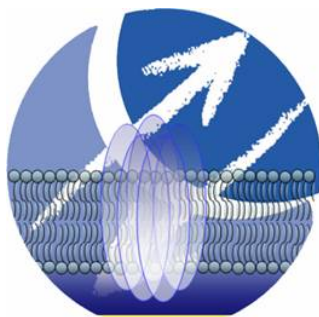


**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwigs-Maximilians-Universität München**

Detektion molekularer Interaktionen an biofunktionalisierten Grenzflächen

**Simone S. Krupka
aus
Immenstadt i. Allgäu**

2005



Molecular Recognition Laboratory

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Absatz 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 14. Juli 2005

Simone Krupka

Dissertation eingereicht am: 14.07.2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Moroder

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2005

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht:

Krupka SS, Wiltschi B, Reuning U, Hölscher K, Hara M, Knoll W, Sinner E-K. (eingereicht)
In vivo detection of membrane protein expression using surface plasmon enhanced
fluorescence spectroscopy (SPFS)

Milbradt AG, Loweneck M, Krupka SS, Reif M, Sinner EK, Moroder L, Renner C. (2005)
Photomodulation of conformational states. IV. Integrin binding RGD-peptides with (4-
aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent. *Biopolymers* 77(5):304-13.

Schütt M, Krupka SS, Milbradt AG, Deindl S, Sinner EK, Oesterhelt D, Renner C, Moroder L.
(2003) Photocontrol of cell adhesion processes: model studies with cyclic azobenzene-RGD
peptides. *Chemistry & Biology* 10(6): 487-90.

Detektion molekularer Interaktionen an biofunktionalisierten Grenzflächen

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Membranen und Membranproteine	3
1.2	Membranmodelle	4
1.3	Photomodulierbare Interaktionen an artifiziellen Membranen	5
1.4	Integrinvermittelte Zelladhäsion	6
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	7
1.5.1	Nachweis der photoschaltbaren Bindung von RGD-Peptiden an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$	7
1.5.2	Zeitaufgelöste Detektion der Expression von Rhodopsin als Beispiel eines Membranproteins in lebenden Zellen mit SPFS	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Materialien	9
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Geräte	9
2.1.2	Plasmidkonstrukte	10
2.1.3	Bakterienstamm und Zellkulturlinien	10
2.2	Mikrobiologische Standardmethoden	11
2.3	Molekularbiologische Standardmethoden	12
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	12
2.3.2	Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion	12
2.3.3	Charakterisierung von DNA-Fragmenten anhand der Agarose-Gelelektrophorese	12
2.3.4	Charakterisierung von RNA-Fragmenten	13
2.3.5	Restriktionsverdau von DNA	14
2.3.6	Sequenzierung von DNA	14
2.4	Proteinchemische Methoden	15
2.4.1	Proteinanalytik	15
2.5	Zellbiologische Methoden	19
2.5.1	Kultivierung von adhärennten Säugetierzellen	19
2.5.2	Fixierung von Säugetierzellen	19
2.5.3	Heterologe Expression von Proteinen mit Hilfe des Semliki-Forest-Virus-Systems	20

2.5.4 Immunodetektion mittels Fluoreszenzmikroskopie	23
2.5.5 Präparation von Plasmamembranen aus Säugetierzellen	24
2.6 Methoden zur photomodulierbaren Bindungsmessung an Integrin $\alpha_v\beta_3$	25
2.6.1 Aufbau einer peptidunterstützten Membran mit inkorporiertem Integrin	25
2.6.2 Photoisomerisierung der cRGD-Azo-Liganden	26
2.6.3 Fluorophormarkierung des cRGD-Azo-Liganden	26
2.7 Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (FLIC)	27
2.7.1 Theoretischer Hintergrund	27
2.7.3 Durchführung der Messungen	27
2.8 Datenanalyse	28
3 Plasmonenspektroskopie	29
3.1 Theoretischer Hintergrund	29
3.2 Verwendeter Meßaufbau	34
3.3 Durchgeführte Messungen an artifiziellen Membranen	36
3.3.1 Bindungsstudie	36
3.3.2 Ablösen eines Liganden	36
3.4 Messungen an lebenden Säugetierzellen	36
3.4.1 Kultivierung von Säugetierzellen auf goldbeschichteten Glassubstraten für die SPFS-Messungen	36
3.4.2 Aufnahme einer Zeitreihe mit mehreren Substraten	37
3.4.3 Aufnahme einer Zeitreihe auf einem einzelnen Substrat	37
4 Nachweis der photoschaltbaren Bindung von RGD-Peptiden an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$	38
4.1 Charakterisierung der Peptidliganden	39
4.1.1 Photoisomerisierung der Peptidliganden	40
4.1.2 Vergleich der Photoisomerisierung von Peptid 1 und fluorophormarkiertem Peptid 1	43
4.2 Aufbau von peptidunterstützten Integrin-funktionalisierten artifiziellen Membranen	45
4.3 Nachweis der Bindung der synthetischen Peptide an eine Integrin-funktionalisierte Membran	51
4.3.1 Vergleich der Bindung der Peptide 1 und 2 in <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Konformation	51
4.3.2 Kontrollexperiment zur Bindungsmessung	54

4.3.3 Reversibilität der Bindung von Peptid 1 und Peptid 2	58
4.3.4 Reproduzierbarkeit der Messungen auf verschiedenen Meßpositionen	60
4.3.5 Photomodulation von komplexiertem Liganden	61
4.4 Quantitativer Vergleich der Bindungskapazitäten von Peptid 1 <i>cis</i> - und <i>trans</i> - Isomeren	64
4.5 Reproduzierbarkeit der Meßsignale	67
4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	69
4.7 Diskussion und Ausblick	70
4.7.1 Bedeutung von peptidunterstützten Membranen als Modellsysteme zur Analyse empfindlicher Membranproteine	70
4.7.2 Grundlage der dreidimensionalen Struktur des RGD-Motivs für die Integrinbindung und vorgeschlagene vorgeschlagene Bindungsmodi der Peptide 1 und 2	71
4.7.3 Optimierte Photomodulation mit einem Peptid 3	74
4.7.4 Photoschaltung der Adhäsion von lebenden Zellen	76
5 Zeitaufgelöste Detektion der Expression von Rinderrhodopsin in lebenden Zellen	79
5.1 Zeitaufgelöste Detektion der Rhodopsinexpression in lebenden Zellen mit SPFS	79
5.1.1 Idee und Vorbereitung des Experiments	79
5.1.2 Zeitaufgelöste <i>in vivo</i> - Detektion der Expression von Rinderrhodopsin mit SPFS	89
5.2 Zeitaufgelöste Detektion der Rinderrhodopsinexpression mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie	102
5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	109
5.4 Diskussion und Ausblick	110
5.4.1 Zeitspanne der Biosynthese von Rinderrhodopsin	110
5.4.2 Vergleich der <i>in vivo</i> - Detektion mittels SPFS und Fluoreszenzmikroskopie	111
5.4.3 SPFS - Messungen an einer einzelnen Zelle	117
5.4.4 Weitere Anwendungsmöglichkeiten von SPFS an lebenden Zellen	117
6 Zusammenfassung	119

7 Anhang	122
7.1 Abbildungsverzeichnis	122
7.2 Abkürzungsverzeichnis	126
7.3 Literaturverzeichnis	132
7.4 Verwendetes Rinderrhodopsinkonstrukt	152
7.5 Lebenslauf	153
7.6 Dank	154

1 Einleitung

Viele wichtige biochemische Prozesse finden an der Oberfläche von biologischen Membranen statt, welche die Zellen lebender Organismen und deren Organellen eingrenzen. Dazu gehören zum Beispiel Energie- und Stofftransport, die Adhäsion von Zellen oder die Signaltransduktion durch Rezeptorproteine (von Heijne 1999). Membrangebundene oder die Membran durchdringende Proteine sind daher nicht nur als Ansatzpunkt der meisten Pharmazeutika interessant (Luttrell 2003), (Becher 2005), sondern ihre Untersuchung ermöglicht erst das Verstehen einer Vielzahl von biologischen Eigenschaften.

Die Analyse von biochemischen Reaktionen an der Membranoberfläche ist eine große experimentelle Herausforderung, da für die Aufrechterhaltung der Funktionalität von Membranproteinen eine spezielle Membranumgebung benötigt wird, die gleichzeitig die effiziente Detektion und Charakterisierung von molekularen Interaktionen ermöglicht. In dieser Arbeit werden molekulare Interaktionsprozesse von Membranproteinen an biofunktionalisierten Grenzflächen in zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Zum einen werden anhand einer artifiziellen Membran mit inkorporierten Integrinrezeptoren, an welche photomodulierbare Liganden binden, spezifische Erkennungsprozesse der Zelladhäsion analysiert. Im zweiten Teil der Arbeit wird die Insertion von heterolog exprimiertem Rhodopsin als Modell eines Membranproteins in die Plasmamembran lebender Zellen zeitaufgelöst detektiert. Als empfindliche oberflächensensitive Untersuchungsmethode wird in beiden Fällen die Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) verwendet, welche in *Kapitel 3* beschrieben ist.

1.1 Biologische Membranen und Membranproteine

Biologische Membranen erstellen eine Barriere zwischen einer Zelle und ihrer Umwelt sowie zwischen den verschiedenen subzellulären Kompartimenten innerhalb eukaryontischer Zellen, wodurch die zelluläre Integrität und Funktion aufrechterhalten wird. Obwohl die Grundstruktur einer Membran aus einer Lipiddoppelschicht besteht, werden spezifische Funktionen wie der Informationsaustausch zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung von den bis zu 30% der zellulären Proteine ausgeführt, welche mit der Membran assoziiert sind (Wallin 1998), (Stevens 2000) (siehe *Abb. 1-1*).

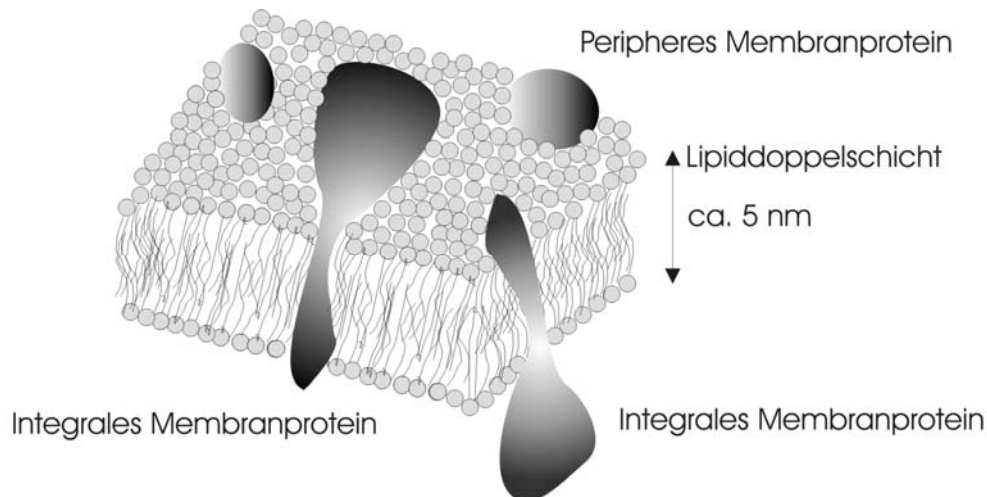


Abb. 1-1: Schematisches Modell einer Zellmembran nach (Singer 1972).

Um gleichzeitig eine Membran durchspannen und mit Komponenten aus dem Zytosol oder aus dem extrazellulären Raum interagieren zu können, sind integrale Membranproteine aus hydrophoben und hydrophilen Domänen aufgebaut. Aufgrund dieser amphipatischen Eigenschaft, aber auch wegen der geringen Verfügbarkeit von Membranproteinen ist deren Untersuchung mit großen Herausforderungen verbunden (Hurley 2003), (Torres 2003), (Seddon 2004), (White 2001).

Die erste Schwierigkeit in der Untersuchung von Membranproteinen besteht zunächst darin, das gewünschte Protein in einer ausreichenden Menge zu beschaffen, da die meisten Membranproteine nur in geringen Mengen in ihrer natürlichen Umgebung vorkommen. Für ihre Aufreinigung ist daher oft eine Überexpression notwendig. Ein Hauptproblem der heterologen Expression von geklonten Konstrukten der Membranproteine in den zur Proteinexpression üblichen bakteriellen Systemen wie *E. coli* ist die Aggregation des Proteins im Zytoplasma. Die meisten Membranproteine, wie z.B. der G-Protein gekoppelte Rezeptor Rhodopsin, benötigen zudem posttranslationale Modifikationen, die in den bakteriellen Systemen nicht erstellt werden können (Ferreira 995). Eine weitere Erschwernis in der Analyse von Membranproteinen besteht darin, daß diese Proteine natürlicherweise in einer Lipiddoppelschicht eingebettet sind. Außerhalb ihrer physiologischen Membranumgebung können Membranproteine ihre Struktur und damit ihre funktionalen Fähigkeiten verlieren. Daher benötigen Membranproteine, die in wässrige Lösung gebracht werden sollen, eine Umgebung, welche ihren hydrophoben Domänen entspricht. Das dafür verwendete Detergenz ist entscheidend für die entsprechende Aufreinigungsprozedur und muß individuell und zeitaufwändig für jedes Membranprotein optimiert werden (Seddon 2004). Für Experimente *in vitro* wurden spezielle synthetische Membransysteme entwickelt, in welche die hydrophoben Domänen der untersuchten Membranproteine eingebettet werden können. Die Rekonstitution aufgereinigter Membranproteine in solche artifizielle Membranmodelle stellt eine weitere Herausforderung dar, wie z.B. die Feststellung der Anzahl und der Orientierung der inkorporierten Membranproteine (de Lima Santos 2005).

1.2 Membranmodelle

Eine genaue Analyse von Membranproteinen wird durch Modellsysteme artifizierlicher Membranen ermöglicht, welche die natürliche Umgebung der rekonstituierten Membranproteine imitieren und dadurch deren Funktionalität aufrechterhalten. Vor allem für eine detaillierte Untersuchung der Interaktionen zwischen einem Rezeptor und seinen Liganden, einer Voraussetzung für das Verstehen vieler komplexer biologischer Signaltransduktionswege, ist die native Konformation des Membranproteins nötig. Solche Analysen erfordern effiziente und reproduzierbare *in vitro* Systeme, um die spezifischen Bindungsereignisse zwischen Rezeptor und Ligand getrennt von anderen Interaktionen des Rezeptors untersuchen zu können. Inzwischen sind verschiedene artifizielle Membranmodelle bekannt, in denen aufgereinigte und solubilisierete Membranproteine rekonstituiert werden. Das klassische System der Liposomen besteht aus einer Lipiddoppelschicht um einen Hohlraum (Steinberg-Yfrach 1998). Die Nachteile dieser Methode sind, daß aufgrund der kugelförmigen Geometrie der Liposomen nur sehr wenige Charakterisierungsmethoden und Messverfahren angewendet werden können und daß der Inhalt des Hohlraums nicht zu kontrollieren ist. Eine beidseitige Zugänglichkeit der Lipiddoppelschicht ermöglicht dagegen das Modell der sogenannten schwarzen Lipidmembranen (Wiedemann 2004), welches aus einer Flüssigkeitslamelle an der Grenzfläche zwischen zwei flüssigen Phasen besteht. Diese aufgrund von Interferenzen im Mikroskop schwarz erscheinenden Membranen überspannen maximal 1 mm² große Löcher in einer Teflonfolie. Der Nachteil der schwarzen Membranen ist ihre kurze Stabilitätsdauer (Winterhalter 2000).

Um die beschriebenen Probleme zu umgehen, wurden im letzten Jahrzehnt die festkörperunterstützten Lipidmembranen entwickelt (Knoll 2000). Die bisher bekannten unterstützten Lipidmembranen bestehen aus bifunktionalen Molekülen, welche eine lipophile Domäne und einen hydrophilen Abstandshalter aufweisen. Der lipophile Teil inseriert in eine der beiden Schichten der Lipidmembran und besteht in der verwendeten Modellmembran aus Phospholipiden (Schmidt 1998), (Sackmann 2000), (Sinner 2004). Der hydrophile Abstandshalter bindet die Modellmembran an die Unterlage und bewirkt zugleich die Bildung einer Aussparung unterhalb der Membran. Dieser submembrane Raum kann als ionisches Reservoir verwendet werden und ermöglicht die Unterbringung von peripheren zytosolischen Domänen der inkorporierten Membranproteine (Sinner 2001), (Giess 2004). In dieser Arbeit wird das Modell der peptidunterstützten artifizierlichen Membran zur Bindungsstudie an nativen Integrinrezeptoren benutzt. Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR), welche die Änderung von Schichtdicken adsorbierender Moleküle detektiert, hat sich als Methode zur Kontrolle des Aufbaus von planaren artifizierlichen Membranmimetika besonders bewährt (Sinner EK 2004). Eine Erweiterung der SPR ist die Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS, siehe Kapitel 3) (Liebermann 2000), (Neumann 2002), bei der das evaneszente Feld der Plasmonen die Fluoreszenz geeigneter Fluorophore abstandssensitiv verstärkt und mit der Konzentration der gebundenen Fluorophore an der

Oberfläche korreliert. Dabei minimiert die artifizielle Membran den negativen Einfluß des Förstertransfers auf die Fluoreszenzausbeute. Zusammengefaßt ermöglichen definierte Membranmodelle die Reduktion der komplexen Prozesse, welche an biologischen Membranen stattfinden, auf einzelne Interaktionen zwischen ausgewählten Proteinen, Lipiden und Liganden.

1.3 Photomodulierbare Interaktionen an artifiziellen Membranen

Artifizielle Membranmodelle eignen sich aufgrund ihrer definierten Zusammensetzung besonders für die spezifische Analyse von molekularen Interaktionen. Zur kontrollierten Induzierung der gewünschten Vorgänge kann als spezifischer Auslöser eine Änderung der Temperatur oder des pH-Werts verwendet werden, z.B. um ein Antigen von Antikörpern zu lösen. Allerdings entstehen dadurch Abweichungen in der Zusammensetzung des Lösungsmittels, wodurch biologische Materialien verändert oder sogar zerstört werden können. Ein alternativer präzise wirkender molekularer Schalter ist ein Lichtsignal, bei dem keine Veränderung des Lösungsmittels benötigt wird und zudem eine hohe Reversibilität besteht. Bisher ist die lichtgesteuerte Kontrolle von Enzymreaktionen und der Affinität bestimmter Liganden bekannt (Willner 1991), (Liu 1997), (Willner 1996). Lichtschaltbare Biomaterialien können ihre optische Anregung in mechanische Arbeit im Nanobereich umsetzen. Diese Materialien isomerisieren reversibel bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge, wobei ihre einzelnen photoisomeren Zustände anhand von bestimmten spektralen und chemischen Eigenschaften charakterisiert werden können. Die Integration von photoisomerisierbaren Schaltern in Biomaterialien ermöglicht durch die lichtinduzierte Freisetzung oder Zerstörung der biologisch aktiven Stelle die Steuerung von Prozessen wie der Katalyse oder der Ligandenbindung.

Der meistgenutzte optische Schalter in biologischen Systemen ist das Azobenzol (Renner 2005), da seine beiden photomodulierbaren Isomere *cis* und *trans* besonders ausgeprägte Unterschiede in ihrer Geometrie und Polarisation aufweisen (siehe *Abb. 1-2*). Zudem begünstigen die hohe Stabilität des Azobenzols und sein schneller, vollkommen reversibler Isomerisierungsprozeß die Verwendung als Photoschalter. Die Umwandlung des *trans*-Isomers in das *cis*-Isomer von reinem Azobenzol benötigt nur 10 ps, während eine Isomerisierung in die umgekehrte Richtung bereits nach 1 ps abgeschlossen ist (Lednev 1996).

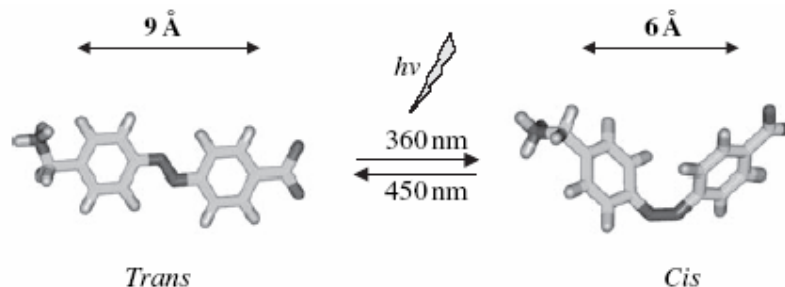


Abb. 1-2: cis=trans Isomerisierung von Azobenzolverbindungen (Renner 2005).

In dieser Arbeit wird Azobenzol als Lichtschalter verwendet, um die stark konformationsabhängige Bindungsaffinität von Zelladhäsionsrezeptoren zu modulieren, welche in einer peptidunterstützten Modellmembran inkorporiert sind. Die Kombination einer Azobenzolgruppe mit dem RGD-Bindungsepitop der Zelladhäsion ermöglicht die experimentelle Untersuchung einer durch Photoisomerisierung ausgelösten Bindungsaffinität der Peptidomere an Integrinrezeptoren. Damit können strukturelle Grundlagen der Wechselwirkungen zwischen Integrinrezeptoren und der extrazellulären Matrix untersucht werden, welche noch weitgehend ungeklärt sind. Im Gegensatz zu den momentan experimentell verwendeten Analysen, die physiologische Effekte anhand der Auszählung der adhärenen Zellen ermitteln (Dopheide 2001), (Pilch 2002), kann die Dynamik der Adhäsion durch spezifische molekulare Interaktionen mit der in dieser Arbeit angewendeten SPFS systematisch erfaßt werden.

1.4 Integrinvermittelte Zelladhäsion

Die Adhäsion von Zellen aneinander oder an einer Oberfläche ermöglicht den Zusammenhalt von Zellen in allen mehrzelligen Tieren und dadurch Prozesse der Embryogenese, der Wundheilung oder auch die Entstehung von Tumoren (Gumbiner 1996), (Humphries 2004). Die dafür nötigen Interaktionen einer Zelle mit anderen Zellen oder mit der extrazellulären Matrix (ECM) werden vor allem von sogenannten Integrinen vermittelt (Hynes 1987), (Hynes 1992), (Bokel 2002), (Hynes 2002), (Varner 2004). Diese heterodimeren Adhäsionsrezeptoren aus einer α - und einer β -Untereinheit von etwa 180 kDa bzw. 95 kDa Größe regulieren die Beweglichkeit einer Zelle über deren spezifische und selektive Bindung an Sequenzen wie das RGD-Motiv extrazellulärer Matrixproteine (Gumbiner 1996), (Arnaout 2002), (Holly 2000). Die bekannten 18 α - und 8 β -Untereinheiten interagieren dabei untereinander nichtkovalent in 24 möglichen Kombinationen. Das in dieser Arbeit untersuchte Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist für die Metastase von Tumoren und deren Versorgung mit Blutgefäßen (Angiogenese) von Bedeutung (Cheresh 1999), wobei Integrin $\alpha_v\beta_3$ an besonders viele unterschiedliche Glykoproteine wie z.B. Vitronektin oder Fibronektin bindet (Plow 2000).

Der spezifischen Bindung von Integrinen an Liganden der ECM geht zunächst die reversible Bindung von Glykoproteinen wie z.B. den Selektinen voraus. Bei der Adhäsion von Zellen beispielsweise an die Wand eines Blutgefäßes entsteht durch die Interaktionen der Selektine ein erster mechanischer Kontakt der Zelle mit der Oberfläche (Springer 1994), wodurch Integrine aktiviert werden. Diese verstärken durch eine Konformationsänderung zugleich ihre Affinität für Liganden der extrazellulären Matrix als auch eine veränderte Interaktion mit dem Zytoskelett. Die hierdurch ausgelöste Produktion zelleigener Matrixproteine sowie die veränderte Zellform bewirkt eine stabile Adhäsion der gesamten Zelle (Konstantopoulos 1998).

Diese Arbeit liefert einen Einblick in die noch weitgehend unverstandene Spezifität und deren Auswirkung auf die Dynamik dieser strukturinduzierten, molekularen Erkennungsprozesse. Ausgehend davon, daß die Stärke der Bindung von Integrinen an Liganden mit dem RGD-Motiv von dessen räumlicher Anordnung sowie von den umgebenden Aminosäureresten abhängen kann (Kuhn 1994), (Kessler 2002), wird der Einfluß der Konformation der Liganden auf die Bindungsaffinität von Integrin $\alpha_v\beta_3$ anhand von Bindungsmessungen photoschaltbarer synthetischer RGD-Peptide eindeutig bestimmt. Zusätzlich wird eine deutliche Änderung der Bindungsaffinität durch die Variation einer einzigen Aminosäureposition in der Primärsequenz der synthetischen Peptide nachgewiesen. Die photomodulierbaren Interaktionsvorgänge an der Integrin-funktionalisierten artifiziellen Membran werden mit der oberflächensensitiven Methode der SPFS charakterisiert. Die damit erzielten Ergebnisse können zu einer Weiterentwicklung führen, in der eine Kontrolle der Adhäsionsprozesse intakter lebender Zellen mittels einer Photoschaltung erreicht werden kann.

1.5 Detektion von Membranproteinen in lebenden Zellen

Im Unterschied zu den definierten artifiziellen Membranmodellen bestehen die Membranen lebender Zellen aus einer extrem komplexen Zusammensetzung unterschiedlicher Lipide, wobei zusätzlich kontinuierlich weitere Lipide hinzugefügt oder entfernt werden. Die typische Plasmamembran einer Säugerzelle besteht aus etwa acht Hauptklassen von Lipiden (White 1973), innerhalb derer bis zu 100 verschiedene molekulare Spezies bekannt sind (Ekroos 2003). Die Lipide beeinflussen durch spezifische Protein-Lipid-Interaktionen die Aktivität von Membranproteinen (Johannsson 1981), (Cornelius 1991), (Cornelius 2001). Da die momentan beschriebenen künstlichen Membransysteme nicht die Komplexität einer Membran einer lebenden Zelle erreichen, können sie nur Grenzwerte innerhalb des Netzwerks der zellulären Membranen geben. Es ist bekannt, daß von membranständigen Rezeptoren in intakten Zellen eine deutlich höhere und spezifischere Aktivität als in Liposomen oder sogar in rekonstituierten Membranfragmenten gemessen wird (Fierens 2002), (Claasen 2005). Auch kann die jeweilige Methode zur Expression, Solubilisierung und Aufreinigung zu einer unterschiedlichen Zusammenlagerung der Untereinheiten und damit zu einer veränderten Aktivität des untersuchten Membranproteins führen (de Lima Santos 2005). Für die Analyse von nativen Membranproteinen bieten Experimente *in vivo* zusätzlich den Vorteil, die Schwierigkeiten der zeitaufwändigen Aufreinigungsprozedur und Rekonstitution zu umgehen. Als häufigste Untersuchungsmethode von lebenden Zellen wird momentan die Fluoreszenzmikroskopie angewendet (Smith 2004). Allerdings können bei diesem Verfahren meßbare Störungen des zellulären Metabolismus auftreten (Tyrrell 1990), (König 1996), (König 2000), (Kieft 2004). Zu den Ursachen hierfür zählen besonders reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) oder der Zerfall der zur Detektion verwendeten Farbstoffe (Knight 2003) durch die intensive Belichtung der Probe. Weiterhin kann ein untersuchtes Protein durch die Fusion mit fluoreszierenden Proteinen oder das Einfügen mehrfacher His₆-Tags in seiner Faltung entscheidend beeinträchtigt werden (Javitch 2004).

Als eine Alternative zur Fluoreszenzmikroskopie wird in dieser Arbeit erstmals die Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) an einem Membranprotein in lebenden Zellen angewendet. Dabei kann das Problem der Photooxidation weitgehend dadurch umgangen werden, daß eine für biologische Materialien unschädliche Lichtstärke verwendet wird. Gleichzeitig besteht eine hohe Sensitivität durch die mittels eines evaneszenten Feldes 16fach verstärkte Fluoreszenz der zur Immunodetektion verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper (Liebermann 2000), welche an das gewünschte Protein in der adhärenen Plasmamembran binden. Diese Oberflächensensitivität bewirkt zusätzlich einen vernachlässigbar geringen Hintergrund aus der Autofluoreszenz der Zellen oder des zur Zellkultur verwendeten Mediums. Weiterhin bietet die zur Erzeugung der Oberflächenplasmonen verwendete Goldoberfläche, an der die untersuchten Zellen adhären, die Möglichkeit, den Versuchsaufbau durch definierte thiol-vermittelte Adsorption von Peptiden oder Proteinen zu verändern.

Das in dieser Arbeit als Modell eines Membranproteins verwendete Rinderrhodopsin, ein Photorezeptor in der Retina der Vertebraten, besitzt eine bekannte Struktur und Aktivität (Palczewski 2000), (Stryer 1995). Rhodopsin gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), welche eine essentielle Rolle in der zellulären Signalübertragung einnehmen und dadurch besondere pharmakologische Bedeutung aufweisen (Pierce 2002). Der Nachweis der Expression von Rhodopsin mit SPFS in lebenden Zellen bietet die Möglichkeit, dieses Verfahren auch an weiteren wichtigen GPCRs anzuwenden.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

1.6.1 Nachweis der photoschaltbaren Bindung von RGD-Peptiden an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist ein Zelladhäsionsrezeptor, der die Beweglichkeit von tierischen Zellen über ihre Haftung an einer Unterlage kontrolliert. Dabei binden Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren vor allem an das sogenannte RGD-Motiv in Proteinen der extrazellulären Matrix. Die Stärke dieser Bindung kann von der räumlichen Anordnung der RGD-Sequenz sowie von umgebenden Aminosäureresten beeinflusst werden (Kuhn 1994), (Kessler 2002). Die Auswirkung einer Konformationsänderung von RGD-Liganden auf deren Bindungsaffinität an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$ in einer artifiziellen Membran soll in dieser Arbeit anhand von synthetischen photoisomerisierbaren RGD-Peptiden eindeutig analysiert werden. Zusätzlich soll die Auswirkung der Veränderung einer Aminosäureposition in der Primärsequenz der synthetischen Peptide auf deren Bindungseigenschaften nachgewiesen werden (siehe *Kapitel*

4). Die Bindungen der Peptidliganden an die integrinfunktionalisierte Membran werden mit Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) detektiert. Diese Analyse gewährt einen Einblick über die Selektivität der Bindung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ an Liganden mit dem RGD-Motiv. Schließlich soll die Möglichkeit einer lichtschtbaren Bindung bzw. Ablösung der Liganden von Integrin $\alpha_v\beta_3$ überprüft werden.

