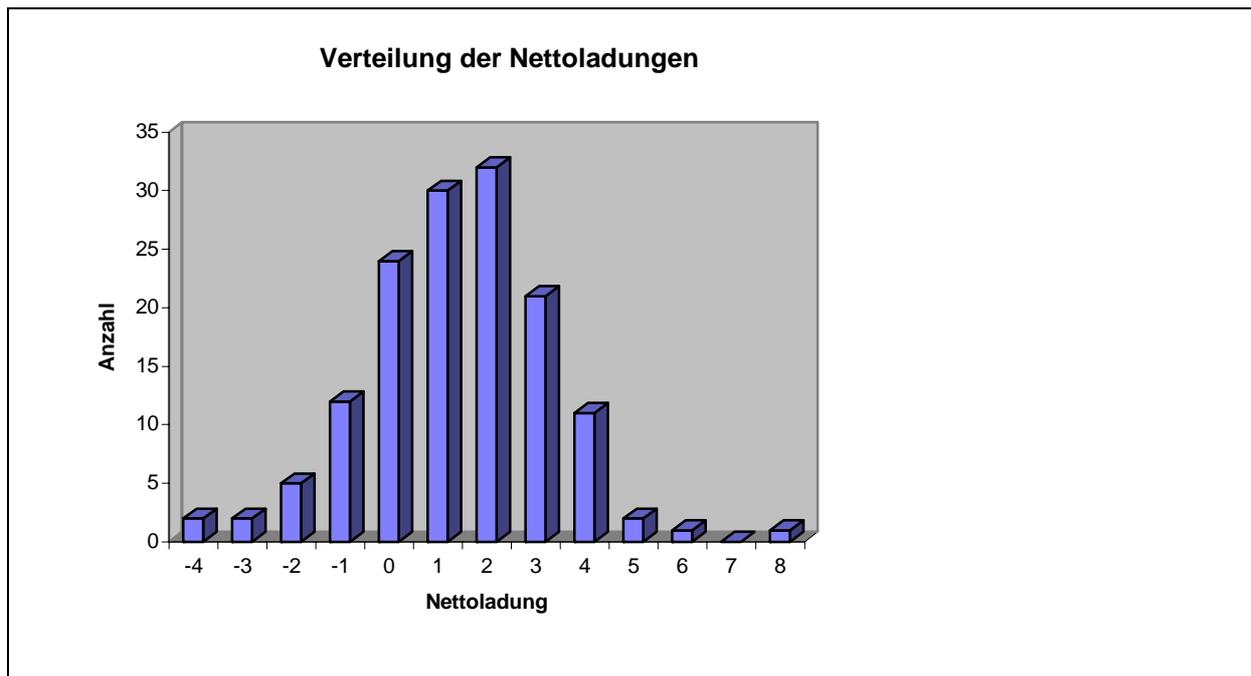


Abb. 5 Verteilung der Nettoladungen

4.5 Peptidsynthese

Um das Bindungsverhalten einiger der gefundenen Peptide zu charakterisieren, war es notwendig, diese anhand ihrer Aminosäuren-Sequenz zu synthetisieren. Dabei kam die Festphasenpeptidsynthese⁴⁴, basierend auf der Methode von Merrifield⁴⁵, zum Einsatz. Bei dieser wird die C-terminale Aminosäure des zu synthetisierenden Peptids über die Carboxylgruppe kovalent an ein unlösliches Polymer („Harz“) gebunden. Da es sich bei der Ausbildung einer Peptidbindung um einen endergonischen Prozeß handelt, muss die Aminosäure durch eine mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) vermittelte Veresterung mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) aktiviert werden (vgl. Abbildung 6).

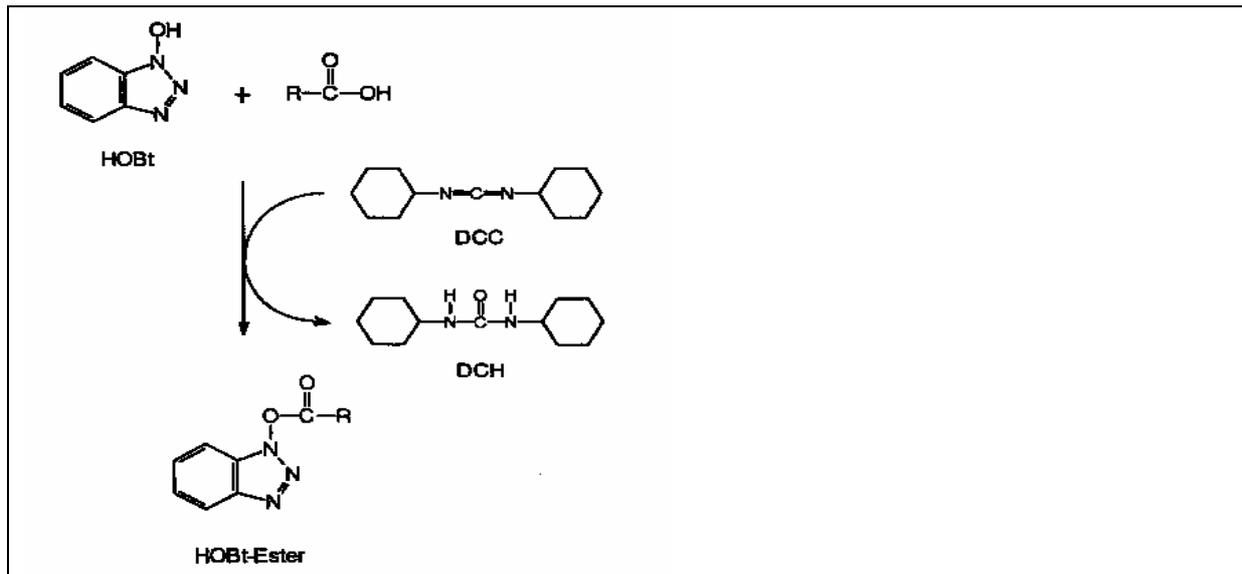


Abb. 6 Aktivierung einer Aminosäure durch DCC-vermittelte Veresterung mit N-Hydroxybenzotriazol

Der aktivierte Ester reagiert leicht und nahezu quantitativ mit der sich am Harz befindenden N-terminalen Aminosäure des wachsenden Peptids.

Aufgrund der Multifunktionalität der Aminosäuren müssen der N-Terminus sowie eventuell vorhandene Drittfunktionen der anzukoppelnden Aminosäure geschützt werden, um eine eindeutige Reaktionsführung zu ermöglichen. Dabei wird die N-terminale Schutzgruppe so gewählt, dass bei ihrer Abspaltung weder die Peptidbindungen, noch andere funktionelle Zentren angegriffen werden, da es ansonsten zur Neuintiierung von Peptidsynthesen an den frei werdenden funktionellen Gruppen kommen kann. Hier hat sich in der modernen Schutzgruppentechnik die unter schwach basischen Bedingungen abspaltbare Fluorenyl-9-methoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc, Abbildung 7) durchgesetzt⁴⁴.