1.6.2 Zeitaufgelöste Detektion der Expression von Rhodopsin als Beispiel eines Membranproteins in lebenden Zellen mit SPFS

Die Analyse von Membranproteinen in artifiziellen Membransystemen unterliegt Begrenzungen, da die Komplexität einer lebenden Zelle noch nicht vollständig *in vitro* nachempfunden werden kann. Eine Untersuchung in lebenden, intakten Zellen umgeht auch die Schwierigkeiten eines langwierigen Aufreinigungsprozesses, sowie einer reduzierten Stabilität und Funktionalität von Membranproteinen. Diese werden momentan in ihrer natürlichen Umgebung zumeist mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die dabei stattfindende intensive Beleuchtung kann allerdings toxische Prozesse wie Wärmeentwicklungen und Photooxidationsreaktionen hervorrufen (König 1996), (König 2000). Durch die Verwendung einer für die meisten biologischen Materialien zerstörungsfreien Lichtintensität von weniger als 1 mW werden Photooxidationsprozesse bei Messungen mit SPFS weitgehend vermieden. In dieser Arbeit soll die SPFS als alternatives Verfahren erstmals an lebenden Zellen angewendet werden. Dabei soll die Expression von Rinderrhodopsin als Modell eines Membranproteins zeitaufgelöst detektiert werden (siehe *Kapitel 5*). Diese neuartige Anwendung der Detektion eines Membranproteins mittels SPFS an lebenden Zellen wird anhand von konventioneller Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien werden in höchster Qualität von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Applied Biosystems (Bedford, MA, USA), Bio-Rad Laboratories (München), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Pierce (Rockford, IL, USA), Riedel-de-Haën (Seelze), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Bacto-Agar, Hefe-Extrakt und Bacto-Trypton sind Produkte der Firma Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA). Die verwendeten Restriktionsenzyme, die zugehörigen Puffer, sowie die T4-DNA-Ligase stammen von der Firma New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Das verwendete Wasser durchläuft vor seiner Benutzung eine hausinterne Filtrationsanlage von Millipore, Schwalbach (*MilliQ*-Wasser).

Als Molekulargewichtsmarker-Protein für die SDS-Gelelektrophorese wird der *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Die benutzten Zellkulturmedien und deren Zusätze werden ausschließlich von Gibco (Invitrogen, Karlsruhe) bezogen. Für die Pipettierarbeiten werden sterile Einmalpipetten (Corning, Schiphol-Rijk, NL) verwendet. Die sterilen Gefäße für die Zellkultur stammen ebenfalls von Corning (Schiphol-Rijk, NL) oder Falcon (BD Biosciences, Heidelberg). Die sterilen Elektroporationsküvetten stammen von der Firma BioRad (München). Die benutzten autoklavierbaren Glasflaschen und -Gefäße sind Produkte von Schott AG, Mainz.

Geräte:

Autoklav: Varioklav Dampfsterilisator Typ 500E (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim)
Melag Autoklav 23 (Schembera, München)

Gelgießkammer für Agarose-Gele: Eigenbau Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Heizblock: Eppendorf Thermostat 3401 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Julabo Paratherm F12 Electronic (Seelbach)

pH-Meter: InoLab, St. Albans, UK

Schüttelinkubator: GFL 3033 (Gebr. Buddeberg GmbH, Mannheim)
Infors AG (Bottmingen, Schweiz)

Sterilbank:	HeraSafe (Heraeus, Hanau)
Vortex-Gerät:	Vortex Genie (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
Waagen:	Sartorius LP620S (Mettler, Iffeldorf) Feinwaage Toledo AE163 (Mettler)
Zentrifugen:	Beckman Coulter™ Avanti J-20XP (Beckman, Krefeld) Rotoren: JLA-8.100, JLA-10.500, JA 25.50 Beckman L7 Ultrazentrifuge (Beckman) Eppendorf MiniSpin Tischzentrifuge (Eppendorf) Eppendorf Zentrifuge 5417R (Eppendorf) Eppendorf Zentrifuge 5810R (Eppendorf)

Die PCR-Reaktionen erfolgen in dem *T3 Thermocycler* von Biometra (Leusden, NL). Die spektroskopischen Messungen zur Konzentrationsbestimmung von DNA werden mit Hellma Präzisions-Quarzküvetten in dem Spektrometer *GeneQuantII* von Pharmacia Biotech (Amersham Biosciences, Freiburg) vorgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung von Protein wird das *Spektrometer Ultrospec 3000*[®] von Pharmacia Biotech (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Weitere verwendete Geräte sind jeweils unter den beschriebenen Anwendungen aufgeführt.

2.1.2 Plasmidkonstrukte

Zur Expression von der Integrin $\alpha 11$ -Domäne, dem Rinderrhodopsin und der β -Galactosidase benutzte Plasmidkonstrukte sind in *Tabelle 2-1* aufgelistet.

Plasmidkonstrukt	codiertes Protein	Herkunft
pSFVhelper2 (Liljestrom 1991)	strukturelle Proteine des SFV	K. Lundström, Epalinges, Schweiz
pSFV3lacZ (Liljestrom 1991)	β -Galactosidase	K. Lundström, Epalinges, Schweiz
pSFV1capVSVrhodopsin	Rinderrhodopsin mit VSV-Tag*	K. Hölscher, München
pSFV1rhodopsinHIS ₆	Rinderrhodopsin mit His ₆ -Tag	K. Hölscher, München

Tabelle 1-1: Verwendete Plasmidkonstrukte

2.1.3 Bakterienstamm und Zellkulturlinien

Für die Klonierung und die Präparation von DNA aus dem Semliki-Forest-Virus (SFV)-System dient der *E.coli*-Stamm DH5 α (Hanahan 1983) mit dem Genotyp [F- $\Phi 80d/lacZ$ M15 $\Delta(lacZYA-argF)U169$ recA1 endA1 hspR17(rk-mk+)supE44 λ - thi-1 gyrA96relA1].

* Der VSV-tag besteht aus der unikalenen Peptidsequenz YDTIEMNRLGK des Vesikulären Stomatitis Virus.

Die in dieser Arbeit zur heterologen Expression von Rinderrhodopsin und β -Galactosidasebenutzten Zellkulturlinien stammen aus dem Hamster (Baby Hamster Kidney-Zellen, die als BHK-21-Zellen bezeichnet werden) und der Maus (P19-Zellen). BHK-21 Zellen (Nr. CCL10 von American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland, USA) besitzen einen meist diploiden Karyotyp mit 21% Tetraploidität. Die Zelllinie wurde 1961 aus den Nieren von 5 ungeschlechtlichen, 24 h alten syrischen Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) etabliert (MacPherson 1962). P19-Zellen (Nr. CRL 1825 von American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland, USA) entstammen einem Mäuse-Teratokarzinom (McBurney 1982).

2.2 Mikrobiologische Standardmethoden

Anzucht von Bakterienkulturen

Plattenkulturen

Zu der Herstellung von LB-Agarplatten wird LB (*Luria-Bertani*)-Medium mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wird Ampicillin zugegeben (Endkonzentration 100 μ g/ml) und die Lösung in sterile Petrischalen (Corning, Schiphol-Rijk, NL) gegossen. Die Lagerung der Platten erfolgt bei 4°C.

Zum Ausplattieren von den Glycerin- und Flüssigkulturen werden 10 – 50 μ l einer Bakterienkultur auf eine Platte pipettiert, mit einem sterilen *Drygalski*-Spatel ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB Medium	1% (w/v) Trypton
	0.5% (w/v) Hefe-Extrakt
	1% (w/v) NaCl
	10 mM NaOH

Flüssigkulturen

Die Flüssigkulturen zur Präparation von Plasmid-DNA werden in den Kulturvolumina 3 ml bis 100 ml angesetzt. Zur Anzucht einer Flüssigkultur aus einer Plattenkultur wird eine einzelne Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, in LB-Medium mit einer Ampicillin-Konzentration von 100 μ g/ml überführt und über Nacht bei 37°C, 200 – 250 U/min inkubiert.

Glyzerinkulturen

Zum langfristigen Aufbewahren von Bakterienstämmen wird die Methode der Glyzerinkultur verwendet. Dazu werden 0.5 ml einer Bakterienkultur mit dem gleichem Volumen an sterilem 87% [v/v] Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Standardmethoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Plasmidpräparation aus *E. coli* wird nach der Methode von Birnboim und Doly vorgenommen (Birnboim 1979). Entsprechend dem Flüssigkeitsvolumen der Übernachtskultur wird die Reinigung mit Hilfe der Plasmid-Kits von Qiagen (Hilden) (*Plasmid-Mini-Kit*, *Plasmid-Midi-Kit* oder *Plasmid-Maxi-Kit*) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ausbeute dieser Methode liegt bei 2–10 µg Plasmid-DNA. Die Bestimmung von der Konzentration und der Reinheit der DNA-Lösungen erfolgt spektroskopisch mit dem GeneQuant II Photometer (Biochrom, Cambridge, UK). Dabei wird für die Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA nach Sambrook *et al.* (Sambrook 1989) die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine Extinktion von $A_{260} = 1$ entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg / ml. Der Absorptions-Quotient $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ wird als Maß für die Reinheit der DNA bezüglich in der Lösung enthaltener Proteine verwendet und sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

2.3.2 Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen wie z. B. Restriktionsenzymen aus Plasmid-DNA-Präparationen wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Helgeland 1967). Hierfür wird das Volumen der DNA-Lösung mit *MilliQ*-Wasser auf 200 µl eingestellt, und die Lösung mit dem gleichen Volumen an Phenol-Chloroform-Lösung (25% [v/v] Phenol, 24% [v/v] Chloroform, 1% [v/v] Isoamylalkohol) in einem Eppendorfgefäß mit Schraubdeckel für 3 Minuten (min) auf dem Vortex-Gerät durchmischt. Zur Phasentrennung wird für 3 min bei 12000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wäßrige, DNA-haltige Phase wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die Phenol-Chloroform-Extraktion damit wiederholt. Um eventuell vorhandene Salze zu entfernen, wird die DNA-Lösung anschließend mit Ethanol gefällt. Hierfür wird mit 1/10 Volumen (vol) 3 M NaOH pH 5.2 und 2.5 vol eiskaltem EtOH abs. für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Ausgefällene DNA wird für 15 min bei 4°C, 12000 x g pelletiert, mit 70 % [v/v] EtOH gewaschen und nach dem Lufttrocknen in *MilliQ*-Wasser aufgenommen. Die so erhaltene DNA-Lösung ist weitgehend proteinfrei und kann so u. a. zur *in vitro*-Transkription (siehe Kapitel 2.2.4.1) verwendet werden.

2.3.3 Charakterisierung von DNA-Fragmenten anhand der Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von den DNA-Fragmentgemischen erfolgt durch die Agarose-Gelelektrophorese (Takahashi 1969). Hierbei werden die DNA-Moleküle mittels eines

elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung eines 1% [w/v] Agarosegels werden 0.5 g Agarose in 50 ml TBE-Laufpuffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wird eine wäßrige Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 0.5 µg pro ml Gelmaterial besteht. Die Agarose-Lösung erstarrt nach dem Gießen in eine Horizontal-Gelkammer. Für die Elektrophorese wird das Agarosegel mit dem TBE-Laufpuffer überschichtet. Die mit einem Drittel ihres Volumens an 6x Probenpuffer versetzten DNA-Proben werden in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 50 – 80 mV (*PowerEase*[®] 500 *Power Supply*, Novex, Invitrogen, Karlsruhe) aufgetrennt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm, mit *ChemiDoc-It*, Irf Labortechnik, Wasserburg) kann die Lage der DNA-Banden anhand der Fluoreszenz des in die DNA-Doppelhelices interkalierten Ethidiumbromids identifiziert werden. Die jeweilige Fragmentgröße wird mit Hilfe der verwendeten DNA-Marker (*1kb-Ladder*, Gibco, Mannheim bzw. *2log-DNA-Ladder*, New England Biolabs, Schwalbach) ermittelt.

TBE-Laufpuffer (pH 8.0) 90 mM Tris-Borat ,2 mM EDTA

DNA-Probenpuffer (6x) 0.25% [w/v] Bromphenolblau, 0.25% [w/v] Xylenxanol, 30% [v/v] Glycerin

2.3.4 Charakterisierung von RNA-Fragmenten

Die Charakterisierung von RNA-Fragmenten verlangt besonders kontaminationsfreies Arbeiten. Die benutzten Geräte und Arbeitsflächen werden vor dem Gebrauch mit *RNaseZAP-Lösung* (Ambion, Cambridgeshire, UK) dekontaminiert.

Agarose-Gelelektrophorese von RNA-Fragmenten

Für die Gelelektrophorese von den RNA-Fragmenten (Wicks 1986), (Furdon 1987) wird aus 0.7 % [w/v] Agarose, 6 ml 10x MOPS und 49.2 ml DEPC-H₂O durch Aufkochen eine Agarose-Lösung hergestellt. Nach dem Abkühlen der Agarose-Lösung auf 65°C werden 4.8 ml einer 37%igen [w/v] Formaldehydlösung zugegeben, für 5 min bei 65°C inkubiert und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren werden die mit RNA-Laufpuffer versehenen Proben in die noch pufferfreien Taschen pipettiert und das Agarose-Gel mit MOPS beschichtet. Als Marker wird *RNA-ladder* von New England Biolabs (Beverly, MA, USA) verwendet.

Die Gelelektrophorese erfolgt für den 15minütigen Einlauf der Proben bei 40 V und anschließend zur Auftrennung der Proben für 1 - 3 h bei 30 - 80 V. Das Gel wird 20 min mit Denaturierungslösung und danach für 20 min mit Neutralisationslösung behandelt. Daran folgt eine 5minütige Einfärbung in MOPS mit 0.01% [v/v] Ethidiumbromid.

10x RNA-Laufpuffer: 10% [v/v] 10x MOPS
59.2% [v/v] Formaldehyd
13.4% [v/v] Glycerin
1% [v/v] Xylenxanol

	1% [v/v] Bromphenolblau 0.5% [v/v] Ethidiumbromid
10x MOPS:	0.4 M MOPS 0.1 M NaAc 0.1 M EDTA
DEPC-Wasser:	0.1% [v/v] DEPC (Diethylpyrocarbonat) in <i>MilliQ</i> -Wasser. Die Lösung wird über Nacht in einem locker verschlossenen Gefäß unter dem Abzug inkubiert. Anschließend wird das DEPC durch Autoklavieren zerstört.
Denaturierungslösung:	0.05 M NaOH, 0.15 M NaCl
Neutralisationslösung:	0.1 M Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl

2.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Die DNA wird sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken mit Restriktionsenzymen geschnitten (Morrow 1972). Bei den analytischen Arbeiten, wie z.B. der Charakterisierung von DNA-Fragmenten, werden 1 µg DNA eingesetzt. Die präparativen Verdau wie z.B. die Linearisierung mit *SpeI* für die *in vitro*-Transkription erfolgen mit 15 µg DNA. Pro µg DNA werden dabei im Endvolumen (20 – 150 µl) des Reaktionsgemisches 2 Einheiten (analytischer Verdau) bis 6 Einheiten (präparativer Verdau) Restriktionsenzym sowie 1/10 des zugehörigen Reaktionspuffers zugegeben. Der Verdau erfolgt bei 37°C für 1 h (analytischer Verdau) bis zu 5 h (präparativer Verdau).

2.3.6 Sequenzierung von DNA

Die DNA wird nach der Didesoxymethode (Sanger 1977) unter dem Gebrauch des *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* von ABI, Columbia, MD, USA sequenziert. Dazu wird die zu sequenzierende DNA zusammen mit dem *BigDye* (optimierte Konzentrationen an dNTPs, den fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden, dem Puffer für *Taq*-Polymerase und *Taq*-Polymerase) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mittels PCR vervielfältigt.

Reaktionsansatz:	Plasmid 50 ng Primer 10 pmol <i>BigDye Kit</i> 3 µl
PCR-Bedingungen:	5 min 96°C 30 – 35 Zyklen (1 min 96°C/ 1 min Tm/ 1 min 60°C)

Die so erhaltene PCR-Probe wird durch die Gelfiltration über ein *Micro-Spin G-50* Säulchen nach den Angaben des Herstellers Pharmacia Biotech (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgereinigt und anschliessend in einer Vakuumzentrifuge (*Speed Vac Concentrator*, Bachhofer, Reutlingen) getrocknet. Die Sequenzierung erfolgt über eine Gelelektrophorese in einem DNA-Sequenzierer (*Modell 377* von Applied Biosystems, Bedford, MA, USA).

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Proteinanalytik

2.4.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wird der Bradford Test verwendet (Bradford 1976). Er enthält den Farbstoff *Coomassie Brilliantblau*, welcher an die Arginin-Reste der Proteine bindet. Durch diese Reaktion wird der Farbstoff von der kationischen in die anionische Form umgewandelt. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei von 470 nm zu 595 nm. Zu 20% [v/v] der konzentrierten Bradfordreagenz-Lösung (Bio-Rad, München) wird in einem Volumen von 1 ml 1% [v/v] der zu messenden Proteinlösung gegeben. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT wird die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration über den Vergleich zur Eichkurve mit BSA bestimmt. Für die Eichkurven werden BSA-Lösungen mit den Konzentrationen 50 µg/ml bis 1 mg/ml verwendet.

2.4.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden die Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt (Schmitt 1970). Zuvor werden sie mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert, wobei ein negativ geladener Protein-SDS-Komplex entsteht. Als Matrix für die Größentrennung wird Acrylamid eingesetzt, welches beim Polymerisieren mit Methylenbisacrylamid ein Gel ausbildet. Für die Polymerisation werden Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED) als Radikalstarter verwendet. Der Anteil an Bisacrylamid bestimmt die Porengröße des Gels und damit seinen Trennungsbereich. Um eine bessere Auftrennung der Proteine zu erreichen, wird über das Trenngel (pH 8.8) ein Sammelgel (pH 6.8) geschichtet, damit die in das Gel einlaufenden Banden möglichst schmal sind.

Die SDS-Gelelektrophorese findet in einem *XCell II mini cell apparatus* (Novex, Invitrogen, Karlsruhe) nach der Methode von Laemmli statt (Laemmli 1970). Es werden 7.5%ige bis 15%ige Gele verwendet. *Tabelle 2-2* zeigt die Zusammensetzung von 4 Gelen (15%).

Reagenzien	Trenngel (15%)	Sammelgel (4.8%)
Acrylamid/Bisacrylamid (30% [v/v])	10.05 ml	1.3 ml
1.5 M Tris, 0.4% [v/v] SDS, pH 8.8	5 ml	-
0.5 M Tris, 0.4% [v/v] SDS, pH 6.8	-	2 ml
MilliQ-Wasser	4.85 ml	4.74 ml

10% [v/v] APS	100 μ l	40 μ l
TEMED	10 μ l	4 μ l

Tabelle 2-2: Zusammensetzung von 4 Laemmli-Gelen (15%) für eine Proteingel-Gieß-Apparatur (Hoefer, Bio-Rad, München).

Die Proteinproben werden mit 6x Proteinauftragspuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert.

Die zu analysierenden Membranproteine werden für 30 min auf 37°C erhitzt.

6x Proteinauftragspuffer: 350 mM Tris/HCl pH 6.8
 350 mM SDS
 30% [v/v] Glyzerol
 600 mM DTT
 0.175 mM Bromphenolblau

Laemmli Laufpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0.1% [v/v] SDS

An das Gel wird zunächst eine Spannung von 80 mV angelegt, um die Proben in das Sammelgel einlaufen zu lassen. Zur Separierung der Proben im Trenngel wird die Spannung auf 120 mV hochreguliert. Nach der Elektrophorese werden die Gele mittels der Coomassie- bzw. der Silber-Färbemethode gefärbt. Für die Färbung mit Coomassie werden die Gele für mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend für 3 h bis über Nacht in 10% [v/v] Essigsäure entfärbt. Die Zugabe eines Einmalpapiertuchs (Tork SCA Hygiene Products GmbH, Mannheim) verbessert dabei den Entfärbeprozess.

Coomassie-Färbelösung: Coomassie Brilliant Blue 0.1% [w/v], Essigsäure 10% [v/v], Ethanol 40% [v/v]

Die Silberfärbung ist um das 50-fache empfindlicher als die Färbung mit Coomassie. Hierfür wird das Gel 1-24 h fixiert, 3x für 1-20 min mit 50% [v/v] EtOH gewaschen und 1 min in Thiosulfat-Lösung inkubiert. Nach 3x 20 sek Waschen mit Bidest-Wasser wird für 20 min mit AgNO₃-Lösung imprägniert. Diese wird 2x mit Bidest-Wasser abgewaschen, und die Banden werden bei Entwicklung in Na₂CO₃-Lösung sichtbar. Die Reaktion wird mit EDTA-Lösung abgestoppt.

Fixierlösung: 50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Eisessig, 0.1% [v/v] Formaldehyd
 Thiosulfat-Lösung: 1.26 mM Na₂S₂O₃
 AgNO₃-Lösung: 6.7 mM AgNO₃, 75% [v/v] Formaldehyd
 Na₂CO₃-Lösung: 316 mM Na₂CO₃, 0.017 mM Na₂S₂O₃, 30% [v/v] Formaldehyd
 EDTA-Lösung: 5 mM EDTA, pH 7-8

Zur Aufbewahrung werden die entfärbten bzw. entwickelten Gele in Wasser gewaschen, mit Trocknungslösung zwischen Zellglasfolie in Plexiglas-Rahmen gespannt und für 2 Tage an der Luft getrocknet.

Trocknungslösung: 10%[v/v] EtOH

5%[v/v] Glycerin

2.4.1.3 Immunodetektion

In SDS-Polyacrylamid denaturierte Proteine können aufgrund ihrer negativen Ladung durch das Anlegen eines elektrischen Feldes von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran transferiert werden. Hier sind die Proteine für eine Immunodetektion mit Antikörpern frei zugänglich.

Der Transfer der Proteine auf die Membran (Blotting) erfolgt mit *Towbinpuffer* (Towbin 1992) in einer Halbtrocken-Apparatur der Firma Novex (Invitrogen, Karlsruhe). Diese Apparatur wird unter der Benutzung von Filterpapier der Firma Whatman (Maldstone, GB) und dem *Towbinpuffer* nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für den Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) wird für 60 min eine Stromstärke von 250 mA angelegt. Der erfolgte Transfer wird überprüft, indem die Proteinbanden auf der Membran für 1–5 min mit *Ponceau S*-Lösung eingefärbt werden (Salinovich 1986). Die gefärbte Membran wird mit Bidest-Wasser gespült, bis der Hintergrund klar erscheint. Das Bandenmuster wird auf dem Rand der Membran mit Bleistift markiert und fotografiert. Das *Ponceau S* wird mit TTBS abgewaschen. Für die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wird diese mit 2% [w/v] hochreinem Casein (*Tropix I-BlockTM*, Tropix, Bedford, MA, USA) in TTBS für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Blocking-Lösung wird durch 3x 10minütiges Waschen in TTBS entfernt.

Der Blot wird anschließend mit dem Primärantikörper in einer Endverdünnung von 1:1500 bis 1:10000 (nach Angaben des Herstellers) für 1 h bei RT inkubiert. Ungebundener und unspezifisch gebundener Antikörper wird durch 3x 15 min Waschen mit TTBS entfernt. Nun wird für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in einer Endverdünnung von 1:3000 bis 1:20000 (nach den Angaben des Herstellers) inkubiert. Hier wird ebenfalls ungebundener und unspezifisch gebundener Antikörper durch 3x 15 min Waschen mit TTBS entfernt. Die in den Western Blot-Analysen verwendeten Antikörper sind in *Tabelle 2-3* aufgelistet. Die Sekundärantikörper sind jeweils an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (POD) gekoppelt, dessen Aktivität mittels Chemilumineszenz nachweisbar ist. Für den Nachweis über die POD-Aktivität wird die Membran für 1–5 min mit *Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrat* (Pierce, Rockford, USA) inkubiert. Der Immunoblot wird auf *X-omat AR* Filmen (Kodak, Stuttgart) entwickelt.

Primärantikörper	Antigen	Sekundärantikörper
anti-His ₅ (Qiagen, Hilden)	His ₅ -Tag	anti-Maus (Pierce, Rockford, IL, USA)
anti-VSV (Sigma, Deisenhofen)	VSV-Tag	anti-Maus (Pierce, Rockford, IL, USA)
anti-Ca ²⁺ -ATPase (Abcam,	Ca ²⁺ -ATPase der	anti-Kaninchen (BioRad,

Cambridge, UK)	Maus	München)
----------------	------	----------

Tabelle 2-3: In Western Blot-Analysen verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

<i>Towbinpuffer</i> (10x)	190 mM Glycin 25 mM Tris 20% [v/v] Methanol 0.01% [w/v] SDS pH 8.2 – pH 8.4
<i>Ponceau S-Lösung</i>	0.5% [w/v] Ponceau S 1% [v/v] Essigsäure 2% [v/v] 2 mM NaOH
TTBS	50 mM Tris/HCl pH 7.4 150 mM NaCl 0.1% [v/v] Tween 20®

Ein Immunoblot kann wiederverwendet und mit einem weiteren Primärantikörper untersucht werden, indem die bereits gebundenen Primär- und Sekundärantikörper wieder abgelöst werden. Hierfür wird die Membran für 20 min im Wasserbad bei 65°C in *Stripping*-Lösung inkubiert und anschließend 4x mit TTBS gewaschen. Die anschließende Behandlung folgt dem Protokoll des Immunoblots.

<i>Stripping</i> -Lösung:	62.5 mM Tris pH 6.8 2% [w/v] SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
---------------------------	--

2.4.1.4 UV-Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektroskopie wird in einer Peptidkonzentration von 4×10^{-5} M an einem UV/Vis Spektrometer *Lambda 19* von Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim) in Quarzglasküvetten (Hellma, Müllheim) bei 25°C durchgeführt. Die Peptidkonzentrationen werden jeweils durch das Gewicht und den Peptidgehalt ermittelt. Als Referenz dient jeweils eine Probe ohne den zugegebenen Chromophor oder der Puffer, in dem das jeweilige Protein gelöst ist.

2.4.1.5 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopischen Messungen werden von der Gruppe Christian Renner, Abteilung Bioorganische Chemie, an *Bruker DRX 500* und *DMX 750* Spektrometern (Bruker, Ettlingen) bei 30°C vorgenommen.

2.5 Zellbiologische Methoden

In der Anwendung aller zellbiologischen Methoden wird besonders auf Sterilität geachtet. Bei der Handhabung der kultivierten Zellen wird dem Lehrbuch von T. Lindl gefolgt (Lindl 2000).

2.5.1 Kultivierung von adhärennten Säugetierzellen

Die verwendeten adhärennten Zellkulturen wachsen in horizontalen, flachen Gewebekulturgefäßen (T₂₅, T₇₅ und T₁₇₅ von Corning, Schiphol-Rijk, NL) in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) bei kontinuierlich 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von ca. 80%. *In vitro* senken die Zelllinien ihre Proliferationsrate bis zum Wachstumsstopp, sobald die zur Verfügung stehende Kulturfläche eingenommen ist. Das vollständige Bedecken der Kulturfläche mit Zellen wird als Konfluenz bezeichnet. Ab einer Dichte von etwa 80% Konfluenz werden die verwendeten Zellkulturen passagiert, d.h., sie werden unter Verdünnung mit frischem Kulturmedium in ein neues Kulturgefäß überführt. Hierfür werden die adhärennten Zellen mit 37°C warmer PBS-Lösung ohne Mg²⁺ and Ca²⁺ (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen, da geringste Spuren von Medium die Wirkung der Trypsin-Protease beeinträchtigen. Die Ablösung der Zellen von der Substratunterlage erfolgt proteolytisch durch das Benetzen mit Trypsin/EDTA-Lösung (5 ml für eine T₁₇₅-Zellkulturflasche). Diese wird für 30 sek bei RT (P19-Zellen) bzw. 2-3 min bei 37°C (BHK-Zellen) inkubiert. Durch Abklopfen (mit der Handinnenfläche an die Seitenkante der Zellkulturflasche) werden die Zellen zusätzlich von der Unterlage geschüttelt. Zur Inaktivierung des Trypsins durch das im BHK-Medium enthaltene Serum werden die Zellen mit 10 ml frischem, 37°C warmem Medium abgespült und in ein steriles *Falcon*-Gefäß (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA) überführt. Um eventuell noch vorhandene EDTA-Reste zu entfernen, wird die Zellsuspension bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in frischem 37°C warmem Medium resuspendiert. Hierfür werden ausnahmslos 5 ml-Sterilpipetten benutzt, deren erzeugte Scherkräfte ein Resuspendieren bei dem gleichzeitigen Erhalt der Vitalität ermöglichen.

2.5.2 Fixierung von Säugetierzellen

Methanolfixierung

Für die Methanolfixierung werden die adhärennten Zellen 3x mit kaltem PBS gewaschen und mit 100% Methanol überdeckt für 60 sek bei -20°C inkubiert. Anschließend wird 3x mit kaltem PBS gewaschen, zwischen den Waschsritten 5 min bei RT inkubiert und wieder 3x mit kaltem PBS gewaschen. Die so fixierten Zellen werden bei 4°C aufbewahrt und für die Immunofluoreszenz-Detektionen verwendet.

Fixierung mit Paraformaldehyd

Die wie bei der Methanolfixierung mit kaltem PBS gewaschenen Zellen werden mit 4% [w/v] Paraformaldehyd überdeckt und für 20 min unter dem Abzug inkubiert. Dabei werden Erschütterungen des Substrats vermieden. Anschließend wird mindestens 7x mit PBS gewaschen und zwischen den Waschschritten für jeweils 5 min inkubiert. Die mit Paraformaldehyd fixierten Zellen werden für die Immunofluoreszenz-Messungen mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica, Heidelberg) verwendet.

Paraformaldehyd (PFA) –Stocklösung, 16% [w/v]:

32 g Paraformaldehyd werden in 200 ml H₂O gelöst. Um das Lösen zu erleichtern, wird 0.34 g Na₂CO₃ zugegeben und auf einer Heizplatte gerührt. Dabei wird nicht über 60°C erhitzt. Die Lagerung von Aliquots erfolgt bei -20°C.

PBS (10x)	81 mM Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O
	17.6 mM KH ₂ PO ₄
	1.5 M NaCl
	pH 7.4

2.5.3 Heterologe Expression von Proteinen mit Hilfe des Semliki-Forest-Virus-Systems

Der Semliki Forest Virus (SFV) wird in einer veränderten Form (Liljestrom 1991) zur effizienten heterologen Expression von funktionellen Proteinen, auch Membranproteinen, in Säugerzellen verwendet (Lundstrom 2003), (Lundstrom 2003). Die Infektion einer Zelle mit dem SFV-System (siehe *Abb. 2-1*) führt zur Unterdrückung der Expression von zelleigenen Proteinen zugunsten der Überexpression des gewünschten Proteins (Lundstrom 1994). Das SFV-System besteht aus Sicherheitsgründen aus zwei Plasmiden (Liljestrom 1991). Das Expressionsplasmid enthält eine genomische cDNA, die hinter den SP6-Promotor in ein Virus-Plasmid inseriert wird. Dieses Plasmid enthält außerdem Verpackungssignale sowie nicht-strukturelle virale Gene, welche eine autonome Replikation ermöglichen. Das Helfer-Plasmid kodiert für die strukturellen Gene des Virus. Es enthält keinerlei Verpackungssignale. Um rekombinante Viruspartikel zu erhalten, werden die RNA-Transkripte beider Vektoren cotransfiziert. Die neu entstandenen Viruspartikel enthalten dann nur die cDNA des gewünschten Gens, da die strukturellen Gene nicht mit verpackt werden. Diese rekombinanten Viruspartikel sind zur einmaligen Neuinfektion imstande, um das gewünschte Protein zu produzieren.

Um auch das Entstehen eines geringen Prozentsatzes replikationsfähiger Viren zu verhindern, enthält das SFV-System eine zweite Sicherheitsstufe (Berglund 1993). Eine Variante des Helfer-Plasmids, Helfer 2, liefert ein spaltungsdefizites p62-Spike-Protein, dessen Spaltung essentiell für eine erfolgreiche Neuinfektion ist. Mit dem Helfer 2-Plasmid produzierte rekombinante Viruspartikel sind daher erst nach einer *in vitro*-Behandlung mit α -Chymotrypsin aktiv.

Das Gen des viralen Capsid-Proteins enthält ein Verstärkungssignal für die Translation an seinem 5'-Ende. Eine Fusion dieses Capsid-Gens mit dem gewünschten Gen kann zu einer 5-10fach erhöhten Expression führen. Dabei wird das Capsid-Protein autokatalytisch abgespalten (Sjoberg 1994). In dieser Arbeit wird das Capsid-Gen in dem Plasmid pSFV1capVSVrhodopsin verwendet.

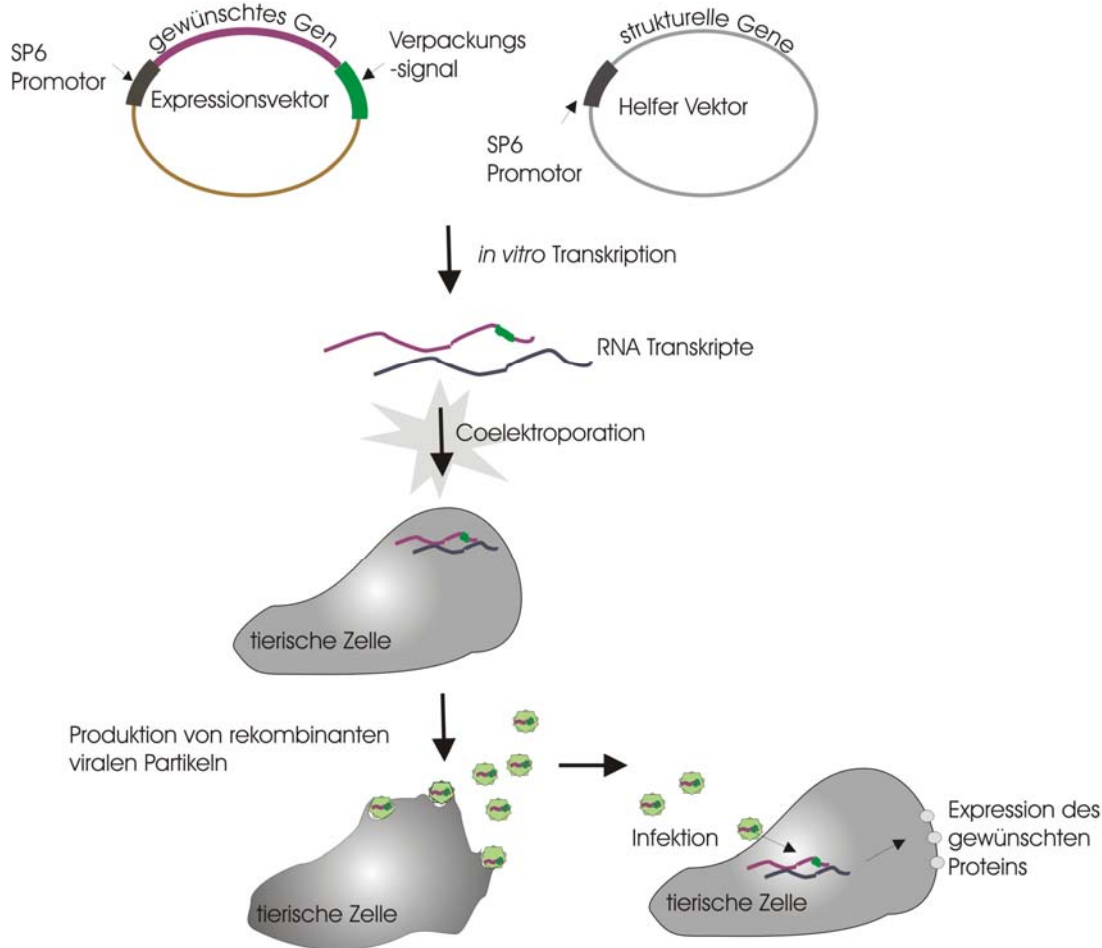


Abb. 2-1 Schematische Darstellung des Semliki Forest Virus-Expressionssystems.

2.5.3.1 Generation von Semliki-Forest-Virusstock

In vitro-Transkription von linearisierten pSFV-Plasmiden

Der im pSFV-Vektor vorliegende SP6-Promotor ermöglicht eine *in vitro*-Transkription (Vos 1984). Hierfür werden jeweils 15 µg des rekombinanten pSFV-Plasmids sowie des pSFVHelfer2 mit *SpeI* linearisiert (siehe Kapitel 2.3.5) und anschließend mit der Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Kapitel 2.3.2) aufgereinigt. Jeweils 2.5 µg linearisierte Plasmid-DNA werden mit den Reagenzien für die *in vitro*-Transkription gemischt. Das im SP6-Polymerase-Puffer enthaltene Spermidin kann bei Temperaturen um 4°C eine Fällung der Plasmid-DNA verursachen (Razin 1959). Daher erfolgt die Herstellung der Ansätze bei

Raumtemperatur. Die *in vitro*-Transkription findet in einem Volumen von 50 µl für 60 min bei 37°C statt.

in vitro Transkription: 10% [v/v] 10x SP6-Polymerase-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim)
5 mM DTT
1 mM rNTP-Mix (Roche Diagnostics, Mannheim)
1 mM m7G(5')ppp(5')G *Capping Structure* (Roche Diagnostics, Mannheim)
60 Einheiten RNAsin (Stratagene)
70 Einheiten SP6-RNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)
RNase-freies Wasser
2.5 µg linearisierte Plasmid-DNA

Die Überprüfung der *in vitro*-Transkription erfolgt auf einem RNA-Gel (siehe *Kapitel 2.3.4*). Währenddessen werden die Proben auf Eis gelagert.

Transfektion in Säugetierzellen

Für die Transfektion mit rekombinantem SFV-Transkript werden BHK bzw. P19-Zellen, die in der Zellkulturflasche 80% konfluent gewachsen sind, mit Hilfe von Trypsin geerntet (siehe *Kapitel 2.5.1*). Die Zellen werden zweimal mit PBS ohne Mg²⁺ and Ca²⁺ gewaschen, und die Zellzahl wird unter Verwendung dieses Puffers auf 10⁷ Zellen/ml eingestellt. Für jeden Elektroporationsansatz werden 0.4 ml Zellsuspension in Elektroporationsküvetten der Spaltbreite 0.2 cm (BioRad, München) pipettiert. Die Zellen werden mit dem Ansatz der rekombinanten RNA und der Hälfte des Ansatzes des Helfer 2 Plasmids gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation findet in zwei direkt aufeinanderfolgenden Pulsen zu je 1.5 kV, 25 µF und R = ∞ statt (Hölscher 1999). Die Zeitkonstante beträgt jeweils 0.7 – 0.8 ms. Transfizierte Zellen werden für 5 min auf Eis inkubiert. Jeder Ansatz wird in 10 ml frischem Medium aufgenommen und für 24 h in einer T₂₅ Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Reife Viruspartikel werden von transfizierten Zellen ins Medium abgeschnürt. Dieses wird durch Abpipettieren geerntet, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Aktivierung der rekombinanten Viruspartikel

Vor der Neuinfektion werden die rekombinanten Virusstocks durch 15 bis 20 minütige Proteolyse mit 1/100 vol α-Chymotrypsin (20 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) bei RT aktiviert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1/20 vol des Trypsin-Inhibitors Aprotinin (10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) terminiert.

2.5.3.2 Bestimmung des Virustiters

Der Titer eines Virus wird durch seine Anzahl an Plaque bildenden Einheiten, „plaque forming units (pfu) pro ml angegeben. Für die Ermittlung des Virustiters wird eine 80% konfluent mit Zellen bewachsene 12 well-Zellkulturplatte (Corning, Schiphol-Rijk, NL) mit einer Verdünnungsreihe des frisch aktivierten Virus (10 – 10⁻⁶ %) infiziert. Nach über Nacht-

Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ werden die Zellen fixiert. Die Expression des rekombinanten Proteins und damit die Aktivität des Virusstocks werden mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie (VSV-Rhodopsin) bzw. mittels 15minütiger Inkubation in *LacZ-Färbelösung* (β-Galactosidase) nachgewiesen. Die höchstmögliche Verdünnung, bei der positive Zellen detektiert werden können, entspricht dem Titer des Virus.

LacZ-Färbelösung: PBS mit 2.5% [v/v] X-Gal (BioRad, München)
20 mM MgCl₂
1 mM K₃Fe(CN)₆
1 mM K₄Fe(CN)₆

2.5.3.3 Infektion von Säugetierzellen mit rekombinantem Semliki-Forest-Virus

Für diese Arbeit wird jeweils eine Anzahl von 3×10^5 Zellen mit 500 µl Virusstock eines Titers von 10^6 pfu/ml infiziert. Die Zellen werden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Dabei wird im Abstand von 15 min kontrolliert, ob die Zellen noch von Flüssigkeit bedeckt sind, und gegebenenfalls frisches Medium nachgefüllt. Nach 1 h Inkubationszeit wird der Virusstock entfernt und die Zellen mit 37°C warmem Medium gewaschen. Die Zellen werden mit frischem, 37°C warmem Medium bedeckt und für die jeweilige Expressionszeit bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.5.4 Immunodetektion mittels Fluoreszenzmikroskopie

Für die Immunodetektion mittels Fluoreszenzmikroskopie wird ein *24-well*-Kulturgefäß (Corning, Schiphol-Rijk, NL) mit 3×10^5 Zellen pro Vertiefung angeimpft und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nicht adhärierte Zellen werden anschließend mit frischem 37°C warmem Medium abgewaschen. Die adhärierten Zellen werden mit aktivierter SFV-Stocklösung infiziert (siehe *Kapitel 2.5.3.1*).

2.5.4.1 Immunodetektion mittels Fluoreszenzmikroskopie an fixierten Zellen

Zur Immunodetektion an fixierten Zellen wird die Zellschicht mit PBS gewaschen und mit Methanol oder Formaldehyd fixiert (siehe *Kapitel 2.5.1*).

Für die Immunofärbung wird eine Lösung von anti-VSV-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) für 1 h auf die fixierten Zellen gegeben. Anschließend wird 3x mit PBS gewaschen und im Dunkeln für 1 h mit anti-Maus-Cy3-konjugiertem Antikörper (Sigma, Deisenhofen) bzw. anti-Maus-Alexa-488-konjugiertem Antikörper (Molecular Probes, Leiden, NL) inkubiert. Die Antikörper werden hierfür in einer Endkonzentration von 1:1000 in einer Lösung aus PBS mit 1% [w/v] hochreinem Casein (*Tropix I-BlockTM*, Tropix, Bedford, MA, USA) verwendet.

Anschließend wird abermals 3x mit PBS gewaschen. Die angefärbten Zellen werden mit PBS überschichtet und im Zeiss Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen) unter Verwendung einer Olympus DP10-Kamera (Olympus, Hamburg) analysiert.

2.5.4.2 Immunodetektion mittels Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen

Für die Immunofärbung lebender Zellen wird für alle Inkubations- und Waschschriffe PBS mit Mg^{2+} and Ca^{2+} (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, um das Ablösen der Zellen zu minimieren. Für die Antikörperlösungen wird 1% [w/v] BSA als Blockingreagent benutzt. Die einzelnen Inkubationsschritte finden wie in *Kapitel 2.5.4.1* beschrieben, aber bei 4°C statt. Dabei ist die Inkubationszeit des primären Antikörpers auf 30 min, die des sekundären auf 45 min beschränkt.

2.5.5 Präparation von Plasmamembranen aus Säugetierzellen

Plasmamembranen von Säugetierzellen werden nach dem Protokoll von Morr e und Morr e (Morr e 2000) präpariert. Diese Methode basiert auf der unterschiedlichen Verteilung der Zellbestandteile in einem wässrigen 2-Phasen-System, das aus Dextran und Polyethylenglycol (PEG) gebildet wird. Von den tierischen Zellmembranen haben Plasmamembranen die höchste Affinität für die obere Phase aus Dextran.

Für eine Plasmamembranpräparation werden die Säugetierzellen mit Hilfe von Trypsin pelletiert und mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wird die Anzahl der Zellen mit einer Zählkammer bestimmt und die Zellen in 1 ml Karbonatpuffer pro 10^8 Zellen aufgenommen. In diesem Puffer werden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Die so aufgequollenen Zellen werden mit einem Glaspotter adäquater Größe auf Eis aufgeschlossen. Dieser Zellaufschluß wird unter dem Lichtmikroskop überprüft. Die Lösung wird für 10 min bei 4°C und 175 x g zentrifugiert. Das hier entstehende Pellet enthält unaufgeschlossene Zellen, die noch einmal mit Hilfe des Potters aufgeschlossen werden. Das im Überstand enthaltene Lysat wird für 30 min bei 4°C und 25000 x g zentrifugiert. Das aus dieser Zentrifugation hervorgehende Pellet enthält die Gesamtmembranen, die in dem 2-Phasen-System getrennt werden. Dafür werden sie in 1 ml Kaliumphosphatpuffer pro 5×10^8 Zellen aufgenommen und zu dem 2-Phasen-System pipettiert. Das Gewicht des 2-Phasen-Systems mit Gesamtmembranen wird mit Kaliumphosphatpuffer auf insgesamt 16 g eingestellt. Anschließend wird die Lösung bei 4°C durchmischt, und die Phasen in einem frei schwingenden Rotor (Eppendorf Zentrifuge 5810R, Wesseling-Berzdorf) für 5 min bei 4°C und 1150 x g separiert. Die obere, Plasmamembranen enthaltene Phase wird vorsichtig abgenommen und mit 10 ml Karbonatpuffer gewaschen. Die Plasmamembranen werden für 30 min bei 4°C und 25000 x g pelletiert und in 1 ml Phosphatpuffer pro anfänglich 5×10^8 Zellen aufgenommen.

Karbonatpuffer: 1 mM $NaHCO_3$
0.2 mM EDTA

Phosphatpuffer: 28% [v/v] 0.1 M KH_2PO_4
72% [v/v] 0.1 M K_2HPO_4

2-Phasen-System: 6.6% [w/v] Dextran T500 (Amersham Biosciences, Freiburg)

6.6% [w/v] PEG 3350 (Sigma, Deisenhofen)
Phosphatpuffer ad 14 g (+ Gesamtmembran-Fraktion, dann Phosphatpuffer ad 16 g)

2.6 Methoden zur photomodulierbaren Bindungsmessung an Integrin $\alpha_v\beta_3$

2.6.1 Aufbau einer peptidunterstützten Membran mit inkorporiertem Integrin

Aufbau einer peptidunterstützten Monolipidschicht

Eine artifizielle peptidunterstützte Membran wird bei RT auf einem goldbeschichteten Glassubstrat generiert (Schmidt 1998), (Knoll 2000), (Sinner 2003), (Sinner 2004). Der Vorgang des Aufbaus wird durch die Zunahme der Schichtdicke mit der Methode der Plasmonenspektroskopie detektiert (siehe *Kapitel 3*).

Zum Aufbau einer peptidunterstützten Membran chemisorbieren 0.5 μg in 500 μl Wasser gelöstes Lamininpeptid CSRARKQAASIKVAVSADR (Derivat der α -Laminin-Untereinheit, Sigma, Deisenhofen) für 20–60 min an die Goldoberfläche. Ungebundenes Peptid wird mit 1 ml sterilfiltriertem *MilliQ*-Wasser abgespült. Anschließend wird die terminale Carboxygruppe des Peptids aktiviert. Dies geschieht während einer 10minütigen Inkubation mit einer Lösung aus gleichen Volumina von 200 mM *N*-ethyl-*N*-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC, Fluka, Neu-Ulm) und 50 mM *N*-hydroxysuccinimid (NHS, Fluka, Neu-Ulm). An die aktivierte Peptidschicht wird während einer Inkubationszeit von 45 min eine Lipidschicht aus Dimyristoylphosphatidyl-Ethanolamin-Lösung (DMPE, 0.3 mg/ml gelöst in 0.003% [w/v] Triton X-100) angekoppelt. Ungebundenes DMPE wird mit 1 ml Bindungspuffer (BP) abgespült.

Bindungspuffer (BP): 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
1 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Inkorporation des Integrins in Lipidvesikel

Zur Generation von Liposomen mit inkorporiertem Integrin werden 40 μl Phosphatidylcholin (PC)-Lösung (aus Sojabohnen von Fluka, Neu-Ulm; 1 mg/ml in CHCl_3) in einen sterilen 10 ml-Glaskolben pipettiert. Durch Evaporation des Lösungsmittels CHCl_3 mit Helium wird ein dünner Phospholipidfilm erzeugt. Eine Protein-Lipid-Emulsion entsteht durch Vortexen nach gleichzeitiger Zugabe von 2.5 ml BP und 5 μg Integrin $\alpha_v\beta_3$ (in 10 mM *n*-Octyl- β -*D*-Glucopyranosid, von Chemicon, Temecula, USA). Die Protein-Lipid-Emulsion wird 3x in einem Vesikel-Extruder (LiposoFast, Avestin, Ottawa, Canada) mit gleichmäßiger Geschwindigkeit durch einen Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 100 nm) gepresst.

Vesikelspreitung

Die unilamellaren Vesikel werden unmittelbar nach dem Extrusionsprozeß auf die Thiopeptid-Lipid-Schicht gegeben. Durch Interaktion mit den hydrophoben Acylresten der DMPE-Schicht organisiert sich während einer Inkubationszeit von 2 h spontan eine Lipiddoppelschicht mit inkorporierten Integrinmolekülen (Bunjes 1997), (Sinner 2004). Nicht gebundene Vesikel werden durch Spülen mit 1 ml BP entfernt.

2.6.2 Photoisomerisierung der cRGD-Azo-Liganden

Zur Photoisomerisierung werden 40 nmol des synthetischen cRGD-Azo-Peptids in 300 µl Kopplungspuffer (0.1 M Na₂CO₃ pH 9.3) gelöst, um die anschließende Markierung mit Fluorophor zu ermöglichen (siehe Kapitel 2.6.3). Die Photoisomerisierung erfolgt mit einem Gerät der Firma Müller Elektronik-Optik (Moosinning), welches mit einem Quarzkondensator, sphärischen Rückspiegeln sowie einer Blende ausgestattet ist. Als Strahlungsquelle dient eine 450 W XBO Xenonlampe Typ SVX150 (Osram, München). Der Lichtstrahl wird zunächst durch ein Wasser-Reservoir zur Filterung der IR-Strahlung geleitet, um die nachfolgenden UV/Vis-Filter vor Erwärmung zu schützen. Mit Hilfe eines Flüssigkeitslichtleiters (3 mm-3 m, Müller Elektronik-Optik, Moosinning) kann in ein geöffnetes 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß direkt auf die Peptidlösung belichtet werden. Für die Isomerisierung zur *trans*-Konformation bei 450 nm wird eine Kombination von GG435- und BG12-Filtern (Itos, Mainz) verwendet. Für die Isomerisierung zur *cis*-Konformation bei 360 nm wird ein UG1-Filter (Itos, Mainz) benutzt. Nach einer Belichtungszeit von 20 min wird das Gefäß verschlossen, durch Umhüllen mit Alufolie vor Tageslichteinwirkung geschützt und bei 4°C gelagert.

2.6.3 Fluorophormarkierung des cRGD-Azo-Liganden

Zur Markierung mit monofunktionellem Cy5-Fluoreszenzfarbstoff (Amersham Biosciences, Freiburg; λ_{ex} = 649 nm, λ_{em} = 670 nm) wird das photoisomerisierte Peptid im Dunkeln in das lyophilisierten Cy5-Farbstoff enthaltende Reaktionsgefäß des Herstellers pipettiert. Das Gefäß wird sofort durch Umhüllen mit Alufolie weiter im Dunkeln gehalten. Die Kopplungsreaktion erfolgt während leichtem Schütteln für 3 h bei RT. Anschließend wird ungekoppelter Farbstoff durch Zugabe von 5 µl 1 M Ethanolamin/HCl pH 8.3 abgesättigt. Da keine unspezifische Bindung von Cy5-Farbstoff an die verwendeten Oberflächen beobachtet werden kann, wird ungebundener Farbstoff nicht aus der Präparation des Cy5-markierten Peptids entfernt. Die Cy5-Peptid-Präparation wird im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.7 Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (FLIC)

2.1.1 Theoretischer Hintergrund

Die Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (FLIC) beruht auf dem Interferenzeffekt der Fluoreszenz eines Farbstoffes vor einer reflektierenden Oberfläche. Dieser Interferenzeffekt hängt unter anderem von den Eigenschaften des Schichtsystems dieser Oberfläche ab (Lambacher 1996), (Lambacher 2002). FLIC wird in dieser Arbeit dazu verwendet, den Abstand von adhären den Zellmembranen zur Substratoberfläche zu bestimmen. Dafür werden Säugetierzellen auf einem Silikonchip mit definierten Mikrostrukturen (eigene Anfertigung der Abteilung Membran- und Neurophysik) kultiviert. Auf der gesamten Fläche des Silizium-Siliziumoxid-Chips ist eine regelmäßige Struktur aus Rechtecken von vier verschiedenen Dicken eingätzt. Die hierauf kultivierten Zellen adhären über mehrere dieser Rechtecke (siehe *Abb. 2-2*). Zur Untersuchung werden die lebenden Zellen mit dem spezifisch in die Membran interkalierenden Farbstoff DiIC₁₈(3) (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbo-cyanin Perchlorat, Molecular Probes, Invitrogen, Mannheim) behandelt. Das Fluoreszenzmuster in dem Bereich der Zelladhäsion wird mit einer CCD-Kamera (Theta-System, Gröbenzell, SIS1-s285), die an ein Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioskop mit Achroplan 100x/1,0 Wasser) gekoppelt ist, untersucht. Durch quantitative Analyse des Fluoreszenzmusters kann der Abstand von Zelle zu dem Substrat bestimmt werden (Braun 1997), (Sorribas 2001), (Gleixner 2004).

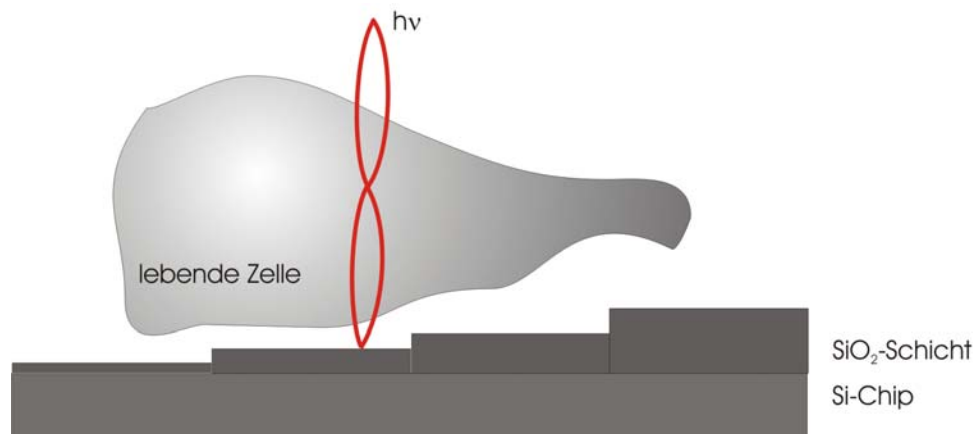


Abb. 2-2: Schematische Darstellung von Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (FLIC)

2.1.2 Durchführung der Messungen

Färbungsprozedur:

Zur Färbung von lebenden Zellen mit DiIC₁₈(3) werden 2 µl einer 5 mM Stocklösung zu 2 ml Zellkulturmedium gegeben. Darin werden die Zellen auf dem Chip im Dunkeln für 10 min inkubiert. Anschließend wird die Färbelösung sorgfältig entfernt und gegen frisches

Zellkulturmedium ausgetauscht. Gefärbte lebende Zellen werden innerhalb einer Stunde nach Anfärbung mittels FLIC untersucht.

Datenauswertung

Die Fluoreszenzphotografien werden mit Hilfe des Programms *New Extractor* (von A. Lambacher, R. Gleixner, Abteilung Membran- und Neurophysik) ausgewertet. Hierfür werden die Fluoreszenzintensitäten auf den vier verschiedenen Oxidschichtdicken bestimmt und mittels der von Lambacher (Lambacher 2002) beschriebenen Theorie die Abstände der Zellen von der Substratoberfläche ausgerechnet.

2.8 Datenanalyse

Zur digitalen Analyse und Auswertung von Daten werden folgende Programme benutzt:

Adobe Acrobat 6.0 Professional, Adobe Photoshop 6, CorelDraw 11, CorelPhotoPaint 11, DNAssist 2.0, Endnote 4, Excel XP, Igor Pro 5.01, Isis Draw 2.4, Nero Burning ROM, New Extractor, Origin 6.1, pDraw 32, PowerPoint XP, Sequencer, WasPlas 2.19, WaspView 3.34, Winspall 2, Word XP.

3 Plasmonenspektroskopie

In dieser Arbeit werden Oberflächenplasmon-Polaritonen an der Grenzfläche von Wasser und Gold (Burstein 1972) (im Folgenden vereinfacht als Oberflächenplasmon bzw. SPP bezeichnet) benutzt, um die Bindung von fluoreszenzgekoppelten Liganden an Integrinrezeptoren (siehe *Kapitel 4*) bzw. die Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper an Rinderrhodopsin (siehe *Kapitel 5*) nachzuweisen. Da das eingestrahlte Licht in der Nähe der Goldoberfläche durch die Anregung von Plasmonen verstärkt wird (Raether 1988), kommt es zu einer verstärkten Fluoreszenz der angekoppelten Fluorophore, sofern der Bindungsprozeß nahe der Grenzfläche stattfindet (Sasaki 1983), (Attridge 1991). Dies kann durch entsprechende Probenpräparationen von artifiziellen Membranen und, wie in dieser Arbeit gezeigt wird, sogar von lebenden Zellen auf Goldfilmen erreicht werden (siehe *Kapitel 5*). Damit stellt die sog. Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) eine besonders sensitive, nichtinvasive Detektionsmethode dar (Schmidt 1998), (Schmidt 1998), (Liebermann 2000), (Neumann 2002), (Yu 2003), (Ekgasit 2004).