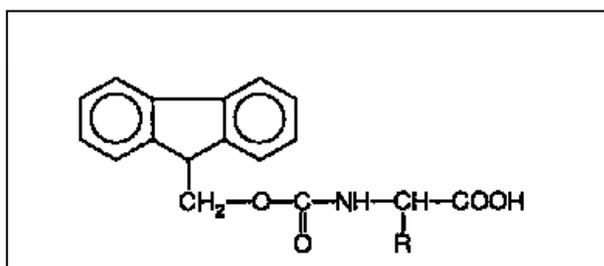


Abb. 7 Chemische Struktur einer Fmoc-Aminosäure

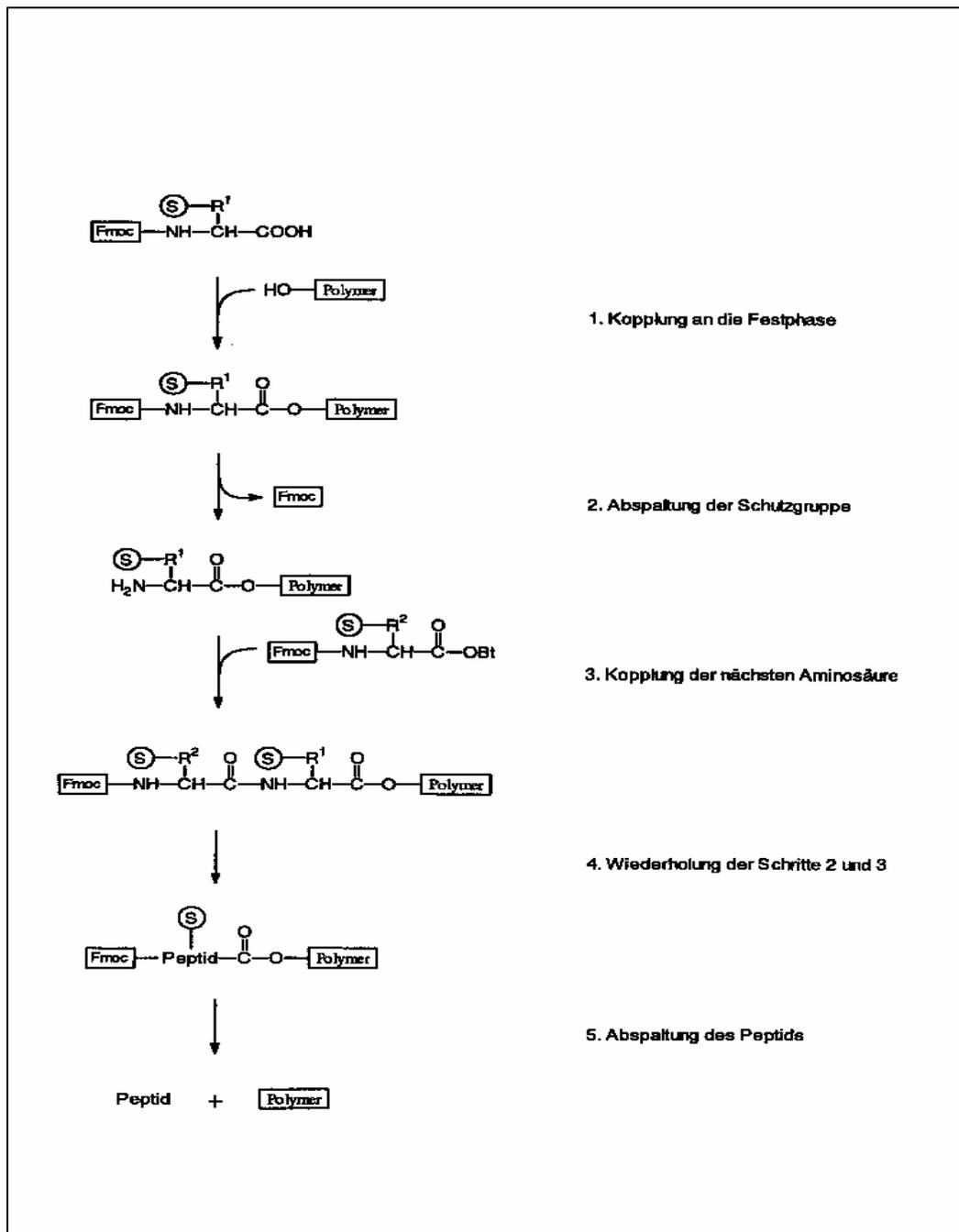


Abb. 8 Schema der Festphasensynthese mit der Fmoc-Schutzgruppentechnik

Diese ermöglicht die Verwendung von säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen (Boc, ^tBu , Trityl,...) und Harz/Peptidbindungen. Als Harz verwendet man ein mit 1% Vinylpyridin quervernetztes Polystyrol, welches durch eine p-Alkoxy-benzylalkoholgruppe funktionalisiert wird⁴⁴. Die Einführung der paraständigen Alkoxygruppe schwächt die Benzylesterbindung so stark, dass eine Abspaltung unter milden aciden Bedingungen erfolgen kann. Durch Verwendung eines Überschusses der anzukoppelnden Aminosäure und der durch die Automatisierung bedingten einfachen und verlustfreien Reinigung der Zwischenstufen lässt

sich die Ausbeute des Produktes stark erhöhen. Die einzelnen Schritte der Peptidsynthese sind in Abbildung 8 dargestellt. Nach der Abspaltung der Peptide vom Harz wurden diese lyophilisiert und anschließend unter Verwendung von Amprep™ - Minicolumns aufgereinigt. Folgende Peptide wurden für die Bindungsstudien ausgewählt:

Tabelle 18 Synthetisierte Peptide

Bezeichnung	Versuchsreihe – Nr.	AS-Sequenz	Nettoladung
P 1	1G – 46	LSFIRQLGRRYR	+ 4
P 2	1G – 53	TRPTLTWNRVRL	+ 4
P 3	2A – 11	RCFLRIHRRLSR	+ 5
P 4	2A – 19	TTISLVACLEVW	- 1
P 5	2A – 51	FLVRLVVYPER	+ 1
P 6	2A – 103	GERATRWINRPI	+ 2
P 7	2G – 1	RRVIFQWMVAT	+ 2
P 8	2G – 54	GRRRFGISVYHR	+ 4

4.6 Bindungsstudien

4.6.1 Oberflächenplasmonenresonanz^{54, 55, 56, 57, 58}

Herkömmliche Methoden zur Analyse des Bindungsverhaltens zu untersuchender Moleküle arbeiten zumeist mit immunologischen Markierungen. Sie liefern zwar quantitative Information, erlauben aber keine Aussagen über den Bindungsprozeß an sich. Eine Methode, die ohne Markierungen auskommt und mit der sich kinetische Untersuchungen durchführen lassen, stellt die von Raether et al. beschriebene Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse dar.

Oberflächenplasmonenresonanz (SPR = surface plasmon resonance) ist ein optischer Effekt, mit dessen Hilfe es möglich ist, Brechungsindexveränderungen einer Lösung in unmittelbarer Nähe einer Metalloberfläche nachzuweisen. Grundlage der Methode ist das Phänomen der Totalreflexion. Totalreflexion entsteht an Grenzflächen zwischen Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes, wenn das einfallende Licht, vom optisch dichteren Medium kommend, in einem Winkel auf das optisch weniger dichte Medium stößt, der einen

kritischen Wert⁵⁹ übersteigt. Nahezu die gesamte Energie wird dann nach dem Reflexionsgesetz in das erste, also dichtere Medium reflektiert, nur ein kleiner Teil formiert eine elektromagnetische Welle in Richtung optisch weniger dichtes Medium. Überzieht man die Grenzfläche mit einer dünnen, leitenden Folie (in diesem Fall eine Goldfolie), kann das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz auftreten: bei einem bestimmten Einfallswinkel bewirkt das einfallende Licht eine Resonanzreaktion bei freien Ladungsträgern an der Metalloberfläche. Dieser Vorgang entzieht dem einfallenden Licht Energie, die sich als elektromagnetische Welle in Richtung optisch weniger dichtes Medium ausbreitet. Das ausfallende Licht hat folglich eine geringere Intensität. Richtet man das einfallende Licht fächerförmig auf die Grenzfläche, resultiert ein „Schatten“ im reflektierten Lichtfächer, und zwar bei dem Ausfallswinkel, der dem Resonanz(einfallswinkel) entspricht.

Der Resonanzwinkel hängt von einer Reihe von Faktoren wie der Wellenlänge des einfallenden Lichtes sowie der Struktur und Dicke der Metallfolie ab, besonders aber vom Brechungsindex

des optisch dünneren Mediums. Werden die anderen Faktoren konstant gehalten, ist der Resonanzwinkel ein direktes Maß für den Brechungsindex dieses Mediums.^{60, 61, 62}

Bindet man ein Molekül kovalent an die Metallfolie, und ist das optisch dünnere Medium eine Lösung mit potentiellen Liganden für das immobilisierte Molekül, so kommt es im Falle einer Bindung zwischen den beiden Molekülen zu einer Konzentrationsänderung der Lösung in unmittelbarer Nähe der Metallfolie und damit zu einer Änderung des Brechungsindex. Dadurch verändert sich der Resonanzwinkel und der dazugehörige Ausfallswinkel, bei dem der Abfall der Lichtintensität auftritt. Der Abfall der Lichtintensität kann gemessen werden und ist ein direktes Maß für die Menge des gebundenen Liganden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Versuchsanordnung wird als Maßeinheit die resonance unit (RU) benutzt, wobei 1000 RU einer Konzentrationsänderung von 1 ng/mm^2 entspricht.

4.6.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Bindungspeptide

Die Bindungsstudien wurden mit dem Gerät Biacore[®] X durchgeführt. Als an die Metallfolie gebundener Bindungspartner kam der humane A_{2a}-Rezeptor zum Einsatz, als freie

Bindungspartner die ausgewählten acht Peptide. Es wurden 40 ng des Rezeptors auf einer Metallfolie in Form des F1-Chips immobilisiert. Die acht ausgewählten Peptide wurden in Lösungen der Konzentrationen $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$ und $1000\mu\text{M}$ untersucht. Das folgende Diagramm gibt die Bindungskinetik des Peptids P 1 ($1000\mu\text{M}$) wieder:

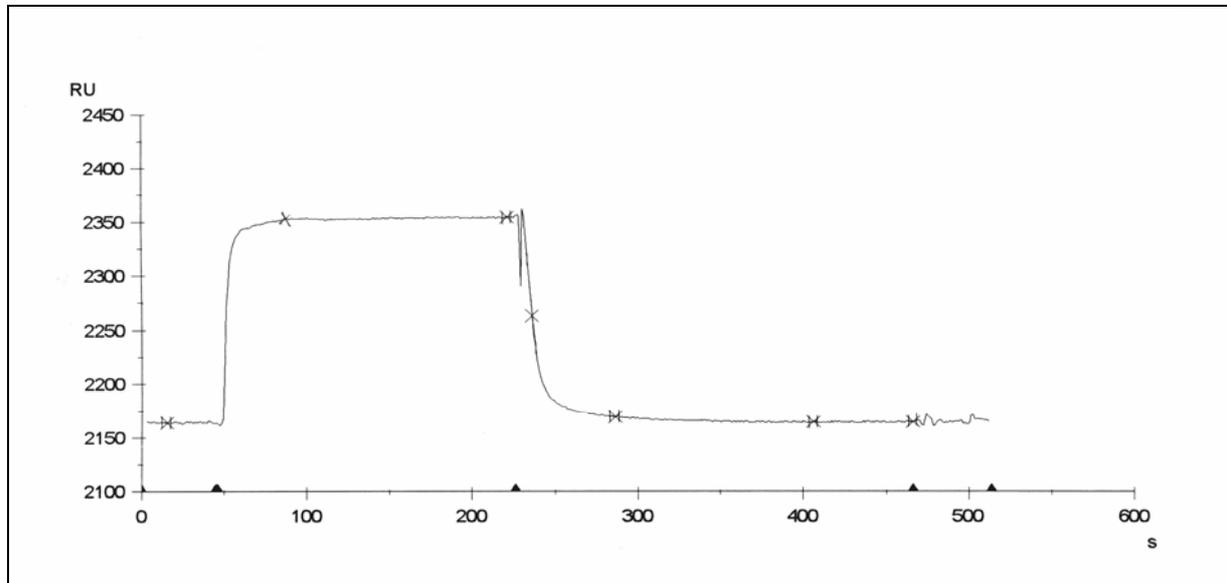


Abb. 9 Bindungskinetik des Peptids P 1 (Originalregistrierung)

Zunächst verläuft die Kurve waagrecht. Dies entspricht der Ausgangssituation vor Zugabe des Peptids: eine (konstante) Menge Rezeptorprotein ist auf dem F1-Chip immobilisiert. Dieser Teil der Kurve wird als „Baseline“ bezeichnet. Nach Zugabe der Peptidlösung in jeweils konstanter Konzentration kommt es infolge von Bindungsreaktionen zu der oben beschriebenen Änderung des Brechungsindex, die Konzentrationserhöhung nahe des F1-Chips wird als Erhöhung der Resonance-Unit-Zahl detektiert. Mit der Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation der Peptide an und Dissoziation vom Rezeptor ein. Es resultiert wieder ein waagerechter Verlauf der Kurve, allerdings mit RU-Werten, die höher als im Bereich der Baseline sind. Nachdem die Zufuhr von Peptidlösung gestoppt wird, überwiegt die Dissoziation, es kommt zu einem Abfallen der Kurve, bis schließlich das Niveau der Baseline erreicht wird.