3.1 Theoretischer Hintergrund

Oberflächenplasmonen sind eine gekoppelte elektromagnetische Anregung von Elektronen und Photonen, die sich entlang der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrium ausbreiten (Raether 1988). Oberflächenplasmonen erzeugen ein evaneszentes Feld, dessen Intensität senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abfällt, an der Grenzfläche jedoch gegenüber der einfallenden Lichtintensität um ein Vielfaches überhöht ist. Der Verstärkungsfaktor ist dabei von dem jeweiligen Metall abhängig. Für eine Gold/Wasser-Grenzfläche beträgt diese Verstärkung bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm etwa den Faktor 16 (Liebermann 2000), (Neumann 2002), (Yu 2003).

Optische Anregung von Oberflächenplasmonen

Plasmonen können durch das Einstrahlen von Photonen angeregt werden, wenn Energie und Impuls beider übereinstimmen. Eine Reflexion von Licht an der Metalloberfläche reicht für eine Anregung von Plasmonen nicht aus, da der Impuls k_{ph} eines Photons in Luft stets kleiner ist als der Impuls k_{SPP} eines Oberflächenplasmons. Eine Anregung von Plasmonen kann daher nur stattfinden, wenn der Impuls des Photons entsprechend erhöht wird. Diese Impulserhöhung kann durch eine Reflexion von Photonen an der Grenzfläche Glas/Metall erreicht werden, was in der sog. Kretschmann-Konfiguration realisiert wird (*siehe Abb. 3-1*)

(Kretschmann 1968), (Kretschmann 1971). Da Oberflächenplasmonen auch eine longitudinale Feldkomponente aufweisen, wird zu ihrer Anregung ein elektrisches Feld E parallel zu k_x benötigt, was bei p-polarisiertem Licht gegeben ist.

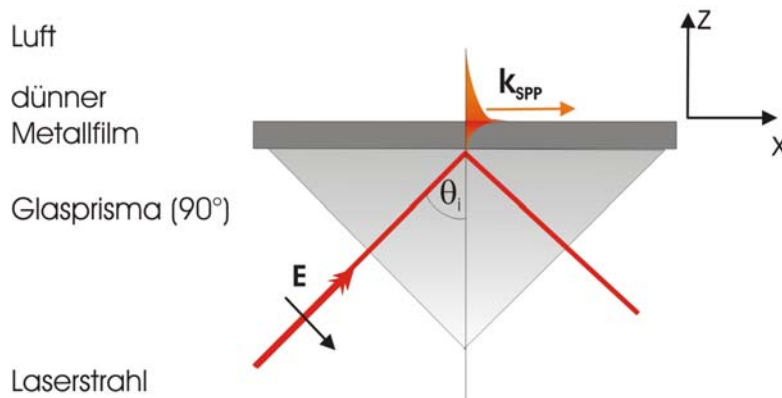


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Anregung von Oberflächenplasmonen in der Kretschmann-Konfiguration. Das Oberflächenplasmon propagiert mit dem Wellenvektor k_{SPP} entlang der Grenzfläche zwischen Metall und Luft.

Die zur Anregung von Oberflächenplasmonen benötigten Verhältnisse zwischen Energie und Impuls bzw. zwischen Frequenz und Wellenvektor[†] können als sog. Dispersionsrelationen $\omega(k_x)$ für Plasmonen und Photonen dargestellt werden. Aufgrund des höheren Brechungsindex weist die Lichtgerade $\omega(k_{x,ph})$ in Glas eine geringere Steigung auf als in Luft. Dadurch entsteht ein Schnittpunkt mit der Dispersionsrelation $\omega(k_{x,spp})$ des Plasmons, an dem sowohl Impuls und Energie von Plasmon und Photon übereinstimmen (siehe auch *Abb. 3-2*). Diese Übereinstimmung ermöglicht die Anregung von Plasmonen.

In den meisten Versuchsaufbauten findet die Plasmonenanregung bei einer bestimmten Wellenlänge λ statt. In diesem Fall kann der Impuls der Photonen durch eine Änderung des Einfallswinkels θ_i angepaßt werden (Knoll 1998) (siehe *Abb. 3-2*). Entscheidend für die Anregung von Plasmonen ist nämlich nicht der Wellenvektor des Photons k_{ph} , sondern dessen Projektion $k_{ph,x} = k_{ph} \cdot \sin \theta_i$ auf die Grenzfläche. Der Winkel, der die Bedingung $k_{SPP} = k_{ph,x}$ zur Anregung von Plasmonen erfüllt, wird im folgenden θ_{SPP} genannt.

[†] Energie ($E = \hbar\omega$) und Impuls ($p = \hbar k$) sind sowohl für Plasmonen als auch Photonen zur Frequenz ω bzw. zum Wellenvektor k proportional.

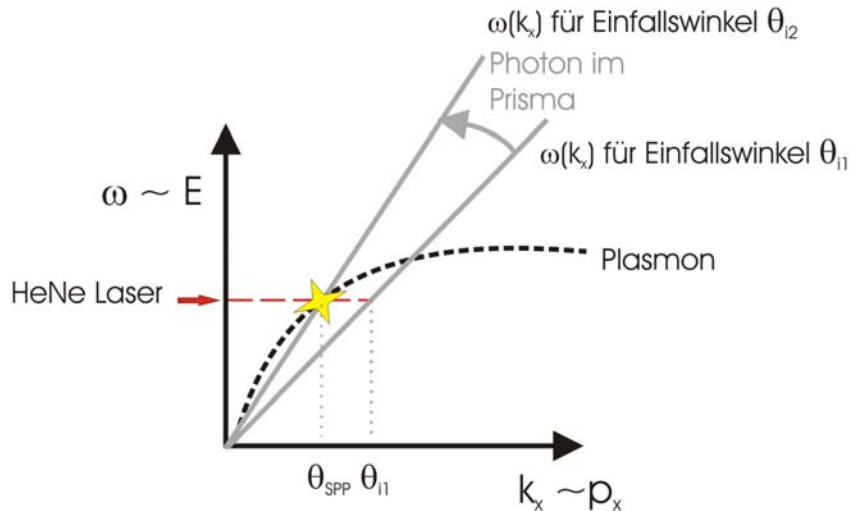


Abb. 3-2: Anregung von Oberflächenplasmonen mit einem Laser einer festen Frequenz durch die Änderung des Einfallswinkels θ_i . Zur Anregung von Plasmonen durch eingestrahktes Licht ist die Projektion des Wellenvektors der Photonen $k_{ph\ x} = k_{ph} \cdot \sin \theta_i$ auf die Grenzfläche entscheidend. Ein Schnittpunkt der Dispersionsrelationen von Licht und Plasmonen wird durch die Anpassung des Winkels θ_i erreicht.

Die Anregung von Oberflächenplasmonen kann durch das Verhältnis $R = I_r/I_i$ (reflektierte Leistung / eingestrahkte Leistung) in Abhängigkeit des Einfallswinkels dargestellt werden (siehe Abb. 3-3). Bei geringen Einfallswinkeln θ_i nimmt zunächst die reflektierte Leistung zu, bis bei θ_c der sog. kritische Winkel erreicht wird. Hier beginnt die Totalreflexion des Lichts an der Grenzfläche Glas/Metall. Die Reflexion wird maximal und erreicht fast 100%, d.h. $R = 1$. Durch eine weitere Erhöhung des Einfallswinkels beginnt der Bereich, in dem Plasmonen angeregt werden können. Sobald die Plasmonenanregung erfolgt, nimmt die reflektierte Leistung I_r ab, da die eingestrahkte Leistung auf das Plasmon übertragen wird. Beim sog. Resonanzwinkel θ_{SPP} entsteht ein Minimum in der reflektierten Leistung. Hier findet die maximale Plasmonenanregung statt.

Wird nun eine dünne Schicht auf der Metalloberfläche adsorbiert (siehe Abb. 3-3), so ändern sich in Abhängigkeit des Brechungsindex des adsorbierten Materials und der Schichtdicke der Wellenvektor bzw. der Impuls des Plasmons (Knoll 1998). Dadurch verschiebt sich das Minimum zu einem größeren Winkel θ_{SPP} (siehe Abb. 3-3). Dieser Effekt bietet die Möglichkeit, den Brechungsindex bzw. die Schichtdicke von Adsorptionschichten von nur wenigen nm zu messen.

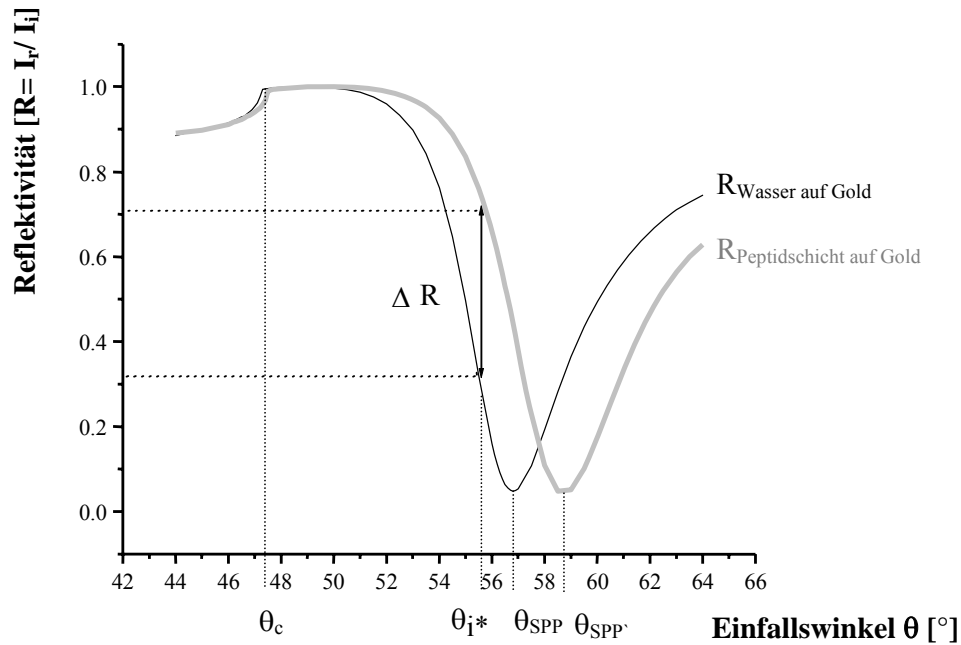


Abb. 3-3: Chemisorption eines Peptids. Das Plasmon wird durch das Verhältnis der Intensität von eingestrahlttem Licht (I_i) zu der Intensität von reflektiertem Licht (I_r) dargestellt. Durch die Chemisorption und den veränderten Brechungsindex verschiebt sich der Anregungswinkel von θ_{SPP} zu $\theta_{\text{SPP}'}$.

Kinetik-Messungen

Für Kinetik-Messungen wird ein Anregungswinkel θ_{i^*} gewählt, der größer als das Minimum ist (siehe Abb. 3-3). Dieser Winkel wird auf dem Goniometer fest eingestellt und die Intensität des reflektierten Lichts als Funktion der Zeit gemessen. Die Adsorption von einer dünnen dielektrischen Schicht (z.B. eine Peptidschicht) auf der Goldoberfläche verschiebt aufgrund des veränderten Brechungsindex den Anregungswinkel θ_{SPP} zu $\theta_{\text{SPP}'}$ (siehe Abb. 3-3). Dadurch erhöht sich die Intensität des reflektierten Lichts bei θ_{i^*} wodurch der Aufbau einer peptidunterstützten artifiziellen Membran zeitabhängig verfolgt werden kann (Schmidt 1998) (siehe auch Abb. 4-10). In Abb. 3-4 ist die Adsorption einer Peptidschicht mittels einer Kinetik-Messung dargestellt. Bei bekanntem Brechungsindex der Peptidschicht (Schmidt 1998) kann anhand der veränderten Reflektivität ΔR mit Hilfe der Fresnel-Gleichungen (Raether 1988) die Schichtdicke errechnet werden (Knoll 1998).

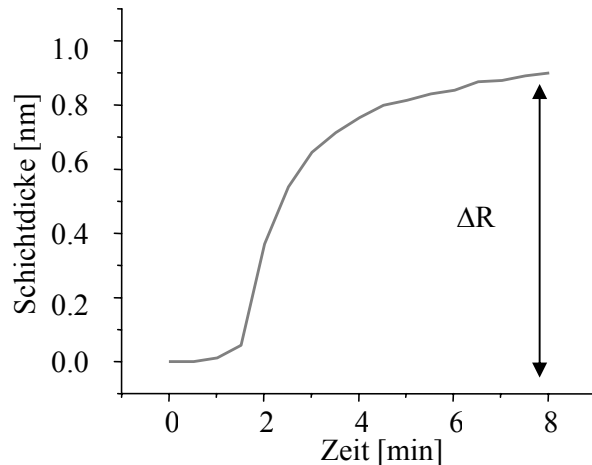


Abb. 3-4: Plasmonenspektroskopische Kinetik-Messung der Adsorption einer Peptidschicht

Verstärkung der Fluoreszenzintensität

Nahe der Metalloberfläche, an der ein Plasmon propagiert, wird aufgrund der Feldverstärkung die Fluoreszenz von Fluorophoren verstärkt (Liebermann 2000), (Ekgasit 2004), (Yu 2003). Dabei hängt die jeweilige Fluoreszenzverstärkung davon ab, in welchem Abstand der Fluorophor sich von der Metalloberfläche befindet. Ist dieser Abstand kleiner als 5 nm, wird die Fluoreszenz durch den Förster-Energie-Transfer gedämpft und es kann keine Fluoreszenzverstärkung gemessen werden (Förster 1948), (Neumann 2002). Bei Abständen größer als etwa 5 nm ist der Förstertransfer vernachlässigbar klein, und es kommt zu Fluoreszenzverstärkung. Da das elektromagnetische Feld aber exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche abfällt, nimmt entsprechend auch die Fluoreszenzverstärkung ab (siehe Abb. 3-5). Die Abklinglänge des Feldes liegt im Bereich von 100 nm.

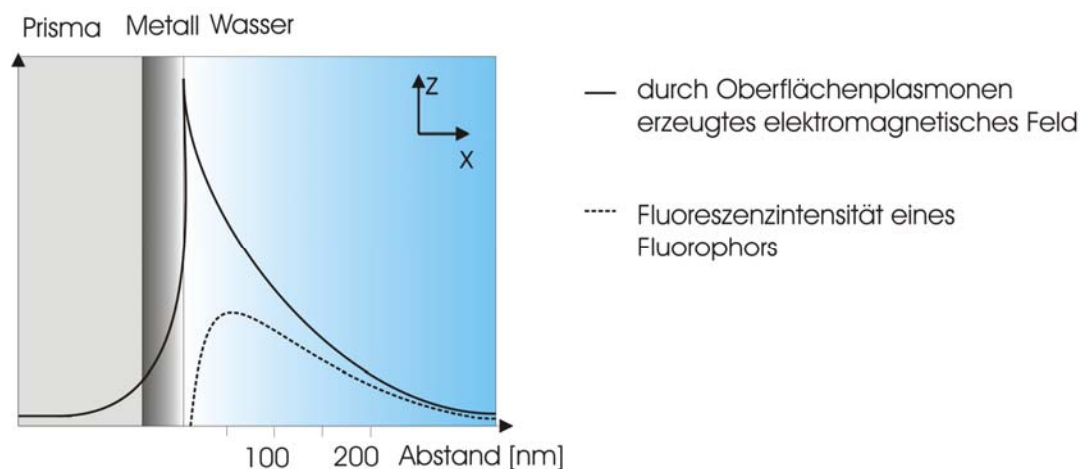


Abb. 3-5: Schematische Darstellung eines elektromagnetischen Feldes, das durch ein Oberflächenplasmon verursacht wird (—), sowie der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors in diesem Feld (---). Die Abbildungen zeigen einen Querschnitt durch das Schichtsystem Prisma/Metall/Wasser (siehe auch (Liebermann 2000)).

3.2 Verwendeter Meßaufbau

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmonspektrometer ist in *Abb. 3-7* schematisch dargestellt. Oberflächenplasmonen werden mit einem Helium-Neon-Laser der Wellenlänge $\lambda = 633 \text{ nm}$ angeregt. Der Laserstrahl durchläuft zwei Glan-Thompson Polarisatoren (Berliner Glas, Berlin). Davon regelt der erste die Intensität des Laserstrahls, während der zweite das Licht polarisiert. Anschließend trifft der Laserstrahl unter dem Winkel θ_i auf das Glasprisma, welches auf einem Zweikreis-Goniometer (Huber Diffraktionstechnik GmbH & Co KG, Rimsting) montiert ist. Über das Goniometer kann der Einfallswinkel θ_i eingestellt werden. Das goldbeschichtete LaSFN9-Glassubstrat wird mittels Immersionsöl ($n = 1.680$) optisch an das Prisma gekoppelt. Der Goldfilm auf dem Glassubstrat sowie ein Objektträger begrenzen die Glasküvette (Glasmanufaktur des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung, Mainz), in der sich die Probenpräparationen befinden (siehe *Abb. 3-6*). Zur Detektion des reflektierten Strahls wird das Licht durch eine Bikonvexlinse der Brennweite $f = 100 \text{ mm}$ auf eine Si-Photodiode fokussiert. Um den Einfluß von Hintergrundlicht zu vermeiden, wird die Intensität des Laserstrahls zunächst mit Hilfe eines Choppers mit einer Frequenz von 1193 Hz moduliert. Das daraus resultierende, modulierte Detektorsignal wird mit einem Lock-In-Verstärker (EG&G, 5210) gemessen und anschließend von einem Computer aufgezeichnet. Die aus der Meßzelle emittierte Fluoreszenz wird von einem Interferenzfilter (LOT 670 nm, 10 nm FWHM) selektiert, mit einem Photomultiplier (Hamamatsu, Perkin Elmer, Wiesbaden) gemessen und gleichzeitig mit dem reflektierten Licht aufgezeichnet.

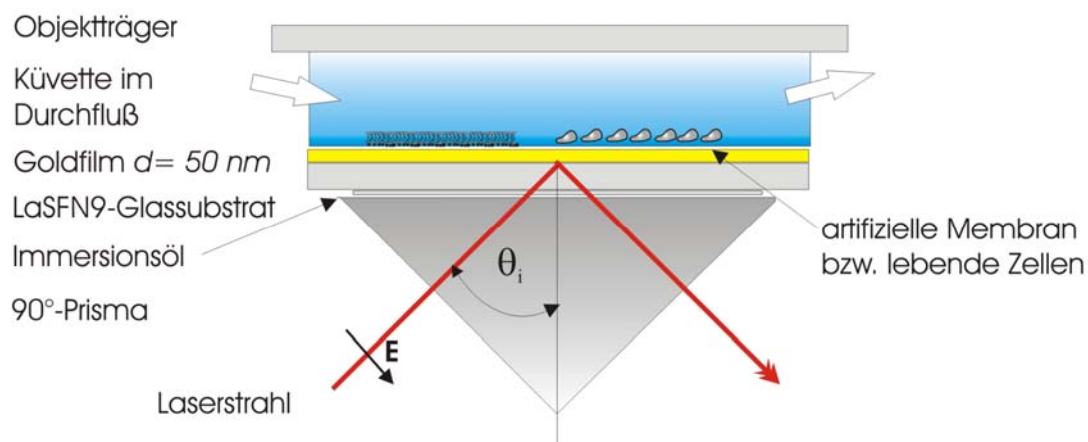


Abb. 3-6: Schematische Anordnung der in dieser Arbeit vermessenen Proben.

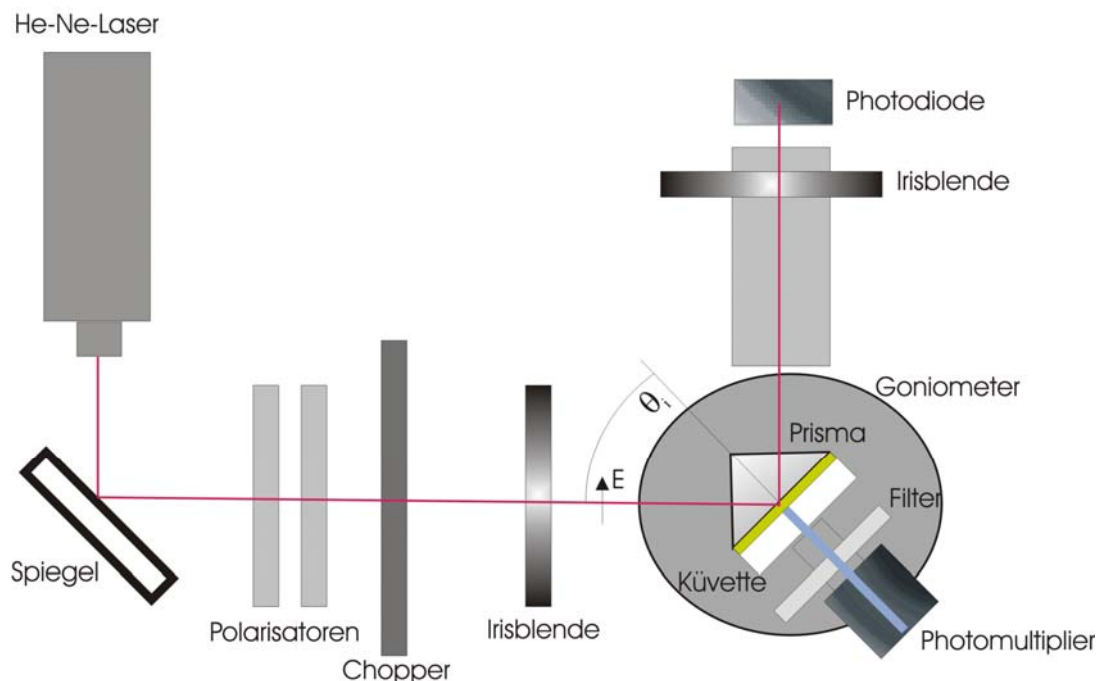


Abb. 3-7: Schema des verwendeten Meßaufbaus nach (Liebermann 2000). Ein Laserstrahl (—) trifft durch zwei Polarisatoren, einen Chopper und das Glasprisma auf den Goldfilm und wird dort reflektiert. Die Intensität des reflektierten Lichts wird von einer Photodiode registriert. Gleichzeitig mißt ein Photomultiplier die aus der Meßküvette emittierte Fluoreszenz (—).

Aufdampfen des Goldfilms

Die LaSFN9-Glassubstrate werden mit Hilfe einer Aufdampfanlage (Pfeiffer Vacuum C250, Wessel) mit 99.99% Gold (Unaxis, München) beschichtet. Das Gold wird hierfür mittels Elektronenbeschuß bei 2.51×10^{-6} mbar verdampft.

Reinigung von optischem Glas

Da die LaSFN9-Glassubstrate relativ teuer sind, werden sie nach den erfolgten Messungen wiederverwendet. Dafür wird die Goldschicht entfernt und das Glassubstrat entsprechend gereinigt (Lawall 1992). Für die Ablösung der Goldschicht wird mit einer 2% [w/v] Jod/ 8% [w/v] Kaliumjodid-Lösung für 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend werden die Glasträger mit Bidest-Wasser gespült. Die Reinigung erfolgt durch vorsichtiges Abreiben der Glasträger in 2% [v/v] Hellmanex-Detergenlösung (Hellma, Müllheim) und Spülen in Bidest-Wasser und *MilliQ*-Wasser. Zum Trocknen wird das Glas mit 100% Ethanol benetzt und der Alkohol mit gefilterter Druckluft evaporiert. Nach diesem Protokoll werden auch das Glasprisma und die Glasküvette gereinigt. Für die Reproduzierbarkeit der Messungen ist die Reinheit der benutzten Glasgeräte von entscheidender Bedeutung, da Unreinheiten zu Artefakten in der Fluoreszenzdetektion führen können.

3.3 Durchgeführte Messungen an artifiziellen Membranen

Die an artifiziellen Membranen durchgeführten Messungen werden mit einem Mindestvolumen von 500 μ l Flüssigkeit in der Meßküvette durchgeführt, da der Kontakt mit

Luft die Membran zerstört (E. Sinner, pers. Mitteilung). Alle Spülvorgänge erfolgen daher im Durchfluß mit Hilfe von zwei Kanülen (Omnifix®, Braun, Melsungen) zu je 1 ml Volumen.

3.3.1 Bindungsstudie

Für eine Bindungsstudie wird zunächst der Fluoreszenzhintergrund der artifiziellen Membran mittels SPFS gemessen. Die nachfolgenden Bindungsmessungen erfolgen mit jeweils 10 nmol des Cy5-gekoppelten Liganden. Die Ligandenbindung an das Integrin erfolgt im Dunkeln während einer Inkubationzeit von 30 min bei RT. Anschließend wird ungebundener und unspezifisch gebundener Ligand durch Spülen mit 15x 1 ml BP entfernt. Danach erfolgt die eigentliche SPFS-Messung.

3.3.2 Ablösen eines Liganden

Die artifiziellen Integrin-funktionalisierten Membranen werden durch das Ablösen der gebundenen Liganden wiederverwendet, um einen besseren Vergleich der Bindungsstudien durchführen zu können. Hierfür wird eine Lösung aus EDTA verwendet, welches die zur Integrinbindung essentiellen Mg^{2+} -Ionen komplexiert (Plow 2000), (Hynes 1992). Der an die Membran gebundene Ligand wird durch 0.5 M EDTA-Lösung (pH 7.2) abgelöst. Die Küvette wird mit 5x 1 ml EDTA-Lösung gespült und 15 min mit EDTA-Lösung inkubiert. Dieser Vorgang wird insgesamt 12x wiederholt. Eine alternative Möglichkeit besteht in der Inkubation der mit 5x 1 ml EDTA-Lösung gespülten Küvette über Nacht. Anschließend wird erneut mit 5x 1 ml EDTA-Lösung gespült. Vor erneuter Liganden-bindung wird das EDTA durch Spülen mit 5x 1 ml BP entfernt.

3.4 Messungen an lebenden Säugetierzellen

3.4.1 Kultivierung von Säugetierzellen auf goldbeschichteten Glassubstraten für die SPFS-Messungen

Für die Kultivierung von BHK- und P19-Zellen auf goldbeschichteten Glassubstraten werden die sterilen Substrate in Petrischalen mit 0.5 µg Fibronectin (Sigma, Deisenhofen), welches in 500 µl Kulturmedium gelöst ist, beschichtet. Die Beschichtung wird unter der Sterilbank bis zur Eintrocknung inkubiert (1 Tag). Anschließend wird ungebundenes Fibronectin durch 3x Waschen mit PBS entfernt. Auf das beschichtete Substrat werden 3×10^5 Zellen in einem Volumen von 300 µl pipettiert. Für diesen Pipettierschritt wird eine sterile, einzeln verpackte 1 ml Spitze (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) verwendet, um höchstmögliche Genauigkeit zu gewährleisten. Die Zellen werden für 1 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, um ein Absetzen auf dem Substrat zu ermöglichen. Dabei wird im Abstand von 15 min überprüft, ob die Zellen noch von Medium bedeckt sind, und gegebenenfalls frisches Medium zugegeben. Nachdem die Zellen auf der Substratoberfläche adhärirt sind, wird auf insgesamt 5 ml Medium aufgefüllt. Die SPFS-Messung erfolgt nach einer weiteren über Nacht-Inkubation bei 37°C, 5% CO₂.

3.4.2 Aufnahme einer Zeitreihe mit mehreren Substraten

Für jeden Zeitpunkt der SPFS-Messung wird ein Glassubstrat mit Zellen aus einer identischen Kultur besetzt. Nach Inkubation über Nacht werden nicht angewachsene Zellen abgespült. Die adhärennten Zellen werden wie bereits in *Kapitel 2.5.3.3* beschrieben mit 37°C warmem, aktiviertem Virusstock infiziert.

Für die SPFS-Messung wird das Glassubstrat mit Prisma und Küvette in die Meßzelle eingebaut. Dabei wird die Glasseite des Substrats mit einem fusselreien Einmalpapiertuch von Medium befreit. Sofort wird 500 µl handwarmes Medium zugegeben, um die Zellen am Leben zu erhalten. An mindestens 3 verschiedenen Stellen des Substrats wird die Hintergrundfluoreszenz gemessen. Anschließend wird das Medium in der Meßzelle durch frisches Medium ausgetauscht, welches die für 30 min bei RT vorinkubierten Antikörper anti-VSV und anti-Maus-Alexa-488 in der jeweiligen Endkonzentration 1:100 enthält. Die Bindung der beiden Antikörper erfolgt für 30 min bei RT. Ungebundener Antikörper wird durch Spülen mit 5 ml 37°C warmen Medium entfernt. Die SPFS-Messungen erfolgen an mindestens 10 verschiedenen Stellen des Substrats.

3.4.3 Aufnahme einer Zeitreihe auf einem einzelnen Substrat

Die Messung einer Zeitreihe auf einem einzelnen Glassubstrat erfolgt wie in *Kapitel 3.4.2* beschrieben, allerdings wird hier die zugefügte Lösung mit den vorinkubierten Antikörpern nicht abgespült. Nach der Inkubation für 30 min wird daher die Gesamtfluoreszenz des ersten Zeitpunkts vermessen. Bis zum nächsten Meßzeitpunkt wird die gesamte Meßzelle bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Vor jeder neuen SPFS-Messung wird jeweils das Antikörper enthaltende Medium mit einer Pipette durchmischt.

4 Nachweis der photoschaltbaren Bindung von RGD-Peptidisomeren an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$

Die Zelladhäsion ist für die Aufrechterhaltung von Geweben ebenso wie für viele physiologische Prozesse wie die Wundheilung, die Differenzierung von Zellen oder für die Immunantwort essentiell (Gumbiner 1996), (Manes 2000), (Bokel 2002), (Springer 2004). In diesen Prozessen ändert eine Zelle ihr Adhäsionsverhalten als eine Antwort auf die Veränderungen, die in ihrer Umgebung stattfinden. Diese von der Zelle selbst regulierte Änderung der Adhäsion findet über die Variation der Affinität ihrer Integrinrezeptoren zu den Proteinen der extrazellulären Matrix statt (Humphries 2003), (Holly 2000). Dabei binden die meisten Integrinrezeptoren an die Tripeptidsequenz RGD (Pierschbacher 1984), (Ruoslahti 1987). Die Veröffentlichung einer Struktur von Integrin $\alpha_v\beta_3$ im Komplex mit einem zyklischen RGD-Peptid (Xiong 2002) liefert erste Erkenntnisse der Interaktion dieses Rezeptors mit seinem Liganden. Eine weiterführende Fragestellung ist das Erreichen der Spezifität und der hohen Affinität in der Erkennung der Integrinliganden (Takagi 2004). Die Primärsequenz RGD ist dafür nicht ausreichend (Aumailley 1991), sondern auch konformelle Eigenschaften wie die räumliche Anordnung der Aminosäurereste sind für die Affinität entscheidend (Müller 1993), (Haubner 1997), (Gottschalk 2002). Um die Selektivität der Bindung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ an RGD-Liganden eindeutig bestimmen zu können, wird in dieser Arbeit die Affinität von nativen $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren an synthetische photoschaltbare Peptide mit identischer Aminosäuresequenz, aber unterschiedlicher Konformation nachgewiesen (Schütt 2003). Weiterhin wird eine erhöhte Affinität durch die Positionsänderung einer Aminosäure in der Peptidsequenz gemessen (Milbradt 2005). Die Bindungsmessungen erfolgen mittels einer peptidunterstützten artifiziellen Membran (Schmidt 1998), welche die biologische Aktivität des Integrins aufrechterhält, und der hochsensitiven Methode der Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS, siehe *Kapitel 3*).

Die vorliegende Arbeit leistet durch die Bindungsanalyse photoisomerisierbarer RGD-Peptide einen wichtigen Beitrag, den Einfluß der Konformation des Bindungsmotivs in RGD-enthaltenden Liganden auf die Selektivität der Bindung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ besser verstehen zu können.

4.1 Charakterisierung der Peptidliganden

Für die Messungen von photoschaltbaren Bindungen an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$ werden eigens hierfür synthetisierte zyklische RGD-Peptide benutzt (Schütt 2003), die im Folgenden Peptid 1 und Peptid 2 genannt werden (siehe *Abb. 4-1*). Eine Bestrahlung mit Licht der Wellenlängen $\lambda = 360$ nm bzw. $\lambda = 450$ nm induziert in den Peptiden 1 und 2 einen Übergang von der *cis*-Konformation in die *trans*-Konformation. Diese lichtinduzierte Isomerisierung (Photomodulation) wird durch den in den Liganden enthaltenen Azobenzolrest vermittelt, dessen Photomodulation mit signifikanten Veränderungen in der Geometrie und der Polarität einhergeht (Rau 1990). Die Ringspannung im zyklischen Peptid bewirkt, daß eine Konformationsänderung des Azobenzolrests zu einer Konformationsänderung des gesamten Peptids führt. Die photoschaltbaren Liganden wurden von M. Löweneck, Abteilung Bioorganische Chemie, synthetisiert (Schütt 2003), (Milbradt 2005).

Das Peptid 1 besteht aus einer zyklischen Sequenz der Aminosäuren Lysin (K), Alanin (A), Arginin (R), Glycin (G), Aspartat (D), D-Phenylalanin (F), Valin (V) und des als 4-Aminomethyl-Phenylazobenzoe-Säure vorliegenden Azobenzens (AMPB) (siehe *Abb. 4-1*). Dabei liegt das Phenylalanin aufgrund der sterischen Erfordernisse der Ringbildung in der D-Konfiguration vor. Der Unterschied zwischen Peptid 1 und Peptid 2 besteht ausschließlich in der Position des Lysins, wodurch sich jeweils eine unterschiedliche Position des RGD-Bindungsmotivs relativ zur AMPB-Gruppe ergibt (siehe *Abb. 4-1*).

Die RGD-Sequenz stellt das Bindungsmotiv von Integrin $\alpha_v\beta_3$ an extrazelluläre Matrixproteine wie Vitronektin dar (Hynes 1992). Durch Messungen mit SPFS wird im Folgenden erstmals gezeigt, daß zyklische RGD-Peptide, die eine AMPB-Gruppe enthalten, an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden können (Schütt 2003). Diese Bindungsaffinität ist dabei stark von der räumlichen Orientierung abhängig, in der das RGD-Motiv präsentiert wird (Milbradt 2005).

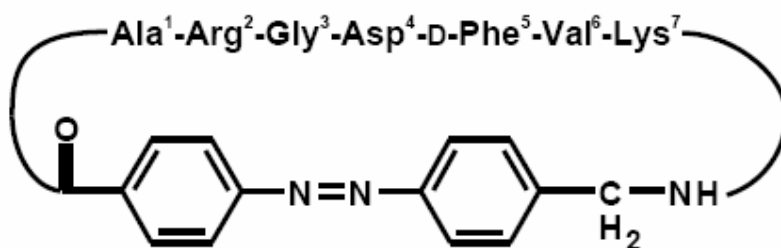
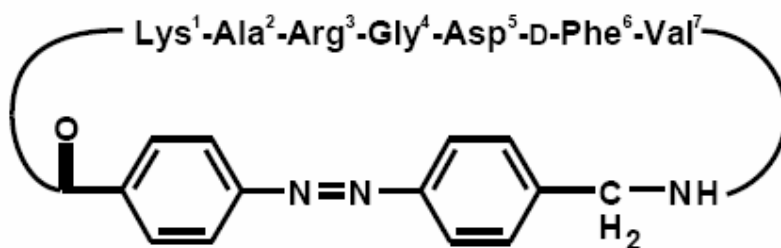


Abb. 4-1: Struktur der photoschaltbaren Peptidliganden 1 und 2. Die beiden Liganden unterscheiden sich in der Position des Azobenzens relativ zum RGD-Bindungsmotiv (Strukturen von M. Löweneck).

4.1.1 Photoisomerisierung der Peptidliganden

Die beiden Isomere von Peptid 1 sind in Abb. 4-2 als Stabmodelle dargestellt. Diese Stabmodelle entsprechen den Überlagerungen des Peptidrückgrats von jeweils zehn Strukturen der niedrigsten Energiestufe. Dabei induziert die Umschaltung des Azobenzens in seine Isomere *cis* bzw. *trans* eine jeweils stark veränderte Orientierung des RGD-Motivs. Die Photoisomerisierung in das *cis*-Isomer relaxiert das Peptid, so daß es ein größeres Volumen einnimmt. Auch die Faltung des Peptidrückgrats unterscheidet sich signifikant in beiden Strukturen: Im *trans*-Isomer liegt das Peptidrückgrad in gestreckterer Form als im *cis*-Isomer vor. Aus diesen Unterschieden resultiert auch eine jeweils unterschiedliche räumliche Präsentation der RGD-Seitenketten (siehe Abb. 4-2).

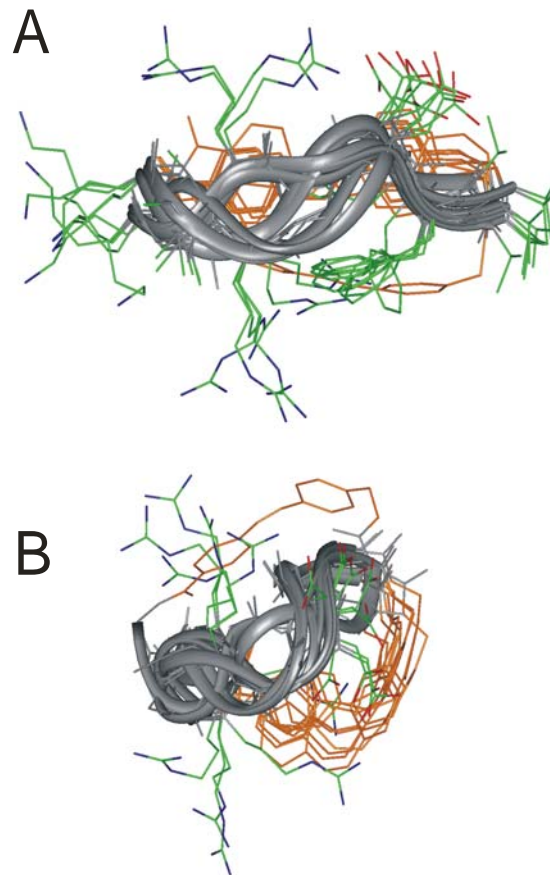


Abb. 4-2: Stabmodelle von Peptid 1 in *trans* (A) und *cis* (B) Konformation. Die Modelle stellen Überlagerungen des Peptidrückgrats (grau) aus den zehn Strukturen von Peptid 1 dar, welche der niedrigsten Energiestufe entsprechen. Der AMPB-Chromophor ist orange dargestellt. (Bilder von A. Milbradt).

Da die *trans*-Konformation beider Peptide dem energetisch günstigeren Zustand entspricht, kann aufgrund von Rückreaktionen in das *trans*-Isomer kein reines *cis*-Isomer erzeugt werden (C. Renner, Abteilung Bioorganische Chemie, pers. Mitteilung).

Nach Belichtung von 20 min oder länger kann eine maximale Rate von 80:20 des photostationären Zustands erreicht werden, wie jeweils durch $^1\text{H-NMR}$ -Messungen ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). Hier existiert ein photodynamisches Gleichgewicht, bei dem sich bevorzugt jenes Isomer bildet, das bei der eingestrahnten Wellenlänge weniger absorbiert. Bei einer Belichtung mit $\lambda = 450 \text{ nm}$ bilden sich daher 80% *trans*-Isomere und 20% *cis*-Isomere. Eine Belichtung mit $\lambda = 360 \text{ nm}$ führt zu umgekehrten Verhältnissen. Ein Verhältnis von 98% *trans*-Isomer kann durch eine thermische Relaxation erreicht werden. Die mit $^1\text{H-NMR}$ -Messungen ermittelten Raten von der thermischen Relaxation in das *trans*-Isomer von Peptid 1 sind in *Tabelle 4-1* dargestellt. Die Aktivierungsenergie hierfür beträgt 83 kJmol^{-1} (Milbradt 2005).

Temperatur	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
Peptid 1 <i>trans</i> -Isomer [%/h]	0.06	0.22	0.40	1.7	5.1

Tabelle 4-1: Thermische Isomerisierung $k_{ct}[h^{-1}]$ (Milbradt 2005)

Die *cis/trans* Photoisomerisierung der Peptide 1 und 2 bei der Belichtung mit den jeweiligen Wellenlängen $\lambda = 360$ nm und $\lambda = 450$ nm ist ein reversibler Prozeß. Das UV-Vis-Spektrum enthält zwei isosbestische Punkte P1 und P2 bei $\lambda = 288$ nm bzw. $\lambda = 395$ nm, an denen beide Isomere eine identische Extinktion aufweisen (siehe *Abb. 4-3*). Die UV-Vis-Spektren von Peptid 1-*cis* und Peptid 2-*cis* unterscheiden sich nicht (Daten nicht gezeigt). Ebenso ist kein Unterschied der Spektren von Peptid 1-*trans* und Peptid 2-*trans* feststellbar (Daten nicht gezeigt), da in den beiden Proben der Chromophor AMPB, die enthaltenen Aminosäuren und das Lösungsmittel identisch sind. Daher zeigt *Abb. 4-3* nur die Absorptionskurven von Peptid 1. Zur Verdeutlichung der Photoisomerisierung wird eine Probe aus 98% *trans*-Isomer mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 360$ nm für jeweils 1 s, 5 s, 10 s und 20 min bestrahlt. Die jeweils nach der Belichtung aufgenommenen UV-Vis-Spektren nehmen mit zunehmender Belichtungsdauer die Charakteristika des Spektrums des *cis*-Isomers an. Wie *Abb. 4-3* entnommen werden kann, wird bereits nach einer Belichtungsdauer von 10 s ein photostationärer Zustand erreicht. Eine Belichtungsdauer von 20 min ändert das UV-Vis-Spektrum nur noch geringfügig. Um die maximale Rate von 80% des gewünschten Isomers zu erhalten, wird im Folgenden jeweils für 20 min belichtet.

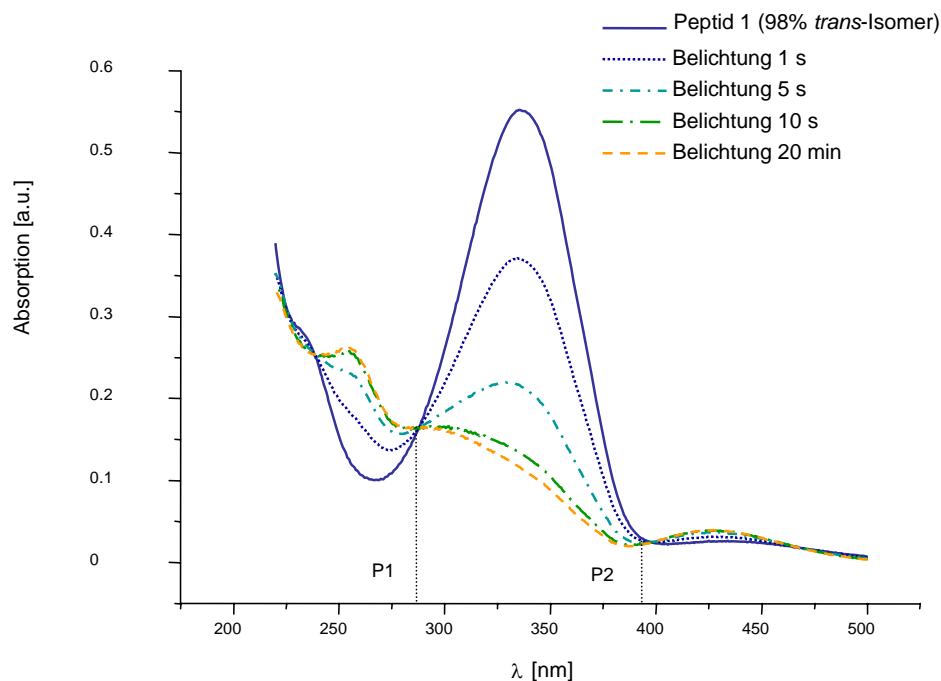


Abb. 4-3: UV-Vis-Spektren von photoisomerisiertem Peptid 1, die jeweils nach Belichtung einer Probe aus 98% *trans*-Isomer mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 360$ nm für 1 s, 5 s, 10 s bzw. 20 min aufgenommen wurden.

4.1.2 Vergleich der Photoisomerisierung von Peptid 1 und Fluorophormarkiertem Peptid 1

Die Detektion der Bindung der beiden Liganden erfolgt über ihre Markierung mit dem Fluorophor Cy5. In Abb. 4-4 sind die Molekülstrukturen der Peptide 1 und 2 mit jeweils an die Lysinseitenkette angekoppeltem Cy5-NHS-Ester dargestellt. Weiterhin ist die Linkersequenz des Cy5-NHS-Esters zu erkennen, welche möglicherweise eine sterische Behinderung der RGD-Bindungssequenz durch den Chromophor erschweren könnte. Ein eventueller Einfluß des angekoppelten Cy5 Fluorophors auf die Bindungsaffinität der Peptide kann zwar nicht ausgeschlossen werden, würde sich aber auf alle untersuchten Peptide in gleicher Art und Weise auswirken. Die in dieser Arbeit analysierten relativen Affinitätsunterschiede in der Integrinbindung der jeweiligen Isomere blieben bestehen.

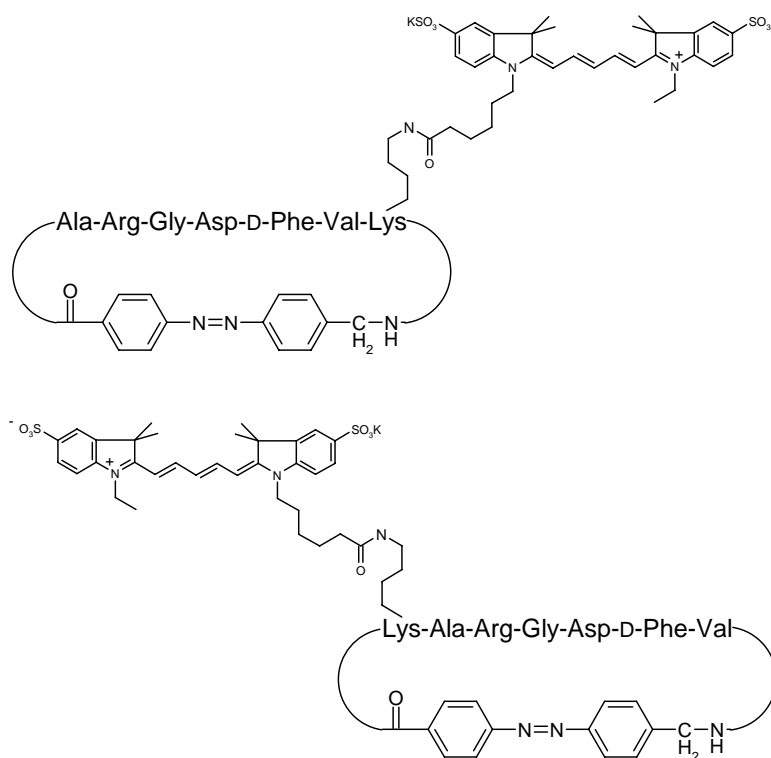


Abb. 4-4: Molekülstrukturen der mit Cy5-NHS-Ester fluoreszenzmarkierten Peptide 1 (oben) und 2 (unten).

Um die Photoisomerisierbarkeit dieses Peptid-Fluorophor-Präparats Peptid1-Cy5 zu untersuchen, werden UV-Vis-Spektren nach der Belichtung der jeweiligen *trans*-Isomere bei $\lambda = 360$ nm für jeweils 20 min aufgenommen (siehe Abb. 4-5). Als Vergleich dient die

identische Stoffmenge an Peptid 1. Die Photoisomerisierung von Peptid 1 wurde bereits in *Abb. 4-3* beschrieben. In *Abb. 4-5* sind die UV-Vis-Spektren von 98% *trans*-Isomer und 80% *cis*-Isomer des Peptids 1 dargestellt. Hieraus resultiert, daß das Peptid 1 mit einer 70.5%igen Differenz des lokalen Maximums zwischen seinen *cis*-und *trans*-Isomeren geschaltet werden kann.

An den UV-Vis-Spektren von Peptid 1-Cy5 hingegen kann kein isosbestischer Punkt so eindeutig festgelegt werden, wie es bei den UV-Vis-Spektren von Peptid 1 der Fall ist. Der Anstieg der Absorptionskurve nach $\lambda = 500$ nm ist auf den Fluorophor Cy5 zurückzuführen. Das Spektrum des *trans*-Isomers von Peptid1-Cy5 zeigt insgesamt nur etwa 80% der Absorption von Peptid 1. Die beiden lokalen Absorptionsmaxima von Peptid1-Cy5 unterscheiden sich nur zu etwa 13.5%. Daher zeigen die gemessenen UV-Vis-Spektren, daß die lichtinduzierte Konformationsänderung von Peptid1-Cy5 im Vergleich zu der von ungekoppeltem Peptid 1 nur zu etwa 20% möglich ist.

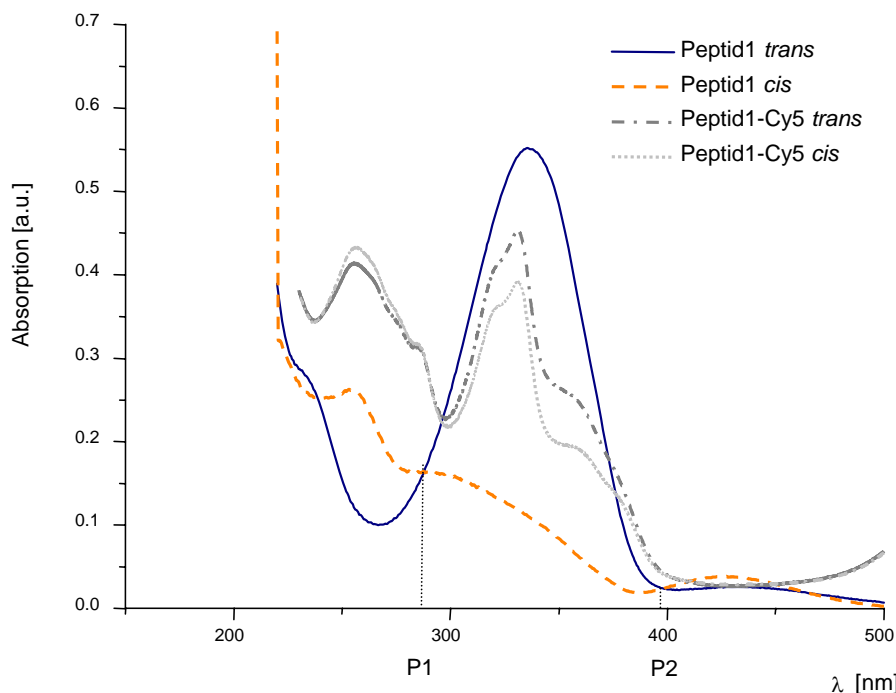


Abb. 4-5: Vergleich der UV-Vis Spektren von Peptid 1 und Peptid 1-Cy5 nach jeweils 20 min Belichtungszeit.

Die Photoisomerisierung wird durch das Cy5-Molekül behindert, welches auch im Bereich der verwendeten Wellenlängen $\lambda = 360$ nm und $\lambda = 450$ nm geringfügige Absorptionen aufweist (Daten nicht gezeigt). Besonders die ungekoppelten, abgesättigten Cy5-Moleküle können durch ihre Absorption die Photoisomerisierung stören (C. Renner, pers. Mitteilung). Diese Cy5-Moleküle stammen aus der Herstellung des Cy5-Peptid-Präparats (siehe *Kapitel 2.6.3*). Da an den verwendeten Integrin-funktionalisierten artifiziellen Membranen keine

unspezifische Bindung dieser Cy5-Moleküle stattfindet (Sinner 2004), wurden die abgesättigten Cy5-Moleküle nicht aus der Präparation entfernt. Auf diese Weise wird die Ausbeute an Cy5-gekoppeltem Peptid nicht verringert.

Um eine eventuelle Korrelation der Spektren von Cy5 und Cy5-gekoppeltem Peptid zu untersuchen, wird das Spektrum von Cy5 von dem Cy5-Peptid 1-Spektrum unter Berücksichtigung der jeweiligen Molmengen mathematisch subtrahiert. Das resultierende Differenzspektrum zeigt jedoch keine Ähnlichkeit mit dem Spektrum des ungekoppelten Peptids (Daten nicht gezeigt). In den Bindungsstudien dieser Arbeit wird aufgrund der in *Abb. 4-5* gezeigten Behinderung durch den Cy5-Fluorophor die Photomodulierung der Peptidliganden jeweils vor ihrer Farbmarkierung vorgenommen.

4.2 Aufbau von peptidunterstützten Integrin-funktionalisierten artifiziellen Membranen

Die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Bindungsstudien der photoschaltbaren Peptide 1 und 2 an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$ finden an einer peptidunterstützten artifiziellen Membran statt, welche die natürliche Umgebung des Integrinrezeptors imitiert (siehe *Abb. 4-6*), (Knoll 2000), (Sinner 2003), (Sinner 2004). Auf diese Weise bleiben die native Konformation des Integrins und seine laterale Beweglichkeit erhalten. Nur so kann das physiologische Bindungsverhalten von Integrinrezeptoren genau charakterisiert werden. Die unterstützende Peptidschicht ermöglicht den Einbau der peripheren cytosolischen Domänen des Integrins in die artifizielle Membran, da diese zusätzliche Schicht einen wässrigen Zwischenraum zwischen Gold und Lipiddoppelschicht erzeugt.

Der Membranaufbau kann durch eine Kinetikmessung mittels Plasmonenspektroskopie (beschrieben in *Kapitel 3*) überprüft werden. Diese Überprüfung ist von großer Bedeutung für die Reproduzierbarkeit der Bindungsmessungen, welche entscheidend von der Qualität der artifiziellen Membran abhängen.

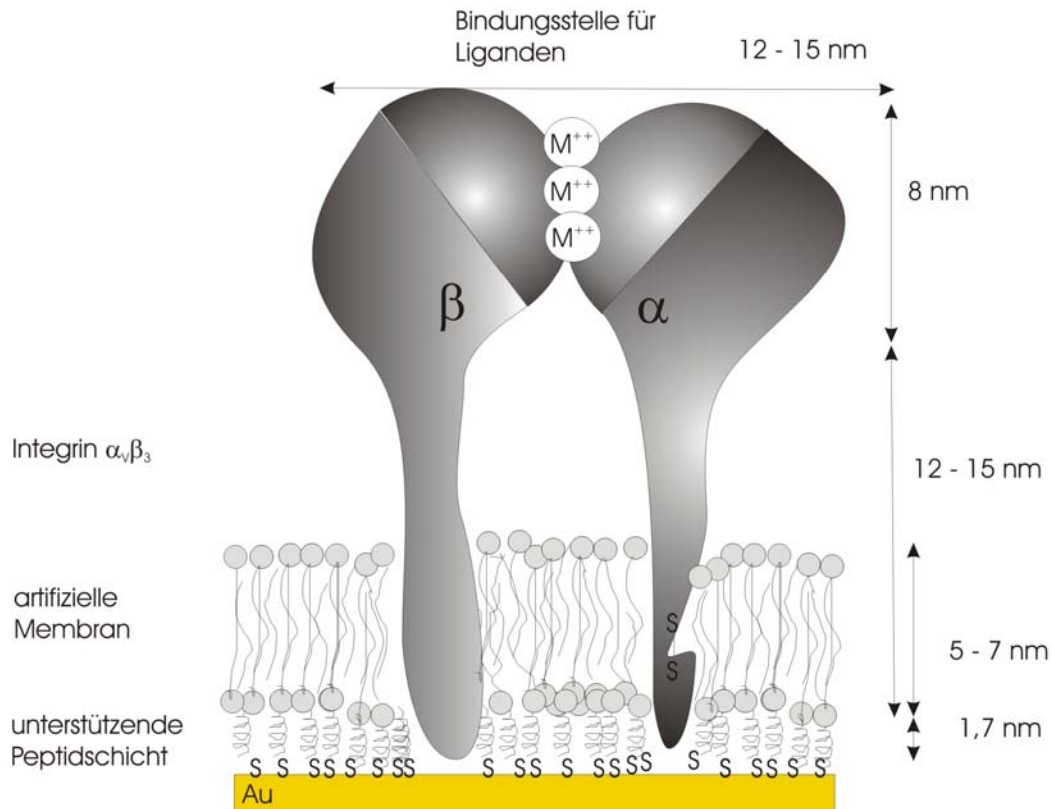


Abb. 4-6: Schematisches Modell einer künstlichen peptidunterstützten Membran mit dem integrierten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor. Die Metallion-abhängige Bindungsstelle (MIDAS) des Integrins ist hervor-gehoben.

Aufbau der unterstützenden Peptidschicht

Die unterstützende Peptidmonoschicht besteht aus dem 19mer-Peptid der α -Laminin-Untereinheit (Lamininpeptid). Durch die Chemisorption der freien Thiolgruppe des Lamininpeptids an die Goldoberfläche (siehe Abb. 4-7) wird eine homogene Monoschicht gebildet. Ungebundenes Lamininpeptid wird mit Wasser abgespült.

In den hier vermessenen Lamininpeptid-Schichten wird eine durchschnittliche Dicke von 1 nm gemessen. In dem exemplarisch gezeigten Membranaufbau in Abb. 4-10 beträgt diese Schichtdicke etwa 0,8 nm. Aus dem Unterschied zur theoretisch berechneten Schichtdicke 2,8 nm (Sinner 2004) resultiert daher, daß das chemisorbierte Lamininpeptid die Goldoberfläche in einer locker gepackten Schicht bedeckt. Diese lockere Packung ermöglicht den zusätzlichen Einbau der cytosolischen Domäne des Integrins (siehe auch Abb. 4-6).



Abb. 4-7: **Chemisorption des Lamininpeptids an die Goldoberfläche. Die Abbildung zeigt nicht das gesamte Lamininpeptid.**

Ankopplung der Lipidmoleküle

Eine Zugabe von Lipidvesikeln auf eine reine Peptidschicht führt nicht zum Aufbau einer artifiziellen Membran, sondern nur zu einer Absorption der Vesikel. Daher wird zunächst eine Lipidschicht aus Dimyristoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin (DMPE) chemisch an die thiosorbierte Peptidschicht gekoppelt, um als Ansatzpunkt für die Spreitung der Vesikel (siehe auch *Abb. 4-9*) zu fungieren. Für die kovalente Ankopplung von DMPE wird die terminale Carboxygruppe des Lamininpeptids durch die Zugabe von EDC (*N*-Ethyl-*N*-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid) und NHS (*N*-Hydroxy-Succinimid) chemisch aktiviert (siehe *Abb. 4-8*). Diese Kopplungsprozedur erhöht den Schichtaufbau in *Abb. 4-10* um 2.5 nm. Dieser Wert stimmt mit dem theoretisch berechneten Wert aus (Sinner 2004) überein.