Die in dieser Arbeit ermittelten Meßkurven zeigen zum Teil einen sehr steilen Anstieg nach Zugabe der Peptidlösung. Dies spricht für das Vorliegen eines „Bulk-Effekts“: allein die Massenzunahme im Bereich des Meßchips führt zu einer Erhöhung der RU-Zahl, ohne daß Bindungsreaktionen vorliegen müssen. Ein Bulk-Effekt läßt sich bei dieser

Versuchsordnung nicht vermeiden, da relativ hohe Konzentrationen der Peptidlösungen notwendig sind. Arbeitete man mit geringeren Konzentrationen, würde sich der Bulk-Effekt minimieren, auf der anderen Seite würde es aufgrund der Kleinheit der Peptidmoleküle zu kaum wahrnehmbaren Änderungen der RU-Zahl kommen, da die Massenzunahme im Bereich des F1-Chips detektiert wird. Die in der folgenden Auswertung gewonnenen Zahlenwerte hinsichtlich der Bindungseigenschaften der Peptide sind vor dem Hintergrund des beschriebenen Bulk-Effekts zu betrachten: sie ermöglichen eine Vergleichbarkeit der Bindungsaffinitäten untereinander und eine größenordnungsmäßige Einordnung im Vergleich zu bekannten Bindungsreaktionen.

Als Maß für die Affinität der Bindungspeptide wurde die Affinitätskonstante im Gleichgewicht,

$K_{D,eq}^*$, betrachtet, welche mittels Scatchard Plot (s. Material und Methoden, 3.2.5.2) ermittelt wurde. Das Sternchen * wurde aufgrund des oben beschriebenen Bulk-Effekts eingeführt.

Tabelle 19 Affinitäten der Bindungspeptide

Peptid	Konzentration Der Peptidlösung (μM)	Signaldifferenz zur Baseline im Gleichgewicht (RU)	$K_{D,eq}^*$ (M)
P 1	1000	190	$1 * 10^{-4}$
	500	163	
	100	78	
	50	50	
	10	18	
	5	16	
	1	8	
P 2	1000	168	$3,75 * 10^{-5}$
	500	92	
	100	63	
	50	48	
	10	23	
	5	26	

	1	16	
P 3	1000	158	$2,5 * 10^{-5}$
	500	142	
	100	123	
	50	105	
	10	62	
	5	50	
	1	14	
P 4	1000	0	-
	500	0	
	100	0	
	50	0	
	10	0	
	5	0	
	1	0	
P 5	1000	0	-
	500	0	
	100	0	
	50	0	
	10	0	
	5	0	
	1	0	
P 6	1000	30	$5,6 * 10^{-4}$
	500	14	
	100	6	
	50	2	
	10	0	
	5	0	
	1	0	
P 7	1000	0	-
	500	0	
	100	0	

	50	0	
	10	0	
	5	0	
	1	0	
P 8	1000	71	$9 * 10^{-5}$
	500	46	
	100	31	
	50	19	
	10	4	
	5	0	
	1	0	

Das folgende Balkendiagramm gibt die Stärke der Bindungsaffinitäten, gemessen in $1/K_{D,eq^*}$, grafisch wieder:

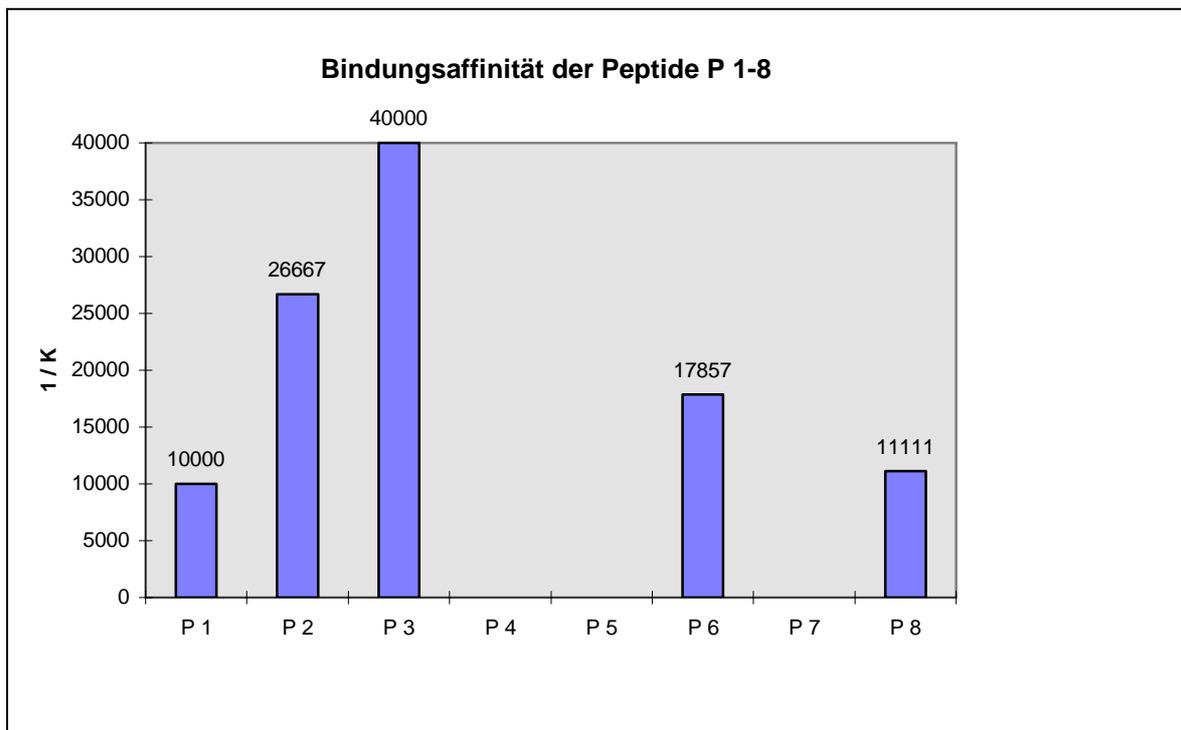


Abb. 10 Bindungsaffinität der Peptide P 1-8

Drei der acht Peptide (P 4, P 5 und P 7) zeigen in der Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse keinen Hinweis für eine Bindungsaktivität. Die Affinitätskonstanten der Peptide P1, P 2, P 3, P 6 und P 8 liegen in einem Bereich zwischen $2,5 * 10^{-5}$ M und $1 * 10^{-4}$ M. Dieser Bereich ist vergleichbar mit der Stärke von Wechselwirkungen zwischen einem

monoklonalen Antikörper, der spezifisch ist für α -1,4-verknüpfte Oligosaccharide, und Tetraglucose ($K_D=1,3 * 10^{-4}$).⁶³

4.7 Funktionelle Studien

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse wurde die Interaktion der Bindungspeptide mit dem isolierten humanen A_{2a} -Rezeptor untersucht. Um zu testen, ob die Peptide auch einen Effekt in einem biologischen System auslösen, wurde ihr Einfluss auf den Koronarwiderstand am isolierten Mäuseherzen analysiert, wobei die koronare Vasodilatation bekanntermaßen über A_2 -Rezeptoren vermittelt wird⁶⁴.

In dem verwendeten Versuchsaufbau nach Langendorff⁵⁰ wurde das isolierte Mäuseherz über die Aorta retrograd mit einem konstanten Druck von 100 mmHg perfundiert. Bei konstantem Druck ist die gemessene Flussgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum koronaren Widerstand.

Das Peptid P 1 wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt, ein Zehntel der Konzentration, die dem am isolierten Rezeptor ermittelten K_{D,eq^*} -Wert entspricht. Neben dem praktischen Grund, dass nur wenig Peptidmaterial vorlag, wurde für die Wahl der eingesetzten Konzentration die Tatsache berücksichtigt, dass bezüglich der A_{2a} -vermittelten Koronardilatation eine große Rezeptorreserve (95 % für die halbmaximale bzw. 70 % für die nahezu maximale Dilatation) existiert.⁶⁵ Außerdem kann vermutet werden, dass die Affinität am isolierten Rezeptor auf einer unnatürlichen Oberfläche schlechter als in vivo ist.

Die in Abbildung 11 wiedergegebene Originalregistrierung gibt den typischen zeitlichen Verlauf einer Adenosin-vermittelten Koronardilatation sowie den Einfluss des Peptids P 1 wieder. Wie aus den in Abbildung 12 zusammengefassten Ergebnissen zu sehen ist, führt die Gabe des P 1-Peptids regelmäßig zu einer ca. 15- bis 20-prozentigen Vasokonstriktion. Bei Anwesenheit des P 1-Peptids war jedoch die Koronarantwort auf Adenosin nicht signifikant vermindert, allerdings bei hoher Standardabweichung. Offensichtlich war der Effekt von P 1 reversibel, da die Adenosinantwort, aber auch die reaktive Hyperämie (s. Abb. 11) am Ende des Versuchs derjenigen zu Beginn des Versuchs entsprach.