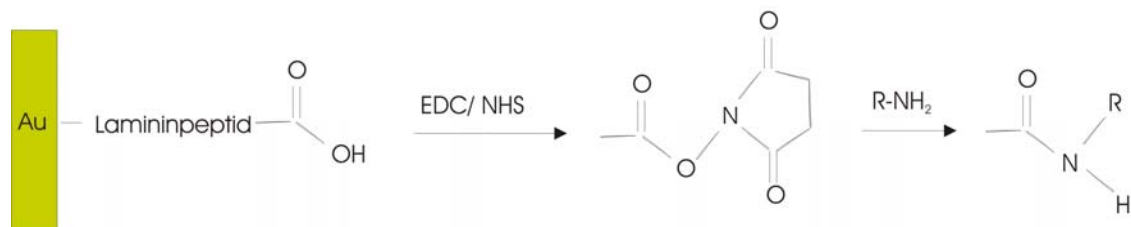


Abb. 4-8: **Ankopplung von DMPE an die aktivierte Carboxygruppe des Thiopeptids. EDC und NHS wandeln die Carboxygruppe zu einem *N*-Hydroxysuccinimid-Ester um. Dieser Ester reagiert mit der Aminogruppe des DMPE unter Bildung einer kovalenten Amidbindung.**

Inkorporation des Integrins in die artifizielle Membran

Die Integrinmoleküle werden über das Ausrollen von Integrin-haltigen Lipidvesikeln (Vesikelspreitung, siehe *Abb. 4-9*) auf die DMPE-Schicht in die artifizielle Membran gebracht. Hierfür werden zunächst die Lipidvesikel mit dem inkorporierten Integrin $\alpha_v\beta_3$ erzeugt. Diese entstehen, indem eine Emulsion aus Phosphatidylcholin, Bindungspuffer und Integrin $\alpha_v\beta_3$, welches in Octylglucosid gelöst ist, durch einen Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 100 nm gepresst wird. Für diesen Vorgang wird ein sogenannter Vesikel-Extruder benutzt. Die Anwendung dieses Extruders erzeugt eine homogene

Größenverteilung der unilamellaren Vesikel, während gleichzeitig die inkorporierten Integrinmoleküle intakt bleiben.

Vesikelspreitung

Die unilamellaren Vesikel werden unmittelbar nach dem Extrusionsprozeß auf die Thiopeptid-Lipid-Schicht gegeben, um die Fusion der Vesikel in der flüssigen Phase zu verhindern. Durch die Interaktion der Vesikel mit den hydrophoben Acylresten der DMPE-Schicht organisiert sich bei Raumtemperatur spontan eine Lipiddoppelschicht (siehe *Abb. 4-10*). Nach etwa 2 h kann keine Schichtzunahme durch Vesikelspreitung mehr beobachtet werden (siehe *Abb. 4-10*). Ein Spülen mit Bindungspuffer bewirkt nach der Vesikelspreitung keine Veränderung der Schichtdicke, was auf ein stabiles Modellmembransystem hinweist.

Das Erreichen dieses Gleichgewichtszustandes deutet darauf hin, daß die Vesikel nicht unspezifisch an die Oberfläche adsorbieren, sondern eine Lipiddoppelschicht bilden. Bei der Spreitung von Integrin-haltigen Vesikeln wird eine durchschnittliche Erhöhung der Schicht um etwa 5 nm gemessen. Die exemplarisch gezeigte Vesikelspreitung in *Abb. 4-10* führt zu einer Erhöhung der Schichtdicke um etwa 4.5 nm. Eine unspezifische Adsorption von ungespreiteten Vesikeln würde dagegen in einer größeren Schichtdicke als bei gespreiteten Vesikeln resultieren (Sinner 2004), da sich unspezifisch adsorbierte Vesikel mit ihrer gesamten Masse an die Thiopeptid-Lipid-Schicht anlagern anstatt auf ihr zu spreiten.

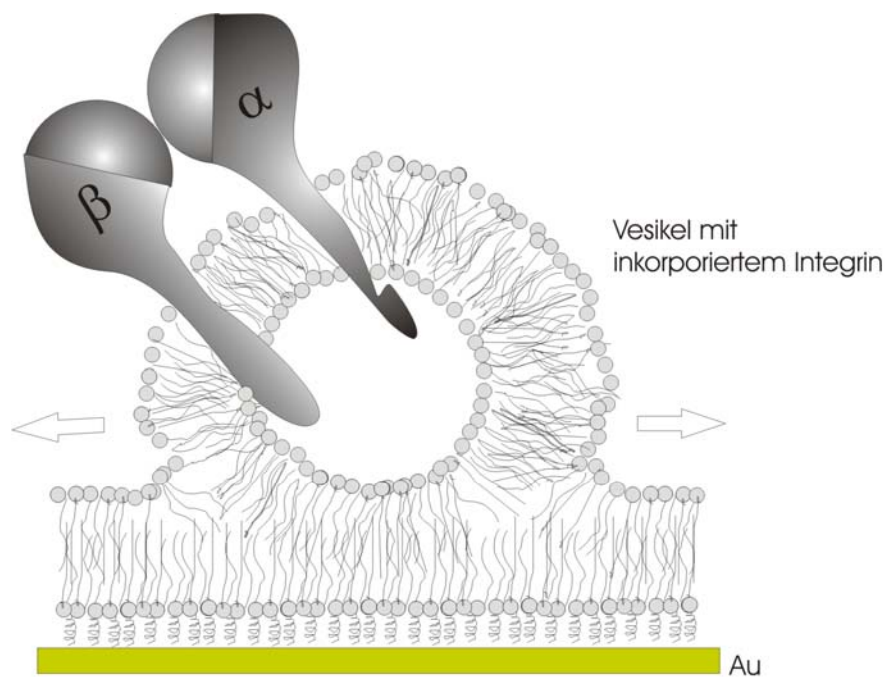


Abb. 4-9: Schematische Darstellung der Vesikelspreitung. Die Lipidmoleküle der Vesikel lagern sich durch hydrophobe Interaktion spontan an die Acylreste der DMPE-Schicht.

Die zeitliche Abfolge eines Membranaufbaus ist exemplarisch in einer plasmonenspektroskopischen Kinetikmessung in *Abb. 4-10* dokumentiert. Bei einem fixierten Anregungswinkel wird die Intensität des reflektierten Lichts über eine Beobachtungszeit von einigen Minuten bis Stunden aufgezeichnet. Die Änderung des Brechungsindex durch die Adsorption an der Goldoberfläche verschiebt den sogenannten Resonanzwinkel, wie der Winkel, in dem Oberflächenplasmonen angeregt werden können, bezeichnet wird. Dadurch wird eine höhere Reflektivität gemessen (siehe *Kapitel 3*). Mit Hilfe der Fresnel-Gleichungen (Raether 1988) kann aus der Reflektivität und dem Brechungsindex die jeweilige physikalische Schichtdicke errechnet werden (Knoll 1998), (Schmidt 1998).

In dem in *Abb. 4-10* dargestellten Membranaufbau wird zum Zeitpunkt Null das in Wasser gelöste Thiopeptid zugegeben. Der unmittelbare Anstieg der Reflektivität nach der Zugabe des Thiopeptids beruht auf der Chemisorption der freien Thiolgruppe des Peptids. Nach etwa 20 min ist der Sättigungsgrad erreicht, und nicht adsorbiertes Peptid wird mit Wasser abgespült. Durch die nun zugegebene EDC/NHS-Lösung erhöht sich die Reflektivität aufgrund des veränderten Brechungsindex. In der folgenden Inkubationszeit wird durch EDC/NHS die endständige Carboxygruppe des adsorbierten Lamininpeptids chemisch aktiviert. Der Brechungsindex und die Reflektivität ändern sich während dieser Zeit nicht. Die Zugabe und Ankopplung von DMPE-Molekülen bewirkt ein Absinken der gemessenen Reflektivität durch den im Vergleich zu EDC/NHS niedrigeren Brechungsindex von DMPE. Nicht angekoppelte DMPE-Moleküle werden nach 30 min Inkubationszeit mit Bindungspuffer abgespült, was am erneuten Abfall der gemessenen Reflektivität deutlich wird. Um eine möglichst homogene Lipidschicht zu erhalten, ist das Entfernen von ungekoppelten DMPE-Molekülen von einer großen Bedeutung. So kann deren zusätzliche Auflagerung auf die Lipidschicht vermieden werden. Für die Vermeidung von Defekten durch Unebenheiten in der peptidunterstützte Modellmembran wird eine möglichst homogene Peptid-DMPE-Schicht benötigt, da sich die Lipidmoleküle der gespreiteten Vesikel an den hydrophoben Alkylketten der Peptid-DMPE-Schicht organisieren.

Diese Vesikelspreitung (siehe auch *Abb. 4-9*) wird als ein sofortiger Anstieg der Schichtdicke direkt nach der Zugabe der Integrin-haltigen Lipidvesikel gemessen. Dieser Anstieg der Kurve verdeutlicht, daß eine bei Raumtemperatur schnell ablaufende Vesikelspreitung im Gegensatz zu einer langsameren, unspezifischen Adsorption vorliegt. Für die exemplarisch gezeigte Membran in *Abb. 4-10* kann eine Dicke von insgesamt etwa 8 nm errechnet werden.

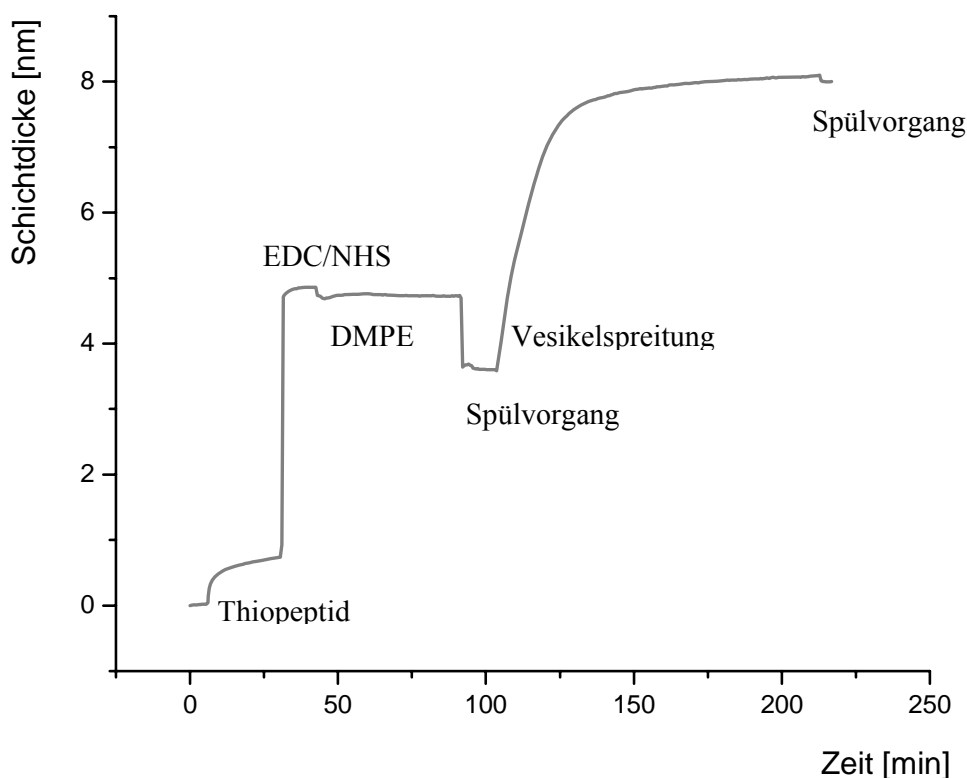


Abb. 4-10: Plasmonenspektroskopische Kinetikmessung des Aufbaus einer artifiziellen Membran mit inkorporiertem Integrin $\alpha_V\beta_3$. DMPE = Dimyristoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin, EDC = N-Ethyl-N-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid, NHS = N-Hydroxy-Succinimid.

Die aus Abb. 4-10 resultierende Dicke der Integrin-funktionalisierten Membran ist kleiner als die in Abb. 4-6 dargestellte theoretische Länge von Integrinmolekülen. Hierbei handelt es sich um keine lokale Schichtdicke, sondern um eine gemittelte Schichtdicke durch die Verteilung der Integrinmoleküle in der artifiziellen Membran innerhalb eines Meßbereichs von ungefähr 1 mm^2 .

Ausgehend von einem Verhältnis der Integrinmoleküle zu den Phosphatidylcholin-Molekülen in einem Vesikel von etwa $\frac{1}{1000}$ wird eine Anzahl von ungefähr 10^3 Integrinmolekülen pro

Vesikel berechnet. Die Proteinkonzentration der eingesetzten Vesikel liefert einen ersten Hinweis auf die Flächenbelegung der planaren Membran mit Integrinmolekülen. Bei einer vollständigen Spreitung der Vesikel kann daher eine Anzahl von ungefähr 3.2×10^4 Integrinmolekülen pro mm^2 angenommen werden. Diese Berechnung bleibt eine Annahme, da eine Proteinkonzentration in den eingesetzten Vesikeln keinen Einfluß auf die Proteinkonzentration der planaren Membran besitzt (Schmidt 1998), was möglicherweise aus den sterischen Behinderungen der Proteinmoleküle untereinander resultiert. Es ist bekannt, daß sich die Interaktionen zwischen den Transmembranhelices der inkorporierten

Membranproteine in unterstützten artifiziellen Membransystemen ähnlich wie in Liposomen verhalten (Li 2004). In Polymer-unterstützten Lipiddoppelschichten bilden die verankerten hydrophoben Lipopolymere unbewegliche Hindernisse innerhalb der flüssigen Phospholipidmatrix. Von der Konzentration der Lipopolymere hängt daher auch die Fluidität der Phospholipide ab (Naumann 2002). Der Diffusionskoeffizient eines inkorporierten Membranproteins hängt ebenso von der molaren Konzentration der verankerten Lipide ab (Deverall 2004). Aufgrund der hohen Unsicherheit in der strukturellen Charakterisierung von Lipidmembranen (Nagle 2000) ist es schwierig, unterstützte Lipiddoppelschichten unterschiedlicher Zusammensetzung miteinander zu vergleichen. Da innerhalb des verwendeten Membransystems kein Diffusionskoeffizient der inkorporierten Integrinmoleküle bekannt ist, kann zu den möglichen lateralen Diffusions- und Aggregationsprozessen der Integrinmoleküle keine Aussage getroffen werden.

Eine Bindungsmessung an der Integrin-funktionalisierten Membran ist hauptsächlich davon abhängig, wie viele funktionelle Integrinmoleküle sich auf der vermessenen Position befinden. Da eine mögliche Diffusion oder Aggregation der Integrinmoleküle sowie deren Verteilung nicht kontrolliert werden kann, besteht die Möglichkeit, daß verschiedene Meßpositionen auf der Membran eine unterschiedliche Anzahl an funktionellen Integrinmolekülen aufweisen. Aus diesem Grund sind einzelne Bindungsmessungen an unterschiedlichen Meßpositionen derselben Membran oder sogar an unterschiedlichen Membranen nur bedingt vergleichbar (siehe auch *Kapitel 4.3.4*). Statistisch verlässliche Ergebnisse können jedoch durch quantitative Bindungsmessungen erhalten werden (Schütt 2003) (siehe *Kapitel 4.4*).

4.3 Nachweis der Bindung der synthetischen Peptide an eine Integrin-funktionalisierte Membran

In diesem Kapitel wird die Bindung beider synthetischen Peptide 1 und 2 an eine mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ funktionalisierte Membran charakterisiert. Die Liganden zeigen dabei ein unterschiedliches Bindungsverhalten (siehe *Kapitel 4.3.2*). Ebenso unterscheiden sich die Bindungsaffinitäten der jeweiligen *cis*- und *trans*-Isomere von Peptid 1 sowie von Peptid 2 deutlich voneinander. Die Spezifität der Bindung der Peptidliganden wird auch durch ihre Reversibilität bestätigt. Da Mg^{2+} -Ionen für die Bindung an Integrin essentiell sind (Hynes 1992), kann der gebundene Ligand durch die Inkubation und dem Spülen mit EDTA abgelöst werden (siehe *Kapitel 4.3.3*). Auf diese Weise können mehrere Bindungsmessungen jeweils an einer identischen Membran durchgeführt werden.

4.3.1 Vergleich der Bindung der Peptide 1 und 2 in *cis*- und *trans*-Konformation

Die synthetischen Peptide 1 und 2 binden jeweils mit unterschiedlicher Affinität spezifisch an die Integrin-funktionalisierte Membran. In *Abb. 4-11* sind SPFS-Messungen dargestellt, die jeweils aus 3 Einzelmessungen gemittelt wurden. Diese Bindungsmessungen weisen ein Fluoreszenzmaximum im Resonanzwinkel von $\theta_i = 57.5^\circ$ auf. Beide Isomere von Peptid 1 (...) binden das Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit einer um 30% höheren Affinität als die Isomere von Peptid 2 (---). Da sich Peptid 1 und Peptid 2 allein in der Position des Azobenzols in der Sequenzabfolge unterscheiden (siehe *Abb. 4-1*), kann diese offensichtlich die Bindungsaffinität beeinflussen (Milbradt 2005).

Auch innerhalb der Isomere eines Peptids bestehen deutliche Affinitätsunterschiede: So weist das *cis*-Isomer von Peptid 1 nur etwa 66% der Bindungsaffinität des *trans*-Isomers auf. In *Abb. 4-12* sind zur Verdeutlichung dieser Affinitätsunterschiede die jeweiligen im Resonanzwinkel $\theta_i = 57.5^\circ$ gemessenen Fluoreszenzmaxima aufgetragen. Hieraus ist auch ersichtlich, daß das *trans*-Isomer innerhalb der isomeren Formen von Peptids 2 eine höhere Bindungsaffinität als das *cis*-Isomer aufweist. Aufgrund der gemessenen stärkeren Affinität von Peptid 1 (*Abb. 4-11* und *Abb. 4-12*) werden die folgenden quantitativen Messungen mit diesem Liganden vorgenommen.

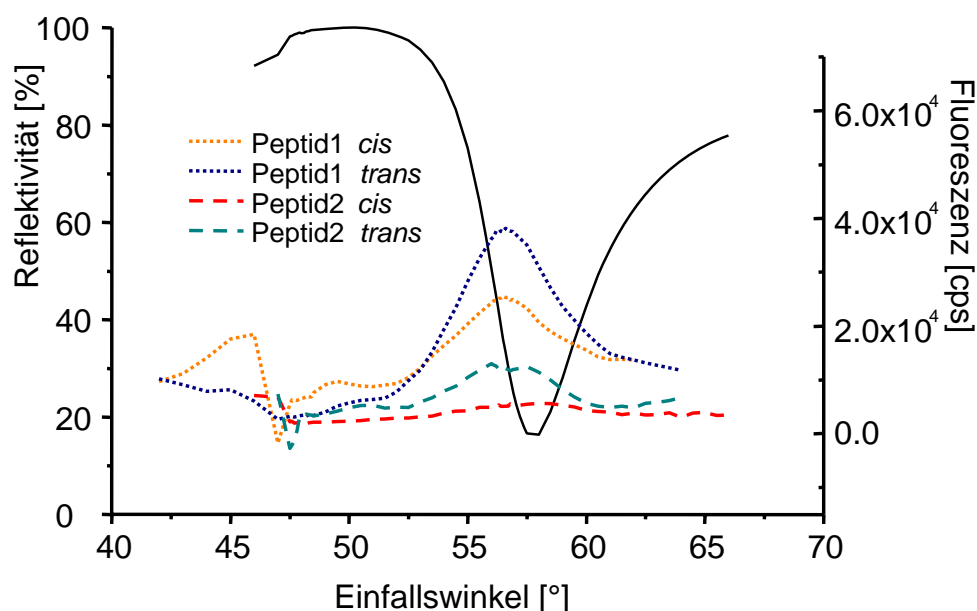


Abb. 4-11: Vergleich der SPFS-Messungen der Bindungen von Peptid 1 (...) und 2 (---) in *cis*- bzw. *trans*-Konformation an einer artifiziiellen Integrin-funktionalisierten Membran. Die gezeigten Werte sind aus jeweils drei Einzelmessungen gemittelt. Das Oberflächenplasmon ist als winkelabhängig gemessene Intensität des reflektierten Lichts dargestellt (---).

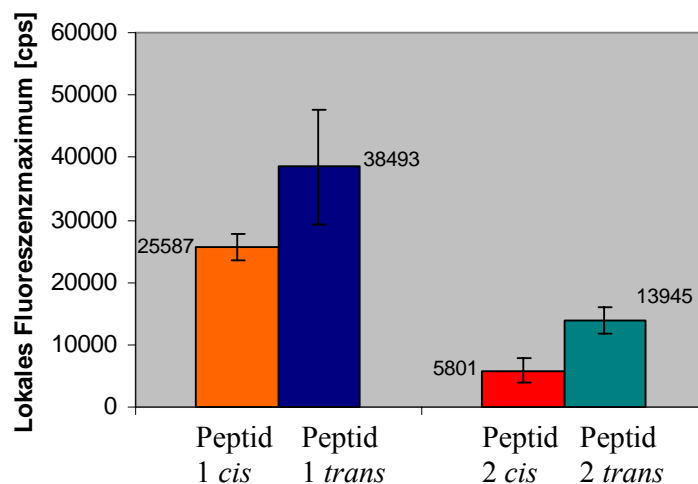


Abb. 4-12: Darstellung der lokalen Fluoreszenzmaxima von Peptid 1 und Peptid 2 in cis- bzw. trans-Konformation. Der Graph zeigt den Mittelwert von jeweils drei SPFS-Messungen auf einer identischen artifizialen Membran.

In dieser Arbeit wird eine eindeutig höhere Bindungsaffinität für die beiden *trans*-Isomere gemessen (siehe Abb. 4-11 und Abb. 4-12). Im Gegensatz dazu sagt eine Studie, die auf den bekannten strukturellen Bindungsaffinitäten von Integrin $\alpha_V\beta_3$ -Liganden basiert, eine stärkere Bindung von Integrin-Liganden in *cis*-Konformation voraus (Haubner 1997). Daher werden die Koordinaten der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von Integrin $\alpha_V\beta_3$ im Komplex mit dem zyklischen Pentapeptid c[RGDfMV] von (Xiong 2002) mit denen des *trans*-Isomers von Peptid 1 verglichen (siehe Abb. 4-13), (Schütt 2003). Daraus resultiert eine generelle Ähnlichkeit der Struktur des komplexierten Liganden von (Xiong 2002) (blau dargestellt) mit freiem *trans*-Isomer des Peptids 1 (grau dargestellt). Die RGD-Sequenz von Peptid 1 in *trans*-Konformation präsentiert die für eine Bindung essentiellen Aspartat- und Arginin-Seitenketten in ähnlicher Art und Weise wie das c[RGDfMV]-Peptid. Das *trans*-Isomer von Peptid 1 besitzt jedoch durch die Umstrukturierung des D-f-V-Sequenzteils eine andere Form als c[RGDfMV] (siehe auch Abb. 4-1). Dadurch würde es bei einer Bindung mit einer Schleife der bindenden Domäne von Integrin $\alpha_V\beta_3$ kollidieren. Dies kann aber durch die Flexibilität des Liganden oder der bindenden Domäne ausgeglichen werden. Zusammenfassend unterstützt daher dieser theoretische Vergleich das in dieser Arbeit gemessene Ergebnis.

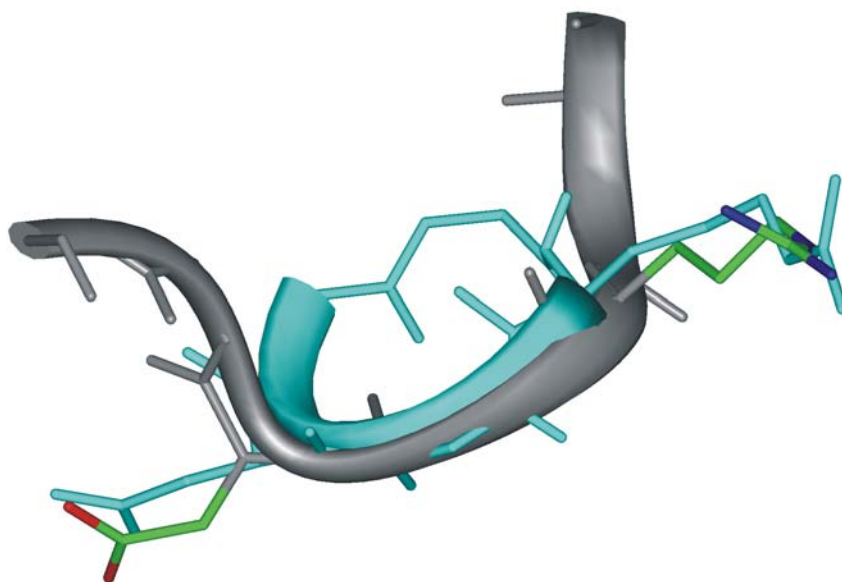


Abb. 4-13: Orientierung der Seitenketten von komplexiertem c[RGDfMV] (blau dargestellt) und freiem Peptid 1 in *trans*-Konformation (c[RGDfV-AMPB-KA], grau dargestellt). (Abbildung von A. Milbradt, (Schütt 2003))

Da das *cis*-Isomer ein größeres Volumen als das *trans*-Isomer einnimmt (vgl. Abb. 4-2), ist eine Bindung des *cis*-Isomers an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ energetisch aufwendiger. Dies könnte die schwächere Bindungsaffinität der *cis*-Isomere der Peptide 1 und 2 erklären. Die stärkere Affinität der jeweiligen *trans*-Isomere kann darauf zurückgeführt werden, daß in der *trans*-Konformation das Peptidrückgrad relativ zur Azobenzen-Einheit parallel in gestreckter Form vorliegt (vgl. Abb. 4-2) und daher für eine Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Bindung besser zugänglich ist (Schütt 2003), (Löweneck 2005).

4.3.2 Kontrollexperiment zur Bindungsmessung

Um die Spezifität der Bindung von Peptid 1 und Peptid 2 aufgrund ihres RGD-Motivs nachzuweisen, wird die Bindung eines weiteren zyklischen Peptids untersucht, welches eine AMPB-Gruppe, aber kein RGD-Motiv enthält. Dieses Peptid c[K-AMPB-KCATCDKK] wird im Folgenden als Negativkontrolle bezeichnet.

Die Negativkontrolle ist ebenso wie die beiden Liganden Peptid 1 und Peptid 2 über seine Lysin-Seitenketten an den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt. Die Negativkontrolle enthält vier Lysine, im Unterschied zu Peptid 1 und Peptid 2, die jeweils nur ein Lysin aufweisen. Aufgrund dieser vier Lysine kann die Negativkontrolle mit der vierfachen Menge an Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, wodurch eine sensitive Detektion möglicher unspezifischer Bindungen gegeben ist.

Zunächst wird die Negativkontrolle auf eine frisch hergestellte Integrin-funktionalisierte Membran gegeben und nach entsprechender Inkubationszeit abgespült. Die anschließende

SPFS-Messung ist in *Abb. 4-14* dargestellt. In dem Winkel θ_i , in dem Plasmonenresonanz erwartet wird (siehe *Abb. 4-11*), ist in *Abb. 4-14* keine Fluoreszenz sichtbar. Die gemessene Fluoreszenz nach dem Abspülen der Negativkontrolle liegt nur gering über dem Fluoreszenzhintergrund der artifiziellen Membran. Auffallend ist die Verschiebung des gemessenen Reflektivitätsminimums zu einem größeren Resonanzwinkel und zu niedrigerer Reflektivität sowie die Vergrößerung der Halbwertsbreite der Reflektivitätskurve nach dem Abspülen der Negativkontrolle. Da der dieser Verschiebung zugrunde liegende Mechanismus nicht bekannt ist, kann aus dieser Beobachtung keine klare Aussage getroffen werden. Sicher auszuschließen ist jedoch, das sich auf der Goldoberfläche noch eine homogene Schicht befindet (Max Kreiter, Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, pers. Kommunikation). Die Gründe hierfür könnten an einer Änderung in den Schichten der Membran liegen.

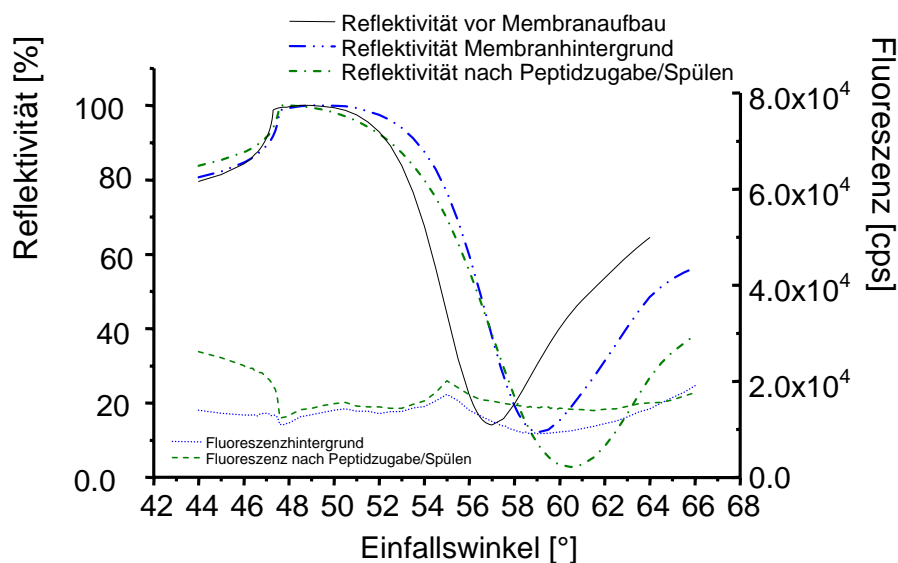


Abb. 4-14: SPFS-Messung einer artifiziellen, Integrin-funktionalisierten Membran auf einer Goldoberfläche vor (blau) und nach dem Abspülen nach der Inkubation mit einem zyklischen Kontrollpeptid ohne Bindungssequenz c[K-AMPB-KCATCDKK] (grün). Die Messungen wurden in dem identischen Puffer durchgeführt. Zusätzlich ist die SPR-Messung auf der wasserbedeckten Goldoberfläche vor dem Membranaufbau gezeigt (schwarz).