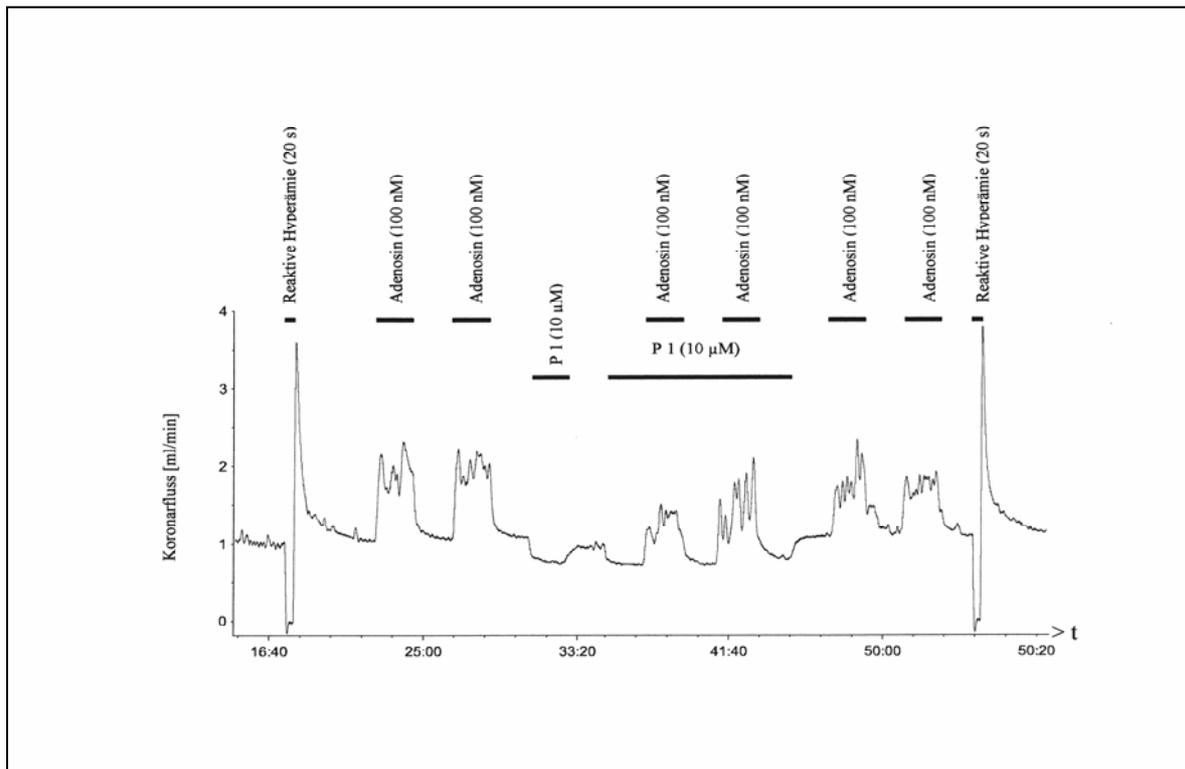


Abb. 11 Repräsentative Registrierung der koronaren Flussgeschwindigkeit in einem nach Langendorff perfundierten Herzen

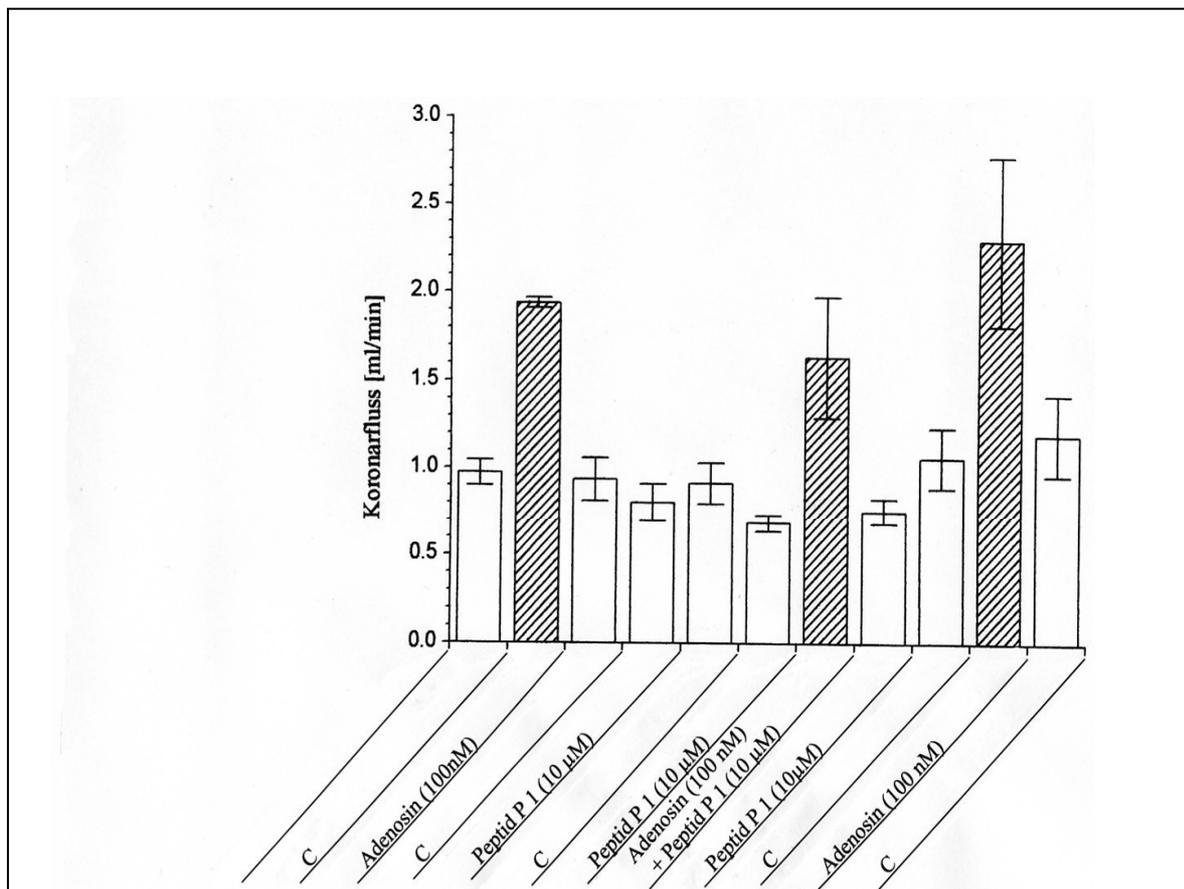


Abb. 12 Koronare Flussgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom zugeführten Substrat [n=3, C=Kontrolle ohne Substrat]

5 Diskussion

Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit war, dass unter Verwendung der peptidpräsentierenden Bakterienbank FliTrx™ Liganden für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor gewonnen werden konnten, wobei die Affinitätskonstanten im Bereich zwischen $2,5 * 10^{-5}$ M und $1 * 10^{-4}$ M lagen. Dabei konnte exemplarisch gezeigt werden, dass es möglich ist, Peptide als Liganden für diesen Rezeptor zu generieren, der als natürliche Liganden Nicht-Peptid-Moleküle besitzt.

Vom Prinzip, Liganden für Rezeptormoleküle zu ermitteln, wird in der biomedizinischen Forschung häufig Gebrauch gemacht.⁶⁶ Zum einen können Erkenntnisse über die Struktur des Zielmoleküls, vor allem über dessen Bindungsstellen, gewonnen werden.⁶⁷ Als besonders nützlich erweisen sich Liganden jedoch, wenn es darum geht, einen Rezeptor in Bezug auf seine Funktion (Erkennung, Verarbeitung und Weitergabe von Signalen) zu charakterisieren.⁶⁸ Neben Liganden mit agonistischen Eigenschaften, die einen physiologischen Weg der Signalvermittlung nachahmen, kommen Antagonisten zum Einsatz, die diesen Weg blockieren, sei es durch Verdrängung des physiologischen Liganden (kompetitiver Antagonismus) oder durch Konformationsänderung des Rezeptormoleküls (nicht-kompetitiver Antagonismus).⁶⁹ Gerade durch den Einsatz von Antagonisten können auch bis dahin unbekannte Funktionen des Rezeptors erkannt werden.⁷⁰ Neben ihrem Einsatz in der Grundlagenforschung ermöglichen funktionelle Liganden neue Wege in der Therapie.⁷¹ Dabei können, je nach Therapieziel, sowohl Agonisten, als auch Antagonisten eingesetzt werden.

In der Vergangenheit wurden empirisch wirksame Naturstoffe als Medikamente eingesetzt, lange bevor bekannt war, dass es sich um Agonisten oder Antagonisten an körpereigenen Rezeptormolekülen handelt.⁷² Die Charakterisierung des Aufbaus und der Struktur von Wirkstoff und Zielmolekül ermöglichten es, die bekannten, mehr oder weniger zufällig gefundenen Medikamente durch chemische Modifikationen zu optimieren. Eine höhere Affinität kann dabei oft mit einer besseren Wirksamkeit gleichgesetzt werden, eine bessere Spezifität mit einer Reduktion von Nebenwirkungen (durch Bindung des Wirkstoffs an andere ähnliche Rezeptoren oder Rezeptor-Subtypen).

Auch die bisher bekannten Agonisten und Antagonisten für Adenosinrezeptoren sind zum größten Teil chemische Modifikationen von Adenosin (Agonisten) bzw. Xanthin-Derivaten (Antagonisten), daneben gibt es noch einige Nicht-Xanthin-Antagonisten: A₁-selektive Agonisten zum Beispiel werden durch N⁶-Substitution von Adenosin abgeleitet (z.B. N⁶-Cyclopentyladenosin), es existieren eine Reihe 2-substituierte A_{2a}-selektive Agonisten, N-Benzyl-Substitution führt zu A₃-selektiven Agonisten. Die Xanthine CPX und CSC stellen relativ selektive Antagonisten für den A₁- bzw. A_{2a}-Rezeptor dar.⁷³

Da diese empirische Vorgehensweise sehr zeitintensiv ist und für viele Rezeptoren noch keine oder nicht sehr spezifische Bindungsmoleküle ermittelt wurden, wurden neue Methoden der Ligandengewinnung entwickelt. Hier spielt die Peptidforschung eine herausragende Rolle, da Peptide *in vivo* selbst die Funktion von Liganden bei der rezeptorvermittelten Signaltransduktion wahrnehmen.⁷⁴ Eine Vielzahl physiologischer und biochemischer Prozesse werden durch Peptide beeinflusst: bei Vertebraten sind etwa 100 Peptide mit Funktionen im zentralen und peripheren Nervensystem, bei immunologischen Prozessen, im Herz-Kreislauf-System und im Magen-Darm-Trakt bekannt.⁷⁵ Die Gewinnung von Peptiden aus tierischen oder menschlichen Quellen ist jedoch oft problematisch. Neben der limitierten Verfügbarkeit der tierischen und besonders menschlichen Ausgangsmaterialien, der komplizierten Logistik beim Sammeln und Lagern der entsprechenden Organe und der geringen Konzentration der Peptidmediatoren, die oft nur zwischen 10⁻¹² und 10⁻¹⁵ mol/mg Frischmasse liegt, sind in diesem Zusammenhang vor allem die gesundheitlichen Gefahren zu nennen. Beispiele aus der Vergangenheit sind die Faktor-VIII-Präparate für Bluterkrankende aus HIV-kontaminierten Blutspenden⁷⁶ und immunologische Reaktionen auf Insulin aus tierischen Quellen.⁷⁷ Auch Fälle des Creutzfeld-Jakob-Syndroms wurden nach Gabe von kontaminierten Wachstumshormonpräparaten beschrieben, weil vor der Etablierung der gentechnischen Produktion dieses Hormon bis 1985 aus menschlichen Hypophysen nach Autopsie isoliert wurde.⁷⁸ Diese Problematik zeigt die Notwendigkeit einer synthetischen Gewinnung von Peptidwirkstoffen auf, die durch die Etablierung der Festphasen-Peptidsynthese nach Merrifield⁴³ und schließlich durch die gentechnische Gewinnung von Peptiden mittels DNA-Rekombination verwirklicht werden konnte.⁷⁹ Am Beginn dieser Entwicklung steht die Strukturaufklärung von Oxytocin und Vasopressin sowie deren chemische Synthese durch Du Vigneaud Anfang der fünfziger Jahre.⁸⁰ Seitdem konnte eine immer größer werdende Zahl von Pharmapeptiden entwickelt werden.⁸¹

Enalapril (Pres®, Xanef®, Retinec®, Retinen®) ist ein Dipeptid,⁸² das wie Captopril als Antihypertensivum therapeutisch eingesetzt wird.⁸³ Das Tripeptid Thyroliberin kommt unter verschiedenen Handelsnamen (Relifact®, Antepan®, TRH „Roche“® u.a.) zur Schilddrüsen- und Hypophysenfunktionsprüfung zum Einsatz.⁸⁴ Das synthetische Pentagastrin (Peptavlon®) wird zur Stimulierung der Magensäuresekretion bei der Magensaftanalyse eingesetzt,⁸⁵ während das ebenso große Thymopentin (Timunox®) als Immunstimulans Bedeutung hat.⁸⁶ Ein synthetisches Analogon des Angiotensin II, das Angiotensinamid (Hypertensin CIBA®) findet als kompetitiver Antagonist als Antihypotonikum Verwendung.⁸⁷ Das 8-Peptid des CCK Sicalid (Kinevac®) dient als Choleretikum,⁸⁸ während das Saralasinacetat (Sarenin®) Anwendung bei der Diagnostik Angiotensin II-abhängiger Hypertonieformen findet.⁸⁹ Auch in der Reihe der Nonapeptide kommen interessante Peptid-Fertigarzneimittel vor. Das erste in einem Laboratorium synthetisierte Peptidhormon, das Oxytocin, ist ein unter verschiedenen Handelsnamen (Orasthin®, Oxytocin „Ferring“®, Partocon®, Oxytocin Horm®, Pitocin Buccal®, Syntocinon® u.a.) eingesetztes Wehenmittel.⁹⁰ Bei Diabetes insipidus wird das Desamino-D-Arg-Vasopressin (DDAVP), auch Desmopressin (Minirin®) genannt, neben anderen Arzneimitteln, die sich vom Vasopressin ableiten, therapeutisch genutzt.⁹¹

Das Spektrum der Peptidforschung ist vielfältig, es umfaßt die klassischen Methoden der Analytik, Synthese, Isolierung, Strukturaufklärung und Konformationsanalyse, aber auch die modernen Wege des Peptiddesigns durch Computersimulationen („Molecular Modeling“)⁹² und Screeningmethoden, die es ermöglichen, in kurzer Zeit aus Millionen von Peptiden mögliche Leitstrukturen für pharmazeutische Wirkstoffe und für die Grundlagenforschung zu ermitteln.⁹³ Zu diesen Screeningmethoden gehören die in der Einleitung beschriebenen peptidpräsentierenden Phagen- und Bakterienbanken.

In dieser Arbeit wurde die FliTrx™-Bakterienbank¹⁷ dazu eingesetzt, Bindungspeptide für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor zu selektionieren. Nach der eigentlichen Selektion („Panning“) gegen den immobilisierten Rezeptor wurde die DNA der selektierten Bakterien präpariert und die DNA-Sequenzen der Bindungspeptide, der einzige Unterschied zwischen den sonst gleichen Bakterien, bestimmt. Die DNA-Sequenzen wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt, diese auf Muster und Wiederholungen untereinander und auf Ähnlichkeiten mit bisher bekannten Sequenzen untersucht. Nach sechs Versuchsreihen wurde von 315 der 580 gewonnenen Klone die DNA- und Aminosäuresequenz ermittelt. 143

Sequenzen ergaben ein 12 Aminosäuren umfassendes Peptid ohne Kettenabbruch oder Verschiebung des Lesemusters. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden diese 143 Peptide näher betrachtet.

Zunächst wurde untersucht, ob Wiederholungen von ganzen Sequenzen vorlagen oder Muster in bestimmten Abschnitten auftraten. Nur drei Sequenzen kamen wiederholt vor: RRVIFQWMVVAT (2G/1, 2G/5 und 2G/38), ARALRCRVPRER (3A/35 und 3A/44) und VALTSRQRSAKN (3A/55 und 3A/75). Bei der Suche nach Mustern, die den Vergleich jeder Aminosäuresequenz mit allen übrigen 142 Sequenzen, auch unter Verschiebung des Leserasters, umfaßte, konnte nur eine Teilsequenz (VVL) ermittelt werden, die sich in fünf Sequenzen – an unterschiedlichen Positionen – wiederfindet (1S/7, 1G/55, 1G/56, 2A/96, und 3G/5). Hinsichtlich der Häufigkeit einzelner Aminosäure ließ sich feststellen, dass Arginin und die Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette überdurchschnittlich häufig vertreten waren. Dabei zeigten diese Aminosäuren Präferenzen für bestimmte Positionen, die aber über die ganze Sequenz verteilt waren.

Diese Daten legen den Schluss nahe, dass ein bestimmtes Sequenzmuster nicht der entscheidende Faktor für die Selektion der gefundenen Peptide war. Die Tatsache, daß mehr als ein Drittel (n=119) der ermittelten DNA-Sequenzen Stop-Codons aufwiesen, läßt vermuten, dass auch der dreidimensionale Kontext, in dem die übrigen Peptide von der Bakterienbank präsentiert wurden, als nicht entscheidend für das Ergebnis zu werten ist.

Die anschließende Analyse der Ladungen ergab, dass an allen Positionen positiv geladene Aminosäuren überdurchschnittlich häufig vertreten waren. Dabei war Arginin für 83 % der positiven Ladungen verantwortlich, im Mittel bestanden die untersuchten Sequenzen zu 15 % aus Arginin. Der Anteil von Arginin in den Peptiden, deren Sequenzen Stop-Codons aufwiesen, lag mit 17 % in einem vergleichbaren Bereich. Auch die Verteilung der Nettoladungen der Peptide wies ihr Maximum im positiven Bereich bei +2 auf, der Durchschnittswert betrug +1,32. Offensichtlich war das Vorhandensein positiver Ladungen an sich ein Selektionsvorteil. Betrachtet man die Aminosäuresequenz des Rezeptors, so wäre in diesem Fall die geeigneteste Stelle zur Ausbildung ionischer Wechselwirkungen der extrazelluläre Loop zwischen dem 4. und 5. Transmembran-Segment (s. Abbildung 13). Weil die Nettoladungen der Bindungspeptide im Durchschnitt im positiven Bereich liegen, könnten ionische Wechselwirkungen bei der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes eine Rolle

spielen. Dazu müßten Teile des humanen Adenosin_{2a}-Rezeptors eine negative Ladung aufweisen. Ordnet man der Aminosäuresequenz des Rezeptors (vgl. Abbildung 13) die Einzelladungen zu, so erhält man folgende Darstellung:

1	<u>0000000000</u>	<u>00-0000000</u>	<u>0000000000</u>	<u>0000000000</u>	<u>0000000000</u>	<u>0-00000000</u>
61	<u>0000000000</u>	<u>0000000000</u>	<u>0000000000</u>	<u>0000000000</u>	-+0000+000	+00000000+
121	<u>0+00000000</u>	<u>0000000000</u>	<u>000000000+</u>	-0+0000000	-0000000--	0000000000
181	<u>0000000000</u>	<u>00000000+0</u>	<u>0000++00+0</u>	0-000000-+	0+0000+-00	00+0000000
241	<u>0000000000</u>	<u>0000000000</u>	<u>-000000000</u>	<u>0000000000</u>	<u>0000000000</u>	+0+-0+000+
301	+00+0000+0	0-00+00000	0+0000000-	0-0000+000	0000000000	0000-++000
361	0000000000	00-0000000	0-0-0000-0	+0000-0000	--0000-000	00

Abb. 13 Einzelladungen der Sequenz des humanen Adenosin_{2a}-Rezeptors („+“ = positiv geladene Aminosäure, „-“ = negativ geladene Aminosäure, 0 = elektrisch neutrale Aminosäure)

Hierbei sind die Transmembran-Segmente unterstrichen, die Sequenz beginnt (Position 1) beim nach extrazellulär weisenden N-Terminus. Zwischen dem 4. und 5. Transmembran-Segment befindet sich ein extrazellulärer Loop, der vier negativ geladene Aminosäuren aufweist. Dies wäre eine geeignete Stelle zur Ausbildung ionischer Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Bindungspeptiden und dem Rezeptor. Der genaue Bindungsort der Peptide bleibt unklar, die funktionellen Studien, auf deren Ergebnisse weiter unten eingegangen wird, machen es jedoch unwahrscheinlich, dass er dem eigentlichen, zentral-geschützt liegenden Adenosin-Bindungsort entspricht.