Weiterhin auffällig ist auch eine verringerte Bindungsfähigkeit der Integrin-Liganden nach der Messung der Negativkontrolle (siehe *Abb. 4-15*). Wird nämlich direkt nach dem Abspülen der Negativkontrolle (---) eine Bindungsmessung des *trans*-Isomers von Peptid 1 durchgeführt (...), dann findet im Vergleich zu *Abb. 4-11* nur noch eine verringerte Bindung von Peptid 1 statt. Diese Beobachtung wurde durch identische Messungen an drei Integrin-funktionalisierten Membranen bestätigt. Eine Bindung des Negativkontroll-Peptids trotz fehlendem RGD-Motiv an die Integrinmoleküle kann ausgeschlossen werden, da eine

Spülung mit EDTA, welches die spezifische Bindung von Integrinliganden löst (siehe Kapitel 4.3.3) nach der Zugabe der Negativkontrolle keine verbesserte Affinität der Membran für Peptid 1 bewirkt (Daten nicht gezeigt).

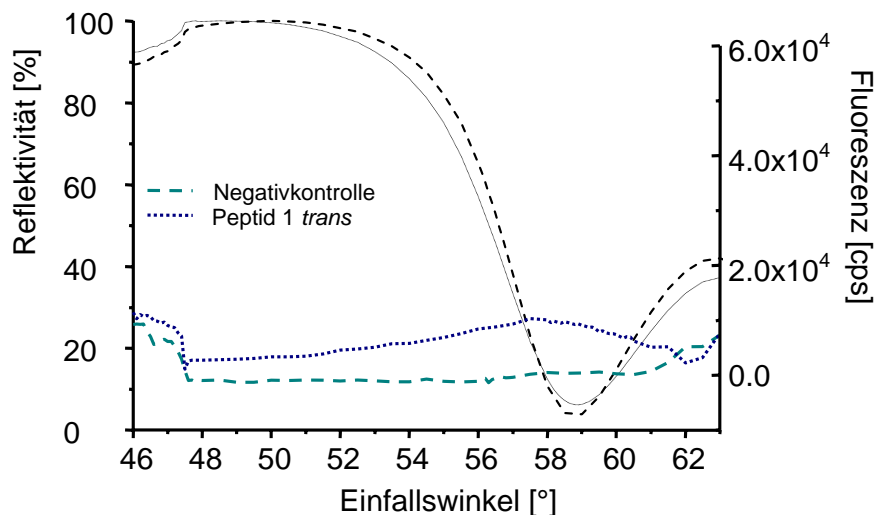


Abb. 4-15: Verringerte Bindung von Peptid1-trans-Isomer nach Abspülen der Negativkontrolle. Der Fluoreszenzhintergrund wurde jeweils abgezogen.

Eine Erklärung für die Beobachtungen in Abb. 4-13 und 4-14 könnte sein, daß zwar keine Bindung der Negativkontrolle stattfindet, sondern möglicherweise eine Wechselwirkung zwischen dem Peptid c[K-AMPB-KCATCDKK] und der Integrin-funktionalisierten Membran. Da die Negativkontrolle vier Lysine aufweist, ist es möglich, daß diese mit dem positiv geladenen Phosphatidylcholin der Membran wechselwirken (L. Moroder, pers. Mitteilung).

Es ist bekannt, daß kurze Polylysine wie Tetralysin oberflächlich an Lipiddoppelschichten binden, ohne in diese einzudringen (Roux 1988). Röntgenstrukturanalysen deuten auch darauf hin, daß lysinhaltige Polypeptide als Verbindung zwischen benachbarten Lipiddoppelschichten fungieren und dadurch deren Aggregation und Dehydratation auslösen können (Carrier 1986). Von Polypeptiden, welche zusätzlich zu vier Lysinresten noch weitere organische Komponenten enthalten, wurde hingegen ein starker Einfluß auf die Struktur von Membranmimetika wie Phasenseparation (Galla 1975), (Cezanne 1999) oder Phasentransition (de Kruijff 1985), (Franzin 2001) nachgewiesen. Von einem PEG-haltigen Lysinpeptid ist eine zerstörerische Wirkung auf festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten bekannt, wobei die Molarität des verwendeten Puffers sowie die Qualität der Membranen maßgebende Faktoren sind (Rossetti 2004). Die Bildung von Domänen kann zu Defekten in einer festkörperunterstützten artifiziellen Membran führen (Rossetti 2004). Da es momentan

experimentell nicht möglich ist, eine artifizielle Membran ohne jegliche Defekte zu erstellen (Rädler 1995), (Sackmann 1996), könnte eine zusätzliche Induzierung von Membrandefekten durch lysinhaltige Peptide die Funktionalität einer artifiziellen Membran beeinträchtigen. Die in dieser Arbeit verwendete peptidunterstützte Membran kann anhand ihres Aufbaus aus Vesikeln mit einem Durchmesser von 100 nm, welcher einen Kompromiß zwischen der sterischen Einlagerung der Integrinmoleküle und der Spreitung zu einer möglichst homogenen Lipiddoppelschicht darstellt, mit SPR nicht nachweisbare Inhomogenitäten aufweisen. Eine kleinere Vesikelgröße von etwa 50 nm Durchmesser würde zu einer homogeneren Membran mit wenigen Defekten führen (Cremer 1999), (Reimhult 2003), aber die funktionelle Inkorporation von Integrinmolekülen erschweren. Bereits eine kleine Anzahl von Membrandefekten, welche sich auch unterhalb des Detektionslimits befinden können, können ein Auseinanderbrechen der artifiziellen Membran begünstigen (Diederich 1998). Die Anlagerung von Lysinresten auf einer Seite der Modellmembran könnte zu einem asymmetrischen Membranpotential führen, wodurch ein Auseinanderbrechen initiiert werden kann (Diederich 1998), (Nagaraj 1987).

Anhand dieser Überlegungen besteht die Möglichkeit, daß das lysinreiche Negativkontrollpeptid die in der Integrin-funktionalisierten Modellmembran enthaltenen Defekte verstärkt, da auch die in *Abb. 4-14* gezeigte Verschiebung des gemessenen Reflektivitätsminimums auf eine starke Veränderung der Membranoberfläche hinweist.

Dadurch könnte eine Denaturierung oder teilweise Inaktivierung der Integrinmoleküle stattfinden. Nachfolgende Peptidbindungen wären dann im Vergleich zu einer intakten Integrinfunktionalisierten Membran nur noch bedingt möglich, wie in *Abb. 4-15* angedeutet wird.

Da das Negativkontrollpeptid mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt ist, wäre allerdings bei der Interaktion mit dem Membransystem ein Anstieg der Fluoreszenz gegenüber dem Membranhintergrund zu erwarten, der in *Abb. 4-14* jedoch verschwindend gering bleibt. Möglicherweise könnte der Großteil des Negativkontrollpeptids nach dem Inkubationsschritt abgewaschen werden und die Fluorophore der verbleibenden Peptide, welche mit der Membranoberfläche interagieren, von der Dämpfung des Förstertransfers betroffen sein. Dieses Dämpfungsphänomen wird bis zu einer Entfernung von ca. 10 nm von einer Goldoberfläche effektiv (Liebermann 2000), (Lakowicz 2004). Bei einer Anlagerung an die Lipiddoppelschicht befindet sich das Negativkontrollpeptid aber höchstens 8.7 nm vor der Goldoberfläche (vgl. *Abb. 4-6*), weshalb eine Dämpfung der Cy5 Fluorophore wahrscheinlich wäre.

Als Resultat dieses Experiments erfolgt die Negativkontrolle im Folgenden stets nach den eigentlichen Bindungsmessungen. Dieses Peptid stellt aufgrund der Beobachtungen in *Abb. 4-14* und *Abb. 4-15* zwar keine ideale Negativkontrolle dar, erfüllt aber insofern die

Bedingung einer Negativkontrolle, daß von ihm keine Bindung an die Integrinmoleküle nachgewiesen werden kann.

4.3.3 Reversibilität der Bindung von Peptid 1 und Peptid 2

Die Reversibilität der Ligandenbindung an Integrin durch Ablösung mit EDTA bestätigt die Spezifität dieser Bindung. Auch können durch die Ablösung eines gebundenen Liganden mehrere Bindungsmessungen auf einer identischen artifiziellen Membran vorgenommen werden, was den genauen Vergleich der SPFS-Messungen ermöglicht.

SPFS-Messungen der durch EDTA vermittelten Ablösung eines Peptid 1-*trans*-Isomers werden in *Abb. 4-16* gezeigt. EDTA komplexiert die zur Integrinbindung essentiellen Mg^{2+} -Ionen (Hynes 1992). Für die Reversibilität der Bindung werden mehrere Inkubations- und Spülvorgänge mit EDTA benötigt (siehe auch *Kapitel 2.6.3.1*). Dabei wird ein an eine Integrin $\alpha_v\beta_3$ -funktionalisierte Membran gebundener Peptidligand am besten abgelöst, indem die EDTA-Lösung für einen Zeitraum von 3 h im Abstand von 15 min ausgewechselt wird. Nur durch die Spülvorgänge kann verhindert werden, daß abgelöste Liganden wieder an die Membran binden. Auch eine Ablösung nach einer Inkubation über Nacht mit EDTA kann durch Spülvorgänge verbessert werden.

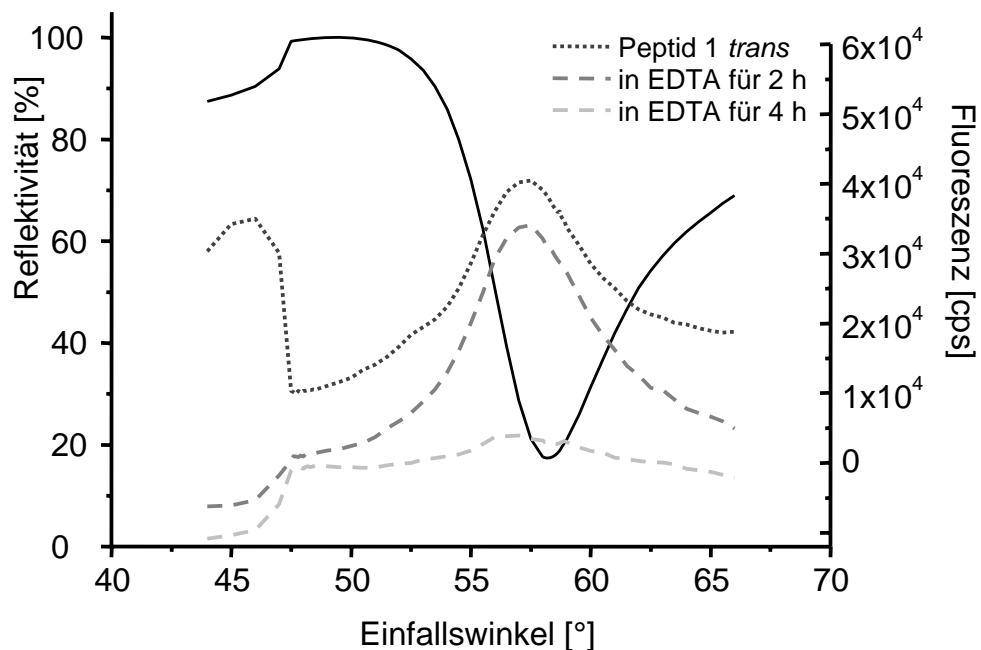


Abb. 4-16: SPFS-Messungen von Peptid 1 in *trans*-Konformation, welches an Integrin gebunden ist (...) sowie nach Inkubation mit EDTA für 2 h (---) bzw. für 4 h (---). Die Messungen erfolgten auf der identischen Meßposition auf der artifiziellen Membran.

Die Ursache dafür, daß zur Ablösung der Liganden intensive Inkubationen mit EDTA nötig sind, könnte in der von Luo et al. (Luo 2003) beschriebenen hohen Stabilität des

bindungsfähigen Zustands von Integrinen liegen. Diese Konformation wird durch die hohe Affinität der Bindung von RGD-haltigen Peptiden induziert, die auch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen beiden Untereinheiten des Integrins bewirkt. Daher bleibt die Integrinbindung an RGD-Peptide auch nach der Einwirkung von EDTA erhalten (Luo 2003). Für mehrere Bindungs- und Ablösungsvorgänge verwendete Integrin-funktionalisierte Membranen zeigen einen höheren Fluoreszenzhintergrund als direkt nach ihrem Aufbau (Daten nicht gezeigt). Daher kann angenommen werden, daß die fluoreszenzmarkierten Liganden nicht vollständig durch die in *Kapitel 2.6.3.1* beschriebenen Inkubations- und Spülvorgänge mit EDTA abgelöst werden.

Die Inkubation mit EDTA beeinträchtigt die Bindungsfähigkeit der Integrinmoleküle zumindest nach viermaligem Ablösen nicht (siehe auch *Abb. 4-17*). Um eine eventuelle Schädigung durch die Belichtung mit dem Laserstrahl zu verhindern, wird die Oberfläche der Meßzelle in der Zeit zwischen den Messungen abgedeckt. Die Belichtung der Integrin-funktionalisierten Membran bleibt daher nach ihrem Aufbau jeweils auf die etwa 2 min dauernden SPFS-Messungen beschränkt. Um dennoch einer Abnahme der physiologischen Aktivität des Integrins vorzubeugen, wird die Benutzung einer Integrin-funktionalisierten Membran auf maximal 4 Tage festgelegt. Die Funktionalität einer Membran, welche während 4 Tagen bei Raumtemperatur mehrfachen Spülvorgängen mit Bindungspuffer und EDTA ausgesetzt wurde, kann anhand der erfolgreichen Bindung von Peptid 1 in beiden Konformationen nachgewiesen werden (siehe *Abb. 4-17*).

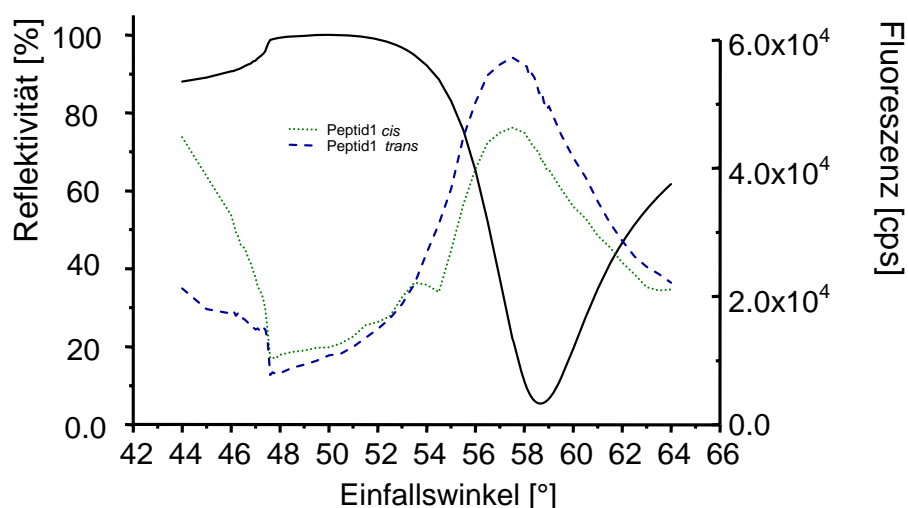


Abb. 4-17: SPFS-Messungen von Peptid 1 in cis- sowie trans-Konformation auf einer 4 Tage alten, Integrin $\alpha_v\beta_3$ -funktionalisierten artifiziellen Membran. Der Fluoreszenzhintergrund ist jeweils von den Messungen abgezogen.

4.3.4 Reproduzierbarkeit der Messungen auf verschiedenen Meßpositionen

Die Reproduzierbarkeit der Bindungsmessungen wird zunächst dadurch getestet, daß unterschiedliche Meßpositionen derselben Integrin-funktionalisierten Membran mit Peptid 1-*trans*-Isomeren vermessen werden. Dies ist in *Abb. 4-18* dargestellt. Obwohl jeweils die identische Integrin-funktionalisierte Membran mit einer identischen Probe des Liganden untersucht wird, zeigen die gemessenen Fluoreszenzsignale eine hohe Diversität. Die Ursache hierfür kann in der unterschiedlichen Verteilung der funktionellen inkorporierten Integrinmoleküle liegen. Sofern in dem verwendeten Membransystem laterale Diffusion möglich ist, kann diese Verteilung in der Membran durch laterale Diffusion oder Aggregation entstehen. Auch die jeweilige experimentell nicht beeinflussbare Orientierung der Integrinmoleküle trägt zur Heterogenität der Membran bei (siehe *Kapitel 4.2*). Die in den nachfolgenden Kapiteln nachgewiesene Ligandenbindung läßt jedoch darauf schließen, daß sich zumindest ein Teil der inkorporierten Rezeptoren in der erwünschten Orientierung befindet, da die jeweilige Bindungsstelle in ihrer Konformation erhalten und zugänglich ist. Aus sterischen Gründen kann die in *Abb. 4-5* dargestellte korrekte Orientierung als wahrscheinlich häufigste angenommen werden. Durch den Aufbau aus Vesikeln mit einem Durchmesser von 100 nm, ein Kompromiß aus möglichst funktioneller Inkorporation der Integrinmoleküle und der Homogenität der nach der Vesikelspreitung resultierenden Lipiddoppelschicht, können mit Plasmonenmessungen nicht nachweisbare Membrandefekte nicht vermieden werden (Cremer 1999), (Reimhult 2003). Alle aufgeführten Ursachen können gemeinsam zur Heterogenität der verwendeten Integrin-funktionalisierten Membranen beitragen.

Der Meßbereich auf der artifiziellen Membran beträgt durch den Durchmesser des anregenden Laserstrahls ungefähr 1 mm^2 . Die gemessenen Fluoreszenzsignale geben jeweils die Bindungsaffinität aus diesem Bereich wieder. Für eine höchstmögliche Reproduzierbarkeit werden daher die folgenden Messungen jeweils an einer identischen Meßposition durchgeführt, indem jeweils die Lösungen in der Meßküvette ausgetauscht werden.

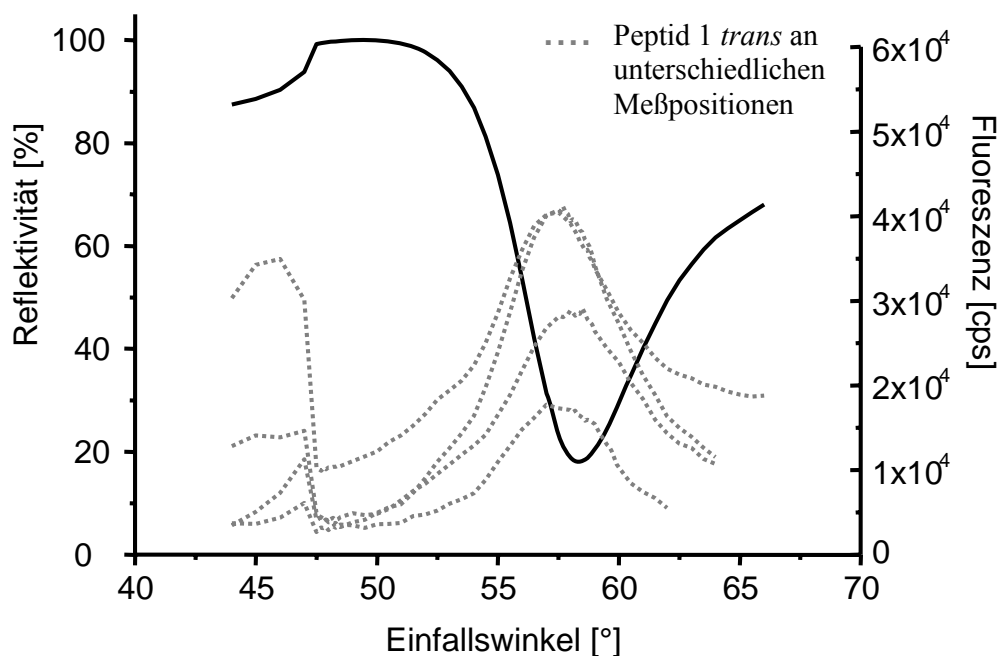


Abb. 4-18: Die Heterogenität der SPFS-Messungen der Bindung des Peptid 1-*trans*-Isomers an Integrin $\alpha_v\beta_3$ (...). Die Messungen wurden an unterschiedlichen Stellen der Membran durchgeführt.

4.3.5 Photomodulation von komplexiertem Liganden

Eine der Aufgaben dieser Arbeit ist die Entwicklung eines lichtschtbaren Systems: die an Integrin in der Membran gebundenen Liganden sollen durch Einstrahlen von Licht einer bestimmten Wellenlänge ihre Konformation wechseln, wodurch die Bindung an Integrin $\alpha_v\beta_3$ gelöst wird. Wie allerdings bereits in Abb. 4-5 gezeigt ist, kann Peptid 1-Cy5 mit deutlich geringerer Effektivität als freies Peptid 1 photomoduliert werden. Um diesen geringen Effekt trotzdem auszunutzen, wird Cy5-gekoppeltes *trans*-Isomer des Peptids 1 im gebundenen Zustand belichtet. Hierfür wird ein Lichtleiter benutzt, so daß direkt auf die in der Meßküvette befindliche Membran mit gebundenem Liganden Licht eingestrahlt werden kann.

Das Ausbleichen von Cy5-Molekülen bei einer Belichtung mit $\lambda = 633$ nm ist bekannt (Füreder-Kitzmüller 2005). Die Fluoreszenz von Cy5 kann aber durch eine Belichtung mit kleineren Wellenlängen im Bereich von $\lambda = \sim 300-532$ nm wiederhergestellt werden (Heilemann 2005). Aufgrund dessen wird in dem folgenden Experiment bei einer Belichtung der Peptid 1-Cy5 Konjugate mit $\lambda = 360$ nm bzw. $\lambda = 450$ nm keine Photobleichung des Cy5-Chromophors erwartet. Mittels einer Messung von unbelichtetem Peptid 1 *trans*-Isomer auf der identischen Membran kann jedoch eine eventuelle Photobleichung des Konjugats überprüft werden.

Die Belichtung der Integrin-funktionalisierten Membran mit gebundenem Peptid 1 *trans*-Isomer mit der Wellenlänge $\lambda = 360$ nm soll zur Photoisomerisierung des Peptids in die *cis*-Konformation führen. Erwartungsgemäß bewirkt die fortschreitende Belichtungszeit eine Verringerung des Fluoreszenzsignals (Kurven 1 und 2 in *Abb. 4-19*). Dies stimmt mit den Beobachtungen aus *Abb. 4-5* und *Abb. 4-11* überein. Es besteht zumindest eine geringe Photoisomerisierbarkeit des Cy5-gekoppelten Liganden, und die Bindungsaffinität von Peptid 1 sinkt deutlich in der *cis*-Konformation.

Allerdings ähnelt die gemessene Fluoreszenz nach 20minütigem Belichten mit $\lambda = 360$ nm dem Hintergrundsignal (Kurve 3 in *Abb. 4-19*). Daraufhin wird Licht der Wellenlänge $\lambda = 450$ nm eingestrahlt. Eine dadurch induzierte Rückisomerisierung in die *trans*-Konformation sollte eine höhere Bindungsaffinität und damit ein Ansteigen des Fluoreszenzsignals bewirken. Wie nun aus Kurve 4 in *Abb. 4-19* ersichtlich ist, bewirkt 20minütiges Einstrahlen von Licht der Wellenlänge $\lambda = 450$ nm genau das Gegenteil des erwarteten Fluoreszenzanstiegs: Die gemessene Fluoreszenz sinkt stark und beträgt nun etwa 0.6×10^4 cps weniger als der Fluoreszenzhintergrund der Membran vor der Peptidzugabe.

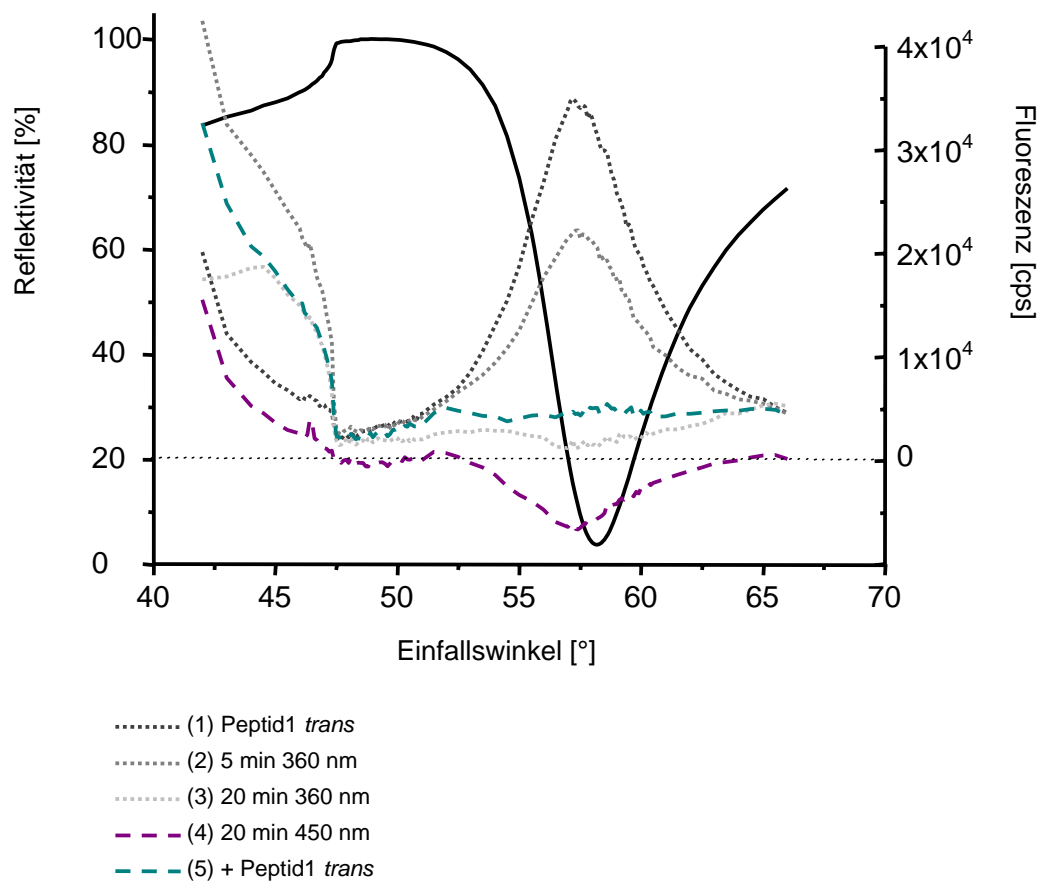


Abb. 4-19: SPFS-Messungen von Peptid 1-trans-Isomer, welches an eine Integrin-funktionalisierte Membran gebunden ist. Das Peptid wird im gebundenen Zustand mit Licht der Wellenlängen $\lambda = 360$ nm bzw. $\lambda = 450$ nm bestrahlt. Die Hintergrundfluoreszenz wird jeweils mathematisch abgezogen. Die Messung der Reflektivität verändert sich nicht durch die Belichtungen.

Aus der gemessenen geringen Fluoreszenz nach der Belichtung mit $\lambda = 450$ nm läßt sich vermuten, daß kein Cy5-gekoppelter Ligand mehr an die Membran gebunden ist. Daher wird die Funktionalität der Integrin-funktionalisierten Membran durch Zugabe einer identischen Probe des *trans*-Isomers von Peptid 1 getestet. In *Abb. 4-19* ist diese Messung durch Kurve 5 dargestellt. Das gemessene Fluoreszenzsignal weist kein Maximum auf, wie bei einer Bindung des *trans*-Isomers von Peptid 1 an eine intakte Integrin-funktionalisierte Membran bisher detektiert wurde (Kurve 1). Weiterhin bestätigt das geringe Fluoreszenzsignal der Probe des zuletzt vermessenen unbelichteten Peptid 1-*trans*-Isomers, daß die gemessene geringe Fluoreszenz nach den Photoschaltungen nicht auf eine Bleichung des Cy5-Chromophors zurückgeführt werden kann. Im Fall einer Bleichung wären zwar niedrige Fluoreszenzsignale der Kurven 2 - 4, aber bei dem zuletzt vermessenen unbelichteten Peptid (Kurve 5) ein der Kurve 1 ähnliches Fluoreszenzsignal erwartet worden.