Um die Bindungsstärke der Peptide zu untersuchen, wurden acht Peptide synthetisiert und ihr Bindungsverhalten unter Verwendung der Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse charakterisiert. Die Werte für die Affinitätskonstanten, welche mittels Scatchard Plot ermittelt wurden, lagen in einem Bereich zwischen $2,5 \cdot 10^{-5}$ M und $1 \cdot 10^{-4}$ M. Dies ist bei gleicher Analytik-Methode ein Bereich, in dem auch monoklonale Antikörper z. B. gegen α -1,4-verknüpfte Oligosaccharide und Tetraglucose interagieren.⁶³ Ein direkter Vergleich mit bekannten (Ant)agonisten für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor ist nicht möglich, da bisher keine Bindungsstudien unter Verwendung der Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse durchgeführt wurden; die in der folgenden Tabelle wiedergegebenen Affinitätskonstanten wurden mittels Bindungsinhibition von Radioliganden an Ratten-Phäochromozytomzellen ermittelt.⁷³

Tabelle 20 Bindungsstärke von Adenosin_{2a}-Rezeptor-Agonisten und –Antagonisten

Agonisten	K _i (nM)	Xanthin-Antagonisten	K _i (nM)	Nicht-Xanthin-Antagonisten	K _i (nM)
DPMA	4,4	PD 115,199	26	CGS 15943	3,3
NECA	10	CSC	54	CP 66,713	22
CGS 21680	15	XAC	63	HTQZ	124
IB-MECA	56	8-PX	180	Tracazolat	1500
R-PIA	120	CPX	470	N-0861	6100
S-PIA	220	8-PT	850	Alloxazin	21000
CPA	460	8-p-SPX	1400		
SPA	8900	CPT	1400		
		8-p-SPX	14000		
		CMPX	16000		
		Theophyllin	22000		
		Koffein	45000		

Bei fehlender absoluter Vergleichbarkeit kann man die Bindungsstärke der untersuchten Peptide der Größenordnung nach in den Bereich der klassischen Methylxanthine Koffein und Theophyllin einordnen.

Schließlich konnte am isolierten und nach Langendorff perfundierten Mäuseherzen für eines der Peptide (P 1) eine antagonistische Funktion im Sinne einer reduzierten koronaren Durchblutung nachgewiesen werden. Da der Koronartonus und damit der Koronarfluss über Adenosin₂-Rezeptoren vermittelt wird⁶⁴, könnte man vermuten, dass dem beobachteten Effekt eine Blockierung am Adenosinrezeptor im Sinne eines direkten Antagonismus zugrunde liegt. Die gleichzeitige Zufuhr von Peptid und Adenosin führte jedoch nicht zu einer signifikanten Verminderung des koronaren Flusses, so dass diese Annahme unwahrscheinlich und der Effekt als eher unspezifisch zu betrachten ist.

Insgesamt war es durch den Einsatz der gewählten Methoden möglich, Bindungspeptide mit der oben beschriebenen Affinität zum humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor zu gewinnen, wobei am Beispiel eines Peptides auch eine funktionelle Eigenschaft im Sinne einer Vasokonstriktion nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte am Beispiel des humanen Adenosin_{2a}-Rezeptors gezeigt werden, dass es möglich ist, Peptide für einen membranständigen Rezeptor zu ermitteln, der normalerweise Nicht-Peptide als Liganden besitzt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die peptidpräsentierende Bakterienbank FliTrx™ dazu verwendet, um Bindungspeptide für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor zu gewinnen.

Im Einzelnen kamen dabei folgende Methoden zum Einsatz:

- Selektionieren der Bakterienbank gegen den aufgereinigten Rezeptor
- DNA-Präparation, DNA-Sequenzierung, Übersetzung der DNA- in Aminosäuresequenzen, Musteranalyse, Homologievergleich untereinander und mit bekannten Aminosäuresequenzen
- Ladungsanalyse
- Synthese von acht Peptiden (P 1 – P 8) und Affinitätsbestimmung mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse
- Funktionelle Untersuchung eines der Peptide am isolierten Mäuseherz nach Langendorff

Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Es fanden sich kaum durchgehende, die Reihenfolge der Aminosäuren betreffende Sequenzmuster.
- Die Analyse der Nettoladungen zeigte eine Selektion von positiv geladenen Peptiden (Durchschnittswert der Nettoladungen: +1,32).
- Die Affinitätskonstanten der untersuchten Peptide lagen in einem Bereich zwischen $2,5 \cdot 10^{-5}$ M und $1 \cdot 10^{-4}$ M.
- Das hinsichtlich seiner Funktionalität untersuchte Peptid wies vasokonstringierende Eigenschaften auf; ein direkter Antagonismus bei gleichzeitiger Adenosingabe konnte nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass es unter Verwendung der FliTrx™-Bakterienbank möglich war, Bindungspeptide für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor zu generieren, deren Affinitäten zum Rezeptor im Bereich der klassischen Adenosin-Antagonisten Koffein und Theophyllin liegen.

7 Anhang

7.1 Die Kurzschreibweise der Aminosäuren⁹⁴

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

7.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle	Bezeichnung	Seite
1	Rezeptor-Effektor-Kopplung ²⁴	9
2	Protokoll des Pannings ¹⁶	16
3	Synthetisierte Peptide	21
4	Versuchsreihen	26
5	DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 1S	27
6	DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 1G	29
7	DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 2A	30
8	DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 2G	32
9	DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 3A	33
10	DNA- und Aminosäuresequenzen der Versuchsreihe 3G	34
11	Häufigkeitsverteilung der Aminosäuren	38
12	Häufigkeitsverteilung der überdurchschnittlich oft vorkommenden Aminosäuren	40
13	Ladungen der Peptide der Versuchsreihen 1S und 1G	41
14	Ladungen der Peptide der Versuchsreihen 2A und 2G	42
15	Ladungen der Peptide der Versuchsreihen 3A und 3G	44
16	Übersicht der Ladungen je Position	46
17	Nettoladungen der Bindungspeptide	47
18	Synthetisierte Peptide	51
19	Affinitäten der Bindungspeptide	54
20	Bindungsstärke von Adenosin _{2a} -Rezeptor-Agonisten und –Antagonisten ⁷²	64

7.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung	Bezeichnung	Seite
1	G-Protein-gekoppelter Rezeptor ¹	2
2	Konstruktionsschema der FliTrx™ Random Peptide Library ¹⁶	5
3	Induktion der Peptidexpression durch Tryptophan ¹⁶	6

4	Sequenzen der vier humanen Adenosin-Rezeptoren ¹⁸	8
5	Verteilung der Nettoladungen	48
6	Aktivierung einer Aminosäure durch DCC-vermittelte Veresterung mit N-Hydroxybenzotriazol ⁹⁵	49
7	Chemische Struktur einer Fmoc-Aminosäure ⁹⁴	49
8	Schema der Festphasensynthese mit der Fmoc-Schutzgruppentechnik ⁹⁴	50
9	Bindungskinetik des Peptids P 1	53
10	Bindungsaffinität der Peptide P 1-8	56
11	Repräsentative Registrierung der Flußgeschwindigkeit in einem nach Langendorff perfundierten Herzen	58
12	Koronare Flussgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom zugeführten Substrat	58
13	Einzelladungen der Sequenz des humanen Adenosin _{2a} -Rezeptors	63

8. Literatur

- ¹ Watson, J. D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M.
Rekombinierte DNA, 2. Aufl.
Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg 295-313 (1993)
- ² Evans, R. M.
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily
Science **240**, 889-895 (1988)
- ³ Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. ; Watson, J. D.
Molekularbiologie der Zelle, 3. Aufl.
VCH, Weinheim, 864-866 (1995)
- ⁴ Berthold, M.; Bartfai, T.
Modes of Peptide Binding in G Protein-Coupled Receptors
Neurochemical Research **22** (8), 1023-1031 (1997)
- ⁵ Schwartz, T. W.
Locating ligand-binding sites in 7 TM receptors by protein engineering
Curr. Opin. Biotechn. **5**, 424-444 (1994)
- ⁶ Strader, C. D.; Fong, T. M.; Graziano, M. P.; Tota, M. R.
The family of G-protein-coupled receptors
FASEB J. **9**, 745-754 (1995)
- ⁷ Fong, T. M.; Huang, R.-R. C.; Strader, C. D.
Localisation of agonist and antagonist binding domains of the human neurokinin-1 receptor
J. Biol. Chem. **267**, 25664-25667 (1992)
- ⁸ Hunyady, L.; Balla, T.; Catt, K. J.
The ligand binding site of the angiotensin AT₁ receptor
Trends Pharmacol. Sci. **17**, 135-140 (1996)
- ⁹ Walker, P.; Munoz, M.; Martinez, R.; Peitsch, M. C.
Acidic residues in extracellular loops of the human Y1 neuropeptide Y receptor
are essential for ligand binding
J. Biol. Chem. **269**, 2863-2869 (1994)
- ¹⁰ Perlman, J. H.; Laakkonen, L.; Osman, R.; Gershengom, M.
A model of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor binding pocket.
Evidence for a second direct interaction between transmembrane helix 3 and TRH.
J. Biol. Chem. **269**, 23383-23386 (1994)
- ¹¹ Perlman, J. H.; Thaw, C. N., Laakkonen, L.; Bowers, C. Y.; Osman, R.; Gershengom, M. C.
Hydrogen bonding interaction of thyrotropin-releasing hormone (TRH) with
transmembrane tyrosine 106 of the TRH receptor
J. Biol. Chem. **269**, 1610-1613 (1994)
- ¹² Wilson, D. R.; Finlay, B. B.
Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology
Can. J. Microbiol. **44**, 313-329 (1998)
- ¹³ Smith, G. P.
Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface
Science (Washington D. C.) **228**, 1315-1317 (1985)

- ¹⁴ Pugsley, A. P.
The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria
Microbiol. Rev. **57**, 50-108 (1993)
- ¹⁵ Maruyama, I. N.; Maruyama, H. I.; Brenner, S.
Lamda foo: a lamda phage vector for the expression of foreign proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 8273-8277 (1994)
- ¹⁶ FliTrx™ Random Peptide Display Library
Invitrogen Corporation, San Diego, CA 92121, USA
- ¹⁷ Lu, Z.; Murray, K. S.; VanCleave, V.; LaVallie, E. R.; Stahl, M. L.; McCoy, J. M.
Expression of Thioredoxin Random Peptide Libraries on the Escherichia coli Cell Surface as Functional Fusions to Flagellin: A System Designed for Exploring Protein-Protein Interactions
Bio/Technology **13**, 366-372 (1995)
- ¹⁸ Jacobson, M. J.
Molecular biology of adenosine receptors
in: Adenosine and adenine nucleotides: from molecular biology to integrative physiology
edited by Belardinelli, L.; Pelleg, A.
Kluwer Academic Publishers, Boston 5-13 (1995)
- ¹⁹ Williams, M.; Burnstock, G.
Purinergic neurotransmission and neuromodulation: a historical perspective
in: Purinergic approaches in experimental therapeutics
edited by Jacobson, K. A.; Jarvis, M. F.
Wiley-Liss, New York 3-26 (1997)
- ²⁰ Drury, A. N.; Szent-Györgyi, A.
The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart
J. Physiol. **68**, 213-237 (1929)
- ²¹ Rivkees, S. A.; Reppert, S. M.; Wells, H. B.
Molekular cloning and characterization of a human A₁-adenosine receptor
Drug Dev. Res. **31**, 314 (1994)
- ²² Schiffman, S. N.; Libert, F.; Vassart, G.; Vanderhaeghen, J. J.
Distribution of adenosine A₂ receptor mRNA in the human brain
Neurosci. Lett. **130**, 177-181 (1991)
- ²³ Schiffman, S. N.; Libert, F.; Vassart, G.; Dumont, J. E.; Vanderhaeghen, J. J.
A cloned G protein-coupled protein with a distribution restricted to striatal medium-sized neurons. Possible relationship with D₁ dopamine receptor
Brain Res. **519**, 333-337 (1990)
- ²⁴ Stiles, G. L.
Adenosine receptor subtypes: new insights from cloning and functional studies
in: Purinergic approaches in experimental therapeutics
edited by Jacobson, K. A.; Jarvis, M. F.
Wiley-Liss, New York 29-37 (1997)
- ²⁵ Freissmuth, M.; Schutz, W.; Linder, M. E.
Interactions of the bovine brain A₁-adenosine receptor with recombinant G-protein alpha-subunits
J. Biol. Chem. **266**, 17778-17783 (1991)
- ²⁶ Palmer, T. M.; Stiles, G. L.
Review: Neurotransmitter receptors, VII. Adenosine receptors
Neuropharmacology **34**, 683-694 (1995)

- ²⁷ Olah, M. E.; Stiles, G. L.
Adenosine receptor subtypes: Characterization and therapeutic regulation
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **35**, 581-606 (1995)
- ²⁸ Palmer, T. M.; Gettys, T. W.; Stiles, G. L.
Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A₃ adenosine receptor
J. Biol. Chem. **270**, 16895-16902 (1995)
- ²⁹ Belardinelli, L.; Linden, J.; Berne, R. M.
The Cardiac Effects of Adenosine
Prog. Cardiovasc. Dis. **32**, 73-97 (1989)
- ³⁰ Kollias-Baker, C.; Shyrock, J. C.; Belardinelli, L.
Myocardial adenosine receptors
in: *Adenosine and adenine nucleotides: from molecular biology to integrative physiology*
edited by Belardinelli, L.; Pelleg, A.
Kluwer Academic Publishers, Boston 221-228 (1995)
- ³¹ Mustafa, S. J.; Marala, R.; Abebe, W.; Jeansonne, N.; Olanrewaju, H.; Hussain, T.
Coronary adenosine receptors: subtypes, localization, and function
in: *Adenosine and adenine nucleotides: from molecular biology to integrative physiology*
edited by Belardinelli, L.; Pelleg, A.
Kluwer Academic Publishers, Boston 229-239 (1995)
- ³² Schrader, J.; Baumann, G.; Gerlach, E.
Adenosine as Inhibitor of Myocardial Effects of Catecholamines
Pflügers Arch. **372**, 29-35 (1977)
- ³³ Xu, D.; Kong, H.; Liang, B. T.
Expression and Pharmacological Characterization of a Stimulatory Subtype of
Adenosine Receptor in Fetal Chick Ventricular Myocytes
Circ. Res. **70**, 56-65 (1992)
- ³⁴ Sollevi, A.; Belfrage, M.; Lundberg, T.; Segerdahl, M.; Hansson, P.
Systemic adenosine infusion: a new treatment modality to alleviate neuropathic pain
Pain **61**, 155-158 (1995)
- ³⁵ Cronstein, B. N.; Bouma, M. G.; Becker, B. F.
Purinergic mechanisms in inflammation
Drug Dev. Res. **39**, 426-435 (1996)
- ³⁶ Loubatieres-Mariani, M. M.; Petit, P.; Chapal, J.; Hillaire-Buys, D.; Bertrand, G.; Ribes, G.
Effects of purinoceptor agonists on insulin secretion
in: *Adenosine and adenine nucleotides: from molecular biology to integrative physiology*
edited by Belardinelli, L.; Pelleg, A.
Kluwer Academic Publishers, Boston 337-345 (1995)
- ³⁷ Kaplan, G. B.; Sears, M. T.
Adenosine receptor agonists attenuate and adenosine receptor antagonists exacerbate opiate withdrawal signs
Psychopharmacology **123**, 64-70
- ³⁸ Satoh, S.; Matsumura, H.; Suzuki, F.; Hayaishi, O.
Promotion of sleep mediated by the A_{2a}-adenosine receptor and possible involvement of this receptor in the
sleep induced by prostaglandin D₂ in rats
Proc. Natl. Acad. Sci. **93**, 5980-5984 (1996)
- ³⁹ Sylven, C.; Beermann, B.; Jonzon, B.; Brant, R.
Angina pectoris-like pain provoked by intravenous adenosine in healthy volunteers
Br. Med. J. **293**, 227-230 (1986)

- ⁴⁰ Ladner, R. C.; Sato, A. K.; Gorzelany, J.; de Souza, M.
Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies
Drug Discov. Today **9**(12), 525-529 (2004)
- ⁴¹ Norris J. D.; Paige, L. A.; Christensen, D. J.; Chang, C. Y.; Huacani, M. R.; Fan, D.; Hamilton, P. T.
Fowlkes, D. M.; McDonnell, D. P.
Peptide antagonists of the human estrogen receptor
Science **285**(5428), 744-746 (1999)
- ⁴² Birnboim, C.; Doly, J.
Rapid alkaline extraction procedure for screening plasmid DNA
Nucl. Acid. Res. **7**, 1513-23 (1979)
- ⁴³ Sanger, F.; Micklen, S.; Coulsen, A. R.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. **74**, 560-564 (1977)
- ⁴⁴ Atherton, E.; Sheppard, R. C.
Solid phase peptide synthesis: A practical approach
Oxford University Press (1993)
- ⁴⁵ Merrifield, R. B.
Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide
J. Am. Chem. Soc. **85**, 2149-2160 (1963)
- ⁴⁶ Wang, S. S.
p-Alcoxybenzylalcohol resin and p-alcoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid-phase synthesis of protected peptide fragments
J. Am. Chem. Soc. **95**, 1328-1333 (1973)
- ⁴⁷ Fields, G. B.; Noble, R. L.
Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids
Int. J. Peptide Protein Res. **35**, 161-214 (1990)
- ⁴⁸ Amprep™- Minicolumns for sample preparation
Amersham Life Science, UK
- ⁴⁹ Biacore® X
Biacore AB 1996
- ⁵⁰ Langendorff, O.
Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen
Pflügers Archiv **61**, 291-332 (1895)
- ⁵¹ Robeva, A. S.; Woodard, R.; Luthin, D. R.; Taylor, H. E.; Linden, J.
Double Tagging - Recombinant A₁- and A_{2A}-Adenosine Receptors with Hexahistidine and the FLAG Epitope
Biochem. Pharmacol. **51**, 545-555 (1996)
- ⁵² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BAST/nph-blast>
- ⁵³ Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D.
Molekularbiologie der Zelle, 3. Aufl.
VCH Weinheim 104-108 (1995)
- ⁵⁴ Turbadar, T.
Complete absorption of light by thin metal films
Proc. Phys. Soc. (London) **73**, 40-44 (1959)

- ⁵⁵ Otto, A.
Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by the Method of Frustrated Total Reflexion
Z. Phys. **216**, 398-410 (1968) und Phys. Stat. Solidi. **26**,199 (1968)
- ⁵⁶ Kretschmann, E.; Raether, H.
Radiative Decay of Nonradiative Surface Plasmons Excited by Light
Z. Naturforsch. **23a**, 2135-2136 (1968)
- ⁵⁷ Welford, K.
Surface plasmon-polaritons and their uses
Opt. Quant. Elect. **23**, 1-27 (1991)
- ⁵⁸ Raether, H.
Surface Plasma Oscillations and their Applications
Physics of Thin Films **9**, 145-261 (1977)
- ⁵⁹ Hirschfield, T.
Procedures for Attenuated Total Reflexion - Study of Extremely Small Samples
Appl. Optics **6**, 715-718 (1967)
- ⁶⁰ Kretschmann, E.
Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen
Z. Phys. **B241**, 313 (1971)
- ⁶¹ Liedberg, B.
Sensors Actuators **4**, 299 (1983)
- ⁶² Jönsson, U. et al.
BioTechniques **11**, 620 (1991)
- ⁶³ Strandh, M.; Ohlson, S.
Stretching the limits of measurement – Characterization of weak affinity interactions
BIA journal **1**, 27
- ⁶⁴ Kroll, K.; Schrader, J.; Piper, H. M.; Henrich, M.
Release of adenosine and cyclic AMP from coronary endothelium in isolated guinea-pig hearts:
relation to coronary flow.
Circ. Res. **60(5)**, 659-665 (1987)
- ⁶⁵ Shryock, J. C.; Snowdy, S.; Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Spalluto, G.; Monopoli, A.; Ongini, E.; Baker, S. P.;
Belardinelli, L.
A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation
Circulation **98**, 711-718 (1998)
- ⁶⁶ Muzykantov, V. R.; Torchilin, V.
Biomedical Aspects of Drug Targeting
Kluwer Academic Publishers, Boston (2003)
- ⁶⁷ Leopoldo, M.
Serotonin(7) receptors (5-HAT(7)Rs) and their ligands
Curr. Med. Chem. **11(5)**, 629-661 (2004)
- ⁶⁸ Hillisch, A.; Peters, O.; Kosemund, D., Muller, G.; Walter, A.; Schneider, B.; Reddersen, G.; Elger, W.;
Fritzemeier, K.-H.
Dissecting physiological roles of estrogen receptor (alpha) and (beta) with potent selective ligands from
structure-based design
Mol. Endocrinol. **22** (2004)

- ⁶⁹ Karow, T.; Lang, R.
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Karow/Lang 3-4 (1996)
- ⁷⁰ Gilmore, D. L.; Liu, Y.; Matsumoto, R. R.
Review of the pharmacological and clinical profile of rimcazole
CNS Drug Rev. **10**(1), 1-22 (2004)
- ⁷¹ Gschwind, A.; Fischer, O. M.; Ullrich, A.
Timeline: The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy
Nat. Rev. Cancer **4**(5), 361-370 (2004)
- ⁷² McIlwain, H.
The origin and use of the terms competitive and non-competitive in interactions among
chemical substances in biological systems
Essays Biochem. **22**, 158-186 (1986)
- ⁷³ Daly, J. W.; Jacobson, K. A.
Adenosine receptors: selective agonists and antagonists
in: Adenosine and adenine nucleotides: from molecular biology to integrative physiology
edited by Belardinelli, L.; Pelleg, A.
Kluwer Academic Publishers, Boston 157-166 (1995)
- ⁷⁴ Nambi, P.; Aiyar, N.
G protein-coupled receptors in drug discovery
Assay Drug Dev. Technol. **1**(2), 305-310 (2003)
- ⁷⁵ Jakubke, H.-D.
Peptide: Chemie und Biologie
Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg 1 (1996)
- ⁷⁶ Habibi, B.
Transmission of AIDS virus by transfusion and blood products. Risks and preventive strategies
Rev. Epidemiol. Sante Publique **34**(2), 118-125 (1986)
- ⁷⁷ Goldman, R. A.; Lewis, A. E.; Rose, L. I.
Anaphylactoid reaction to single-component pork insulin
JAMA **236**(10) 1148-1149 (1976)
- ⁷⁸ Battin, J.
Treatment with extractive growth hormone and Creutzfeld-Jakob encephalopathy: a new iatrogenic tragedy
Pediatrie **48**(2), 91-95 (1993)
- ⁷⁹ Kellenberger, G.; Zichichi, M. L.; Weigle, J. J.
Exchange of DNA in the recombination of bacteriophage lambda
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **15**(47), 869-878 (1961)
- ⁸⁰ Du Vigneaud, V.
Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin
Harvey Lect. **50**, 1-26 (1954-1955)
- ⁸¹ Jakubke, H.-D.
Peptide: Chemie und Biologie
Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg 313-318 (1996)

- ⁸² Gross, D. M.; Sweet, C. S.; Ulm, E. H.; Backlund, E. P.; Morris, A. A.; Weitz, D.; Bohn, D. L.; Wenger, H. C.; Vassil, T.C.; Stone, C. A.
Effect of N-[(S)-1-carboxy-3-phenylpropyl]-L-Ala-L-Pro and its ethyl ester (MK-421) on angiotensin converting enzyme in vitro and angiotensin I pressor responses in vivo
J. Pharmacol. Exp. Ther. **216**(3), 552-557 (1981)
- ⁸³ Rubin, B.; Antonaccio, M. J.; Horovitz, Z. P.
Captopril (SQ 14,225)
(D-3-mercapto-2-methylpropranolyl-L-proline): a novel orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme and antihypertensive agent
Prog. Cardiovasc. Dis. **21**(3), 183-194 (1978)
- ⁸⁴ Baugh, C. M.; Krumdieck, C. L.; Hershman, J. M.; Pittmann, J. A. Jr.
Synthesis and biological activity of thyrotropin-releasing hormone
Endocrinology **87**(5), 1015-1021 (1970)
- ⁸⁵ Wang, C. T.; Kulesha, I. D.; Stefko, P. L.; Wang, S. S.
Solid phase synthesis of pentagastrin and other peptide amides by a modified technique
Int. J. Pept. Protein Res. **6**(2), 59-64 (1974)
- ⁸⁶ Goldstein, G.; Audhya, T. K.
Thymopoietin to thymopentin: experimental studies
Surv. Immunol. Res. **4 Suppl. 1**, 1-10 (1985)
- ⁸⁷ Neri, F.; Franchi, A.
Synthetic hypertension in the treatment of acute circulatory collapse in surgery
Riv. Patol. Clin. **15**, 11-21 (1960)
- ⁸⁸ Balaspiri, L.
Synthesis of gastrointestinal peptide hormones
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **47**(4), 299-309 (1976)
- ⁸⁹ Solomon, T. A.; Buckley, J. P.
Inhibitory effects of central hypertensive activity of angiotensin I and II by 1-sar-8-ala-angiotensin II (saralasin acetate)
J. Pharm. Sci. **63**(7), 1109-1113 (1974)
- ⁹⁰ Mulla, N.
The oxytocics in obstetrics; a clinical evaluation of synthetic oxytocin (syntocinon)
J. Int. Coll. Surg. **31**(2), 174-180 (1959)
- ⁹¹ Andersson, K. E.; Arner, B.
Effects of DDAVP, a synthetic analogue of vasopressin, in patients with cranial diabetes insipidus
Acta Med. Scand. **192**(1-2), 21-27 (1972)
- ⁹² Morffew, A. J.
Protein modelling using computer graphics
Adv. Biotechnol. Processes **5**, 31-58 (1985)
- ⁹³ Thorpe, D. S.
Forecasting roles of combinatorial chemistry in the age of genomically derived drug discovery targets
Comb. Chem. High Throughput Screen. **3**(5), 421-436 (200)
- ⁹⁴ Stryer, L.
Biochemie, 4. Aufl.
Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg 23 (1996)

- ⁹⁵ Herrmann, A.
Sulfotransferasen: Isolierung, biochemische und molekularbiologische Charakterisierung
Dissertation, Universität zu Köln 68-69 (1995)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Oliver Elsner
Geburtsdatum: 30. Mai 1973
Geburtsort: Issum
Familienstand: ledig

Schulbildung

1979 – 1983 Kath. Grundschule St. Anna Rheinberg
1983 – 1992 Amplonius-Gymnasium Rheinberg, Abitur

Zivildienst

1992 – 1993 Krankenpflege, St. Josef-Krankenhaus Moers

Studium

1993 – 2000 Medizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/1995 Physikum
09/1996 Erstes Staatsexamen
09/1999 Zweites Staatsexamen
10/2000 Drittes Staatsexamen

Dissertation

1997 – 2004 Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. J. Schrader

Facharztausbildung

seit 01/2001 Klinik für Anästhesiologie,
St. Johannes-Hospital Duisburg-Hamborn
Chefarzt: Prof. Dr. med. B. v. Bormann

Rheinberg, 21.11.2004

Oliver Elsner

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader, bedanken. Durch die Überlassung eines interessanten Themas und die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten, konnte ich mir erstmals einen intensiven Einblick in die biomedizinische Forschung verschaffen. Neben der großzügigen Förderung der Experimente waren es seine motivierenden Anregungen und nicht zuletzt seine Geduld in der Schlussphase, die entscheidend zur Fertigstellung dieser Dissertation beitrugen.

Dem Leiter meiner Arbeitsgruppe, Herrn Dr. Andreas Herrmann, danke ich für die kompetente Betreuung und die Einarbeitung in die Methodik, Herrn Prof. Dr. Thomas Hohlfeld für die Erstellung des Korreferats und Herrn Michael Broad (University of Virginia) für die Überlassung des aufgereinigten humanen Adenosin_{2a}-Rezeptors.

Meinen Laborkollegen danke ich für das nette Arbeitsklima und die kollegiale Zusammenarbeit, insbesondere Frau Regina Rogge, Herrn Dr. Carsten Boenke (BMFZ) und Herrn Dr. Ulrich Flögel für ihre Hilfe bei der Sequenzierung, Peptidsynthese und den funktionellen Studien.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und damit diese Dissertation überhaupt erst möglich machten und mich in allen Phasen dieser Arbeit unterstützen.

Für ihre Unterstützung möchte ich mich schließlich auch bei meiner Freundin Susanne, meinem Bruder Michael, meinen Kommunarden Andrea und Dierk und allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

**Bakteriell erzeugte Bindungspeptide
für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor
Gewinnung und Charakterisierung**

Elsner, Oliver

Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zusammenfassung – Abstract

In dieser Arbeit wurde die peptidpräsentierende Bakterienbank FliTrx™ dazu verwendet, um Bindungspeptide für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor zu gewinnen.

Nach dem Selektionieren der Bakterienbank gegen den aufgereinigten Rezeptor wurde die DNA der selektierten Bakterien präpariert, sequenziert und die DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzt. Eine Analyse nach Sequenzmustern und Homologievergleiche untereinander und mit einer Sequenzdatenbank wurden durchgeführt, außerdem die gewonnenen Peptide hinsichtlich ihrer Ladung untersucht. Während sich kaum Sequenzmuster ergaben, zeigte sich eine Selektion von positiv geladenen Peptiden (Durchschnittswert der Nettoladungen: +1,32). Anschließend wurden acht Peptide synthetisiert und ihre Affinität zum Rezeptor mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse untersucht. Die ermittelten Affinitätskonstanten lagen in einem Bereich zwischen $2,5 * 10^{-5}$ M und $1 * 10^{-4}$ M. Schließlich wurde eines der Peptide bezüglich seiner funktionellen Eigenschaften am isolierten Mäuseherzen nach Langendorff untersucht. Dieses wies vasokonstringierende Eigenschaften auf, ein direkter Antagonismus bei gleichzeitiger Adenosingabe konnte nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass es unter Verwendung der FliTrx™-Bakterienbank möglich war, Bindungspeptide für den humanen Adenosin_{2a}-Rezeptor zu generieren, deren Affinitäten zum Rezeptor im Bereich der klassischen Adenosin-Antagonisten Koffein und Theophyllin liegen. Außerdem konnte exemplarisch gezeigt werden, dass es möglich ist, Peptide als Liganden für einen membranständige Rezeptor zu ermitteln, der normalerweise Nicht-Peptide als Liganden besitzt.

Univ.-Prof. Dr. med. J. Schrader
Direktor des Instituts für
Herz- und Kreislaufphysiologie,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