Das Absinken der Fluoreszenz unter den Fluoreszenzhintergrund (Kurve 4) könnte auf eine Veränderung der artifiziellen Membran im Vergleich zu ihrem Ausgangszustand vor der Belichtung hindeuten. Möglich wäre, daß die inkorporierten Integrinmoleküle durch die Einstrahlung von Licht in ihrer Funktionalität zerstört werden (L. Moroder, pers. Mitteilung). Es ist bekannt, daß vor allem in der Gegenwart eines Chromophors bei Belichtung reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt werden (Odell 1970), (Kraljic 1986), (Abels 2000). Diese können eine Photooxidation von funktionellen Zentren in Proteinen auslösen (Wondrak 2002), welche beispielsweise in einer reduzierten Bindungsfähigkeit von Liganden resultieren. Dabei sind vor allem die Aminosäuren Tryptophan, Histidin, Tyrosin und alle schwefelhaltigen Derivate von Cystein und Methionin von Photooxidation betroffen (Ilag, 2003). Weiterhin kann die Einwirkung von hohen Beleuchtungsstärken auch wärmeinduzierte Schäden in Proteinen auslösen (Buehler 1999). Der Ausmaß der lichtinduzierten Schädigung von Biomolekülen steigt mit dem Quadrat der jeweiligen eingestrahnten Lichtstärke sowie mit der Verwendung kleinerer Wellenlängen an (So 2000). Daher ist die Auswirkung auf die Integrinmoleküle während einer etwa 2 min dauernden SPFS-Messung mit der Intensität von 0.8 mW des verwendeten Laserstrahls weitaus geringer als die Lichtintensität der 20minütigen Photoschaltung bei 25 mW. Diese beiden Beleuchtungsvorgänge sind allerdings aufgrund der unterschiedlichen Wellenlängen $\lambda = 633$ nm bei der SPFS-Messung und $\lambda = 360$ nm bzw. $\lambda = 450$ nm bei der Photoschaltung nicht miteinander zu vergleichen.

Dieser Versuch läßt daher vermuten, daß infolge von Prozessen der Photooxidation keine direkte Photomodulation der verwendeten fluoreszenzmarkierten Peptidliganden während ihrer Bindung an die artifizielle Membran möglich ist. Aus diesem Grund wird in den

folgenden Bindungsmessungen der Ligand jeweils vor seiner Zugabe photoisomerisiert und anschließend an den Fluorophor Cy5 gekoppelt.

Das hier gemessene Fluoreszenzsignal weist außerdem Ähnlichkeiten mit dem Fluoreszenzsignal des Negativkontrolllexperiments auf (siehe Abb. 4-15). Auch dieses Experiment führt vermutlich zu einer Zerstörung der Integrin-funktionalisierten Membran. In beiden Fällen kann eine reduzierte Bindungsfähigkeit der Integrinmoleküle nachgewiesen werden.

4.4 Quantitativer Vergleich der Bindungskapazitäten von Peptid 1 *cis*- und *trans*-Isomeren

Für eine quantitative Aussage der Bindungsaffinitäten von Peptid 1 *cis* und *trans*-Isomeren sind Bindungsmessungen auf verschiedenen Integrin $\alpha_v\beta_3$ -funktionalisierten Membranen notwendig. Wie bereits in Kapitel 4.3.4 ausgeführt ist, sind die Bindungsmessungen an unterschiedlichen Meßpositionen derselben Membran nur bedingt miteinander vergleichbar. Die in Kapitel 4.3.2 dargestellten SPFS-Messungen der *cis*- und *trans*-Isomere von Peptid 1 und Peptid 2 sind Mittelwerte aus jeweils drei Werten, die an unterschiedlichen Positionen einer identischen artifiziellen Membran detektiert wurden. Trotz der Messung an verschiedenen Positionen zeigen die in Abb. 4-12 dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte deutlich eine höhere Bindungsaffinität von Peptid 1 und jeweils beider *trans*-Isomere.

Eine genauere und gut reproduzierbare Aussage kann getroffen werden, wenn die Messungen jeweils an einer identischen Meßposition stattfinden (siehe Kapitel 4.3.4). Um die Funktionalität der Integrinmoleküle zu gewährleisten (siehe auch Kapitel 4.3.3), wird eine Membran für höchstens zwei aufeinanderfolgende Tage und für nicht mehr als vier Bindungsmessungen verwendet. Da jeweils zwei Bindungsmessungen pro Isomer an einer Membran für eine quantitative Aussage nicht ausreichen, werden Bindungsmessungen auf insgesamt vier verschiedenen Membranen verglichen. Dadurch wird jeweils die Integrin-funktionalisierte Membran in höchstens drei Spülvorgängen mit EDTA inkubiert, um jeweils die Liganden abzulösen. Die an diesen Membranen vorgenommenen Bindungsmessungen (siehe Abb. 4-20) weisen daher gleiche Ausgangsbedingungen auf.

Die daraus resultierende durchschnittliche Bindungsaffinität der beiden Isomere wird in Abb. 4-21 gezeigt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.2 weist das *trans*-Isomer eine deutlich höhere Bindungsaffinität als das *cis*-Isomer auf, die aus Abb. 4-21 zu $75\% \pm 25\%$ bzw. um einen Faktor 1.33 bestimmt werden kann. Der hohe Wert der Standardabweichung kommt durch den Vergleich von Messungen auf unterschiedlichen Membranen zustande.

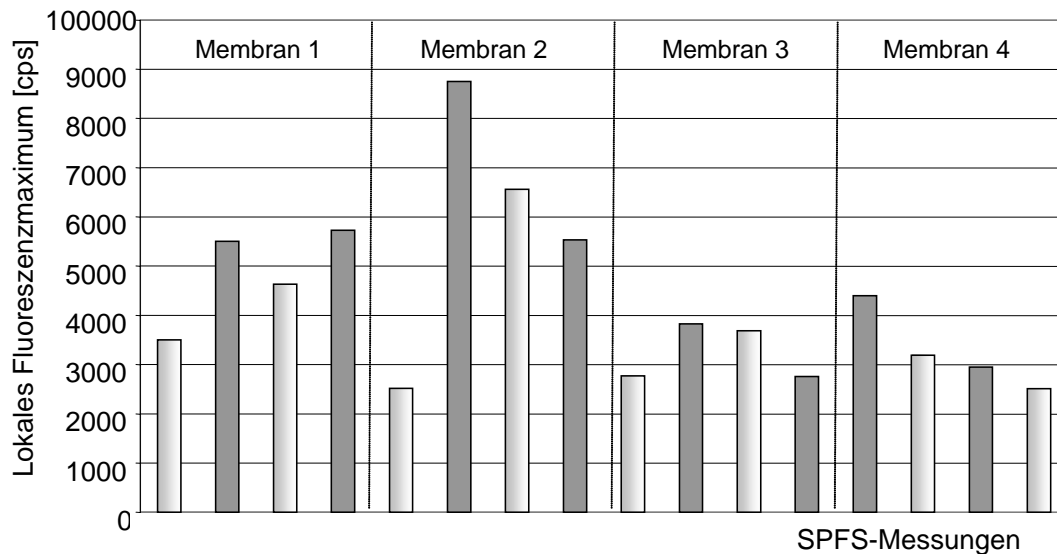


Abb. 4-20: Darstellung der lokalen Fluoreszenzmaxima der Bindungsmessung von Peptid 1 **cis**- und **trans**-Isomeren. Es wurden Bindungsaffinitäten an vier verschiedenen Integrin-funktionalisierten Membranen gemessen. Gemessene Fluoreszenzmaxima mit dem **trans**-Isomer sind dunkel, Messungen mit dem **cis**-Isomer hell dargestellt. Die Fluoreszenzmaxima werden in ihrer gemessenen Reihenfolge gezeigt.

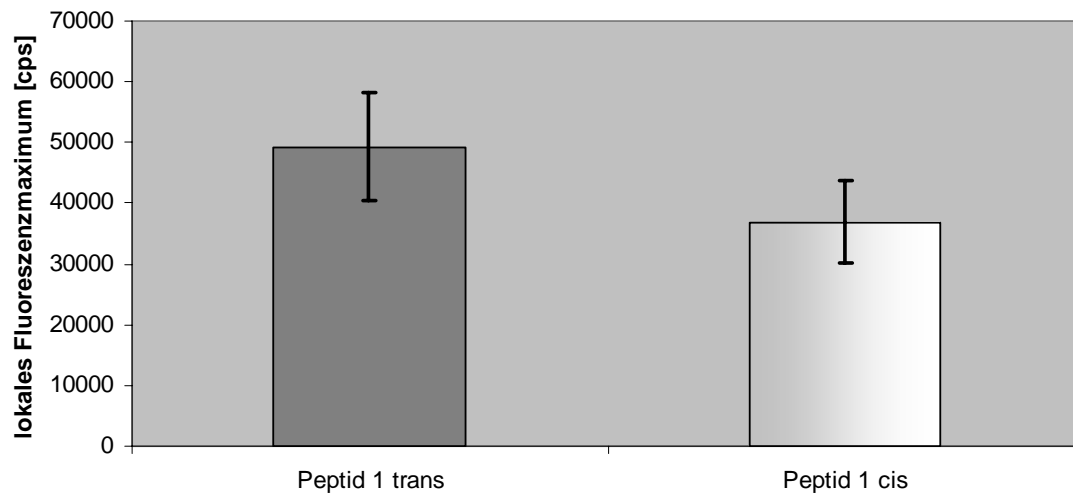


Abb. 4-21: Die durchschnittliche Bindung von Peptid 1 in **trans**- bzw. **cis**-Konformation. Die Darstellung zeigt Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 8 Messungen.

Die Funktionalität der Integrinmoleküle bleibt zumindest während drei Inkubationsschritten mit EDTA erhalten. Dies wird besonders durch die Bindungsmessungen an der ersten Membran in Abb. 4-20 deutlich, in denen das höchste Meßsignal von dem zuletzt vermessenen Liganden stammt. Dennoch besteht die Möglichkeit, daß die Bindungsfähigkeit der Integrinmoleküle durch lange Inkubations- und Spülvorgänge mit EDTA beeinträchtigt wird. Wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben ist, verbleibt möglicherweise auch nach der Ablösung mit EDTA ein Teil der Liganden an die Integrinmoleküle gebunden. Daher könnte sich die

Bindungsfähigkeit der Integrine mit der Anzahl der vorgenommenen Bindungsmessungen ändern.

Ein möglicher Einfluß der Meßreihenfolge auf die detektierten Bindungen wird dadurch analysiert, daß jeweils zwei aufeinanderfolgende Messungen eines *cis*- und *trans*-Isomers in einer identischen Meßposition dividiert werden (siehe *Abb. 4-22*). Analog werden zwei nicht aufeinanderfolgende Messungen von *cis*- und *trans*-Isomeren normalisiert (siehe *Abb. 4-23*). Das *trans*-Isomer des Paares ist jeweils auf 1 gesetzt, so daß der jeweilige Unterschied in seiner Bindungsaffinität zu der des *cis*-Isomers zum Ausdruck kommt.

Das Resultat dieser Analysen ist eine Unabhängigkeit der höheren Bindungsaffinität des *trans*-Isomers von der gemessenen Reihenfolge. Von den 16 analysierten *cis-trans*-Paaren weisen 12 eine höhere Affinität des *trans*-Isomers auf. Der quantitative Vergleich der Bindungsaffinität der *cis*- und *trans*-Isomere von Peptid 1 ist zusammenfassend in *Abb. 4-21* dargestellt.

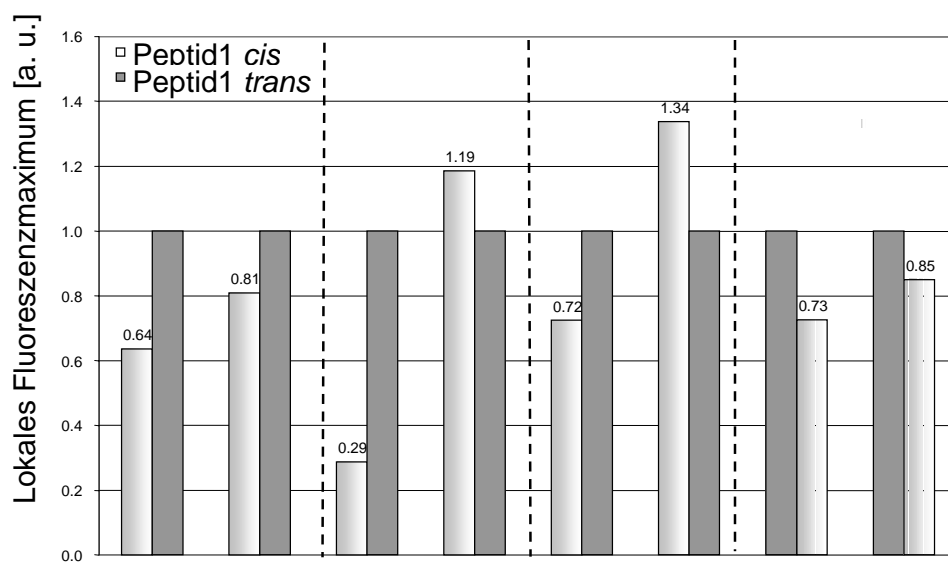


Abb. 4-22: Vergleich der Bindungsaffinitäten der cis und trans Isomere von Peptid 1 durch die Division der nacheinander gemessenen lokalen Fluoreszenzmaxima. Die Messungen werden normiert, indem jeweils der Wert des trans-Isomers auf 1 gesetzt wird.

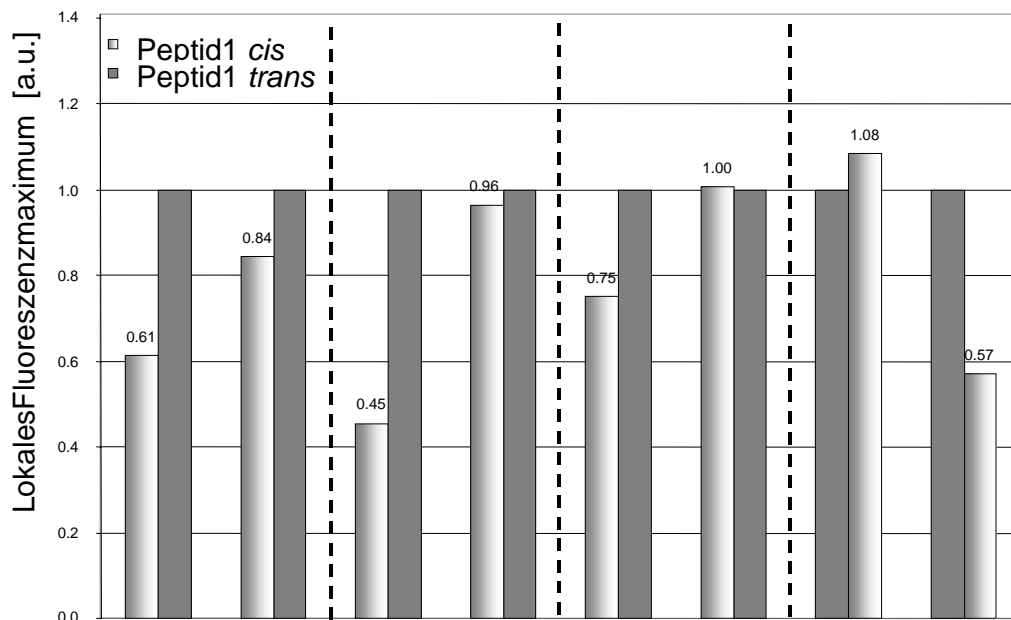


Abb. 4-23: Vergleich der Bindungsaffinitäten der Peptid 1 cis und trans Isomere durch die Division der versetzt gemessenen lokalen Fluoreszenzmaxima. Die Messungen werden durch das Setzen der Daten des trans-Isomers auf 1 normiert.

4.5 Reproduzierbarkeit der Meßsignale

Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Fluoreszenzsignale wird durch mehrmaliges Messen bestätigt. Die Mittelwerte und die Standardabweichung aus jeweils drei reproduzierten Einzelmessungen werden in Abb. 4-24 gezeigt. Die Streuung von den Meßwerten um den Mittelwert beträgt durchschnittlich 1.59%. Die gemessenen Fluoreszenzsignale sind daher mit einer hohen statistischen Verlässlichkeit reproduzierbar.

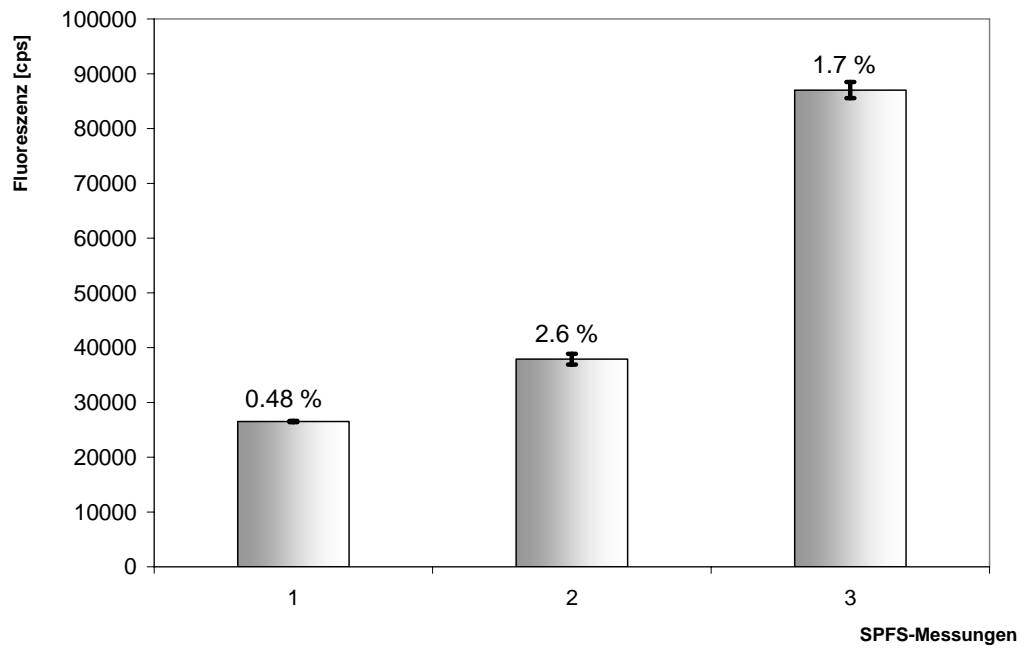


Abb. 4-24: Darstellung von dem Mittelwert und den Standardabweichungen von SPFS-Messungen, die jeweils die Bindung von Peptid 1 an eine Integrin $\alpha_v\beta_3$ -funktionalisierte Membran darstellen. Die gezeigten Werte bestehen aus jeweils 3 gemittelten Einzelmessungen.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel wird ein definiertes Modellsystem vorgestellt, in dem die Dynamik von lichtschtbaren Bindungen synthetischer Peptidliganden an den Zelladhäsionsrezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$ systematisch erfasst werden kann. Dabei wird der Einfluß der Konformation des präsentierten Bindungsmotivs der Peptidliganden auf die Bindungsaffinität an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$ charakterisiert (Schütt 2003).

Die Bindung synthetischer Peptidliganden an Integrin, dessen Funktionalität durch die Inkorporation in eine artifiziellen Membran erhalten bleibt, wird mit Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) nachgewiesen. Die Besonderheit der verwendeten Peptidliganden besteht darin, daß sie zusätzlich zu dem RGD-Bindungsmotiv einen Azobenzol-Chromophor (AMPB) enthalten, der eine reversible Photoisomerisierung ermöglicht. Obwohl sich die Peptidliganden Peptid 1 (c[KARGDFV-AMPB]) und Peptid 2 (c[ARGDFVK-AMPB]) ausschließlich in der Position einer Aminosäure in der Sequenz unterscheiden, kann eine höhere Bindungsaffinität des Peptids 1 relativ zu Peptid 2 um den Faktor 4.41 in der *cis*-Konformation bzw. um den Faktor 2.76 in der *trans*-Konformation nachgewiesen werden (Milbradt 2005). Diese höhere Affinität resultiert aus der Beteiligung unterschiedlicher Aminosäuren an der Integrinbindung. Innerhalb der untersuchten Peptide kann eine konservierte höhere Bindungsaffinität des *trans*-Isomers nachgewiesen werden. Dabei bindet das *trans*-Isomer von Peptid 1 im Mittel um den Faktor 1.33 stärker als das *cis*-Isomer, da das RGD-Bindungsmotiv in der *trans*-Konformation leichter zugänglich ist. Diese höhere Bindungsaffinität des *trans*-Isomers bleibt unabhängig von der vermessenen Integrin-funktionalisierten Membran oder der Meßreihenfolge (Schütt 2003). Dabei kann eine eventuelle Auswirkung des zur Bindungsdetektion an die Peptide gekoppelten Chromophors Cy5 auf die Bindungsaffinität zwar nicht ausgeschlossen werden, würde aber alle untersuchten Peptide in gleicher Art und Weise beeinflussen, so daß die jeweiligen Bindungsunterschiede bestehen bleiben. Allerdings behindert der Chromophor die Photoisomerisierbarkeit der konjugierten Peptide. Die für die Photomodulation benötigte Lichtintensität von 25 mW bewirkt einen möglicherweise durch Photooxidationsprozesse bedingten Funktionalitätsverlust der Integrinrezeptoren, wohingegen die Integrinfunktionalisierte Membran während den vorgenommenen SPFS-Messungen über mindestens 4 Tage hinweg stabil und funktionell bleibt. Das als Negativkontrolle vorgesehene Peptid (c[K-AMPB-KCATCDKK]), welches kein Integrinbindungsmotiv enthält, verursacht ebenfalls eine irreversible Beeinträchtigung der Integrin-funktionalisierten Membran. Diese Beobachtung könnte mit einer Interaktion der vier Lysin-Reste mit der Lipid-doppelschicht erklärt werden, was möglicherweise die in geringem Ausmaß vorhandenen Defekte in der

Membran verstärkt und dadurch einen teilweisen Funktionsverlust der Integrine oder sogar ein Auflösen der Membran bewirkt.

4.7 Diskussion und Ausblick

4.7.1 Bedeutung von peptidunterstützten Membranen als Modellsysteme zur Analyse empfindlicher Membranproteine

In dieser Arbeit wird zu Bindungsmessungen an Integrinrezeptoren eine artifizielle peptidunterstützte Membran verwendet (Schmidt 1998), (Sackmann 2000), (Knoll 2000), (Sinner 2004), welche die Funktionalität der Integrinmoleküle durch die Imitation ihrer natürlichen Umgebung aufrechterhält. Besonders die verankernde Peptidschicht ermöglicht durch den zusätzlichen Raum unterhalb der Lipiddoppelschicht das Einfügen von cytosolischen Domänen eines Membranproteins. Eine Schwierigkeit der Analyse von Membranproteinen in artifiziellen Membranen besteht in der lateralen Beweglichkeit der Membranproteine. Viele Rezeptoren benötigen die Diffusion ihrer Untereinheiten als Voraussetzung ihrer Bindungsaffinitäten oder ihrer Signalübertragung (Peters 1988), (Kwon 1994). Von peptidunterstützten artifiziellen Membransystemen ist jedoch oft eine eingeschränkte Beweglichkeit der inserierten Membranproteine bekannt, da die Möglichkeit besteht, daß diese mit der unterstützenden Schicht interagieren (Wagner 2000). Kurze und wenig flexible Verankerungen erschweren die Diffusion der unteren Membranhälfte (Schiller 2003). Die verankerten Lipide bilden unbewegliche Hindernisse innerhalb der flüssigen Phospholipidmatrix (Naumann 2002), weshalb der Diffusionskoeffizient eines inkorporierten Membranproteins von der molaren Konzentration der verankerten Lipide abhängt (Deverall 2004). Da von dem in dieser Arbeit verwendeten Integrin-funktionalisierten Membransystem kein Diffusionskoeffizient der inserierten $\alpha_v\beta_3$ Rezeptoren bekannt ist, kann über deren Beweglichkeit keine Aussage getroffen werden. Weil die $\alpha_v\beta_3$ Rezeptoren aber wahrscheinlich bereits als Dimere in die artifizielle Membran eingebaut werden und die Wechselwirkung zwischen den beiden Untereinheiten durch die Ligandenbindung sogar noch verstärkt wird (Luo 2003), bereitet eine mögliche Unbeweglichkeit der Integrine für die in dieser Arbeit vorgenommenen Messungen keine Schwierigkeiten.

Eine weitere Herausforderung in dem Modellsystem der peptidunterstützten Membran ist deren homogene Präparation. Die Homogenität einer planaren Membran wird neben der Lipidzusammensetzung auch von der Größe der zur Vervollständigung der Lipiddoppelschicht verwendeten Vesikel bestimmt. Dabei führt die Spreitung kleinerer Vesikel von etwa 50 nm Durchmesser zu einer homogeneren Membran mit wenigen Defekten (Cremer 1999), (Reimhult 2003). Da in dieser Arbeit eine Vesikelgröße von 100 nm Durchmesser verwendet wird um die Integrinmoleküle möglichst funktionell inkorporieren zu können, können Defekte in der Homogenität der Integrin-funktionalisierten Membranen nicht ausgeschlossen werden. Auch die experimentell nicht beeinflussbare Orientierung der Integrinmoleküle kann zur Heterogenität der präparierten Membranen beitragen, wobei allerdings aus sterischen Gründen die korrekte Orientierung als wahrscheinlich häufigste angenommen werden kann. Die erfolgreiche Bindung der Peptidliganden läßt auf eine

korrekte Orientierung zumindest eines Teils der inkorporierten Integrinmoleküle schließen. Möglicherweise sind die in *Kapitel 4.3.4* nachgewiesenen unterschiedlich starken Fluoreszenzsignale auf unterschiedlichen Meßpositionen einer Integrin-funktionalisierten Membran auch auf eine heterogene Verteilung der inkorporierten Integrinmoleküle zurückzuführen. Eine verlässliche Aussage über die Bindungsaffinitäten der photoschaltbaren Peptidisomere kann jedoch anhand von einer statistischen Auswertung von Bindungsmessungen an mehreren Membranen getroffen werden.

Insgesamt bietet die peptidunterstützte artifizielle Membran einen erfolgreichen Ansatz, die Wechselwirkungen von Integrinen mit ihren Liganden außerhalb einer lebenden Zelle in einem definierten System zu analysieren.

4.7.2 Grundlage der dreidimensionalen Struktur des RGD-Motivs für die Integrinbindung und vorgeschlagene Bindungsmodi der Peptide 1 und 2

Die molekularen Grundlagen der Bindung des RGD-Motivs an den Integrinrezeptor $\alpha_v\beta_3$ sind anhand von Informationen aus der Röntgenkristallstrukturanalyse des RGD-Peptids *c*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val] mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ bekannt (Xiong 2002). Diese Daten können dazu verwendet werden, die Bindungsaffinität von zyklischen RGD-Peptiden an Integrin anhand ihrer Sequenz und Ringgröße zu berechnen. In einer solchen Modellierung wurde bereits eine bevorzugte Bindung des *cis*-Isomers eines Azobenzol-haltigen RGD-Peptids vorausgesagt (Haubner 1997). Die in dieser Arbeit experimentell durchgeführten Bindungsstudien weisen jedoch deutlich eine höhere Bindungsaffinität von *trans*-Isomeren nach, welche innerhalb der untersuchten Peptide konserviert ist (Milbradt 2005). Mit diesen detaillierten Informationen über die Wechselwirkungen des RGD-Motivs mit der Integrinbindungstasche ist es nun möglich, maßgeschneiderte Integrinliganden mit definierter Bindungsaffinität zu synthetisieren.

Für eine Bindung von Peptidliganden mit dem RGD-Motiv an Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist eine Spalte an dem sogenannten "Kopf" des Integrins entscheidend, welche sich zwischen der Propeller-Region der α -Untereinheit und der β A-Region der β -Untereinheit befindet (Xiong 2002, siehe *Abb. 4-25*). Der RGD-Ligand besetzt dort die sogenannte Metallion-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS) und interagiert mit beiden Untereinheiten des Integrins. Die stärksten Wechselwirkungen erfolgen aus den Seitenketten des Arginins und des Aspartats des RGD-Motivs. Der Aspartatrest bindet mit seinem ersten Carboxylat-Sauerstoffatom an das Mn^{2+} -Ion in der MIDAS-Region und bildet mit seinem zweiten Carboxylat-Sauerstoffatom jeweils eine H-Brückenbindung zu den Aminosäureresten Tyr122 und

Asn215 des Integrins aus. Gleichzeitig bildet die Seitenkette des Arginins in einer tiefen Spalte an der Spitze der Propeller-Region jeweils eine Salzbrücke zu den Resten Asp218 und Asp160 des Integrins aus. Der zentrale Glycinrest befindet sich als kleine, sehr flexible Aminosäure zwischen den α - und β -Untereinheiten direkt auf der Integrin-Oberfläche (Haubner 1996), (Xiong *et al.*, 2002).

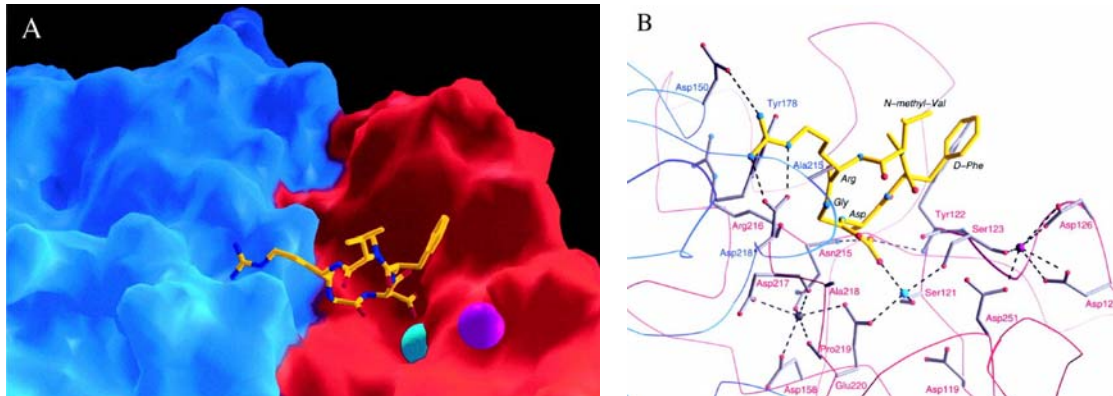
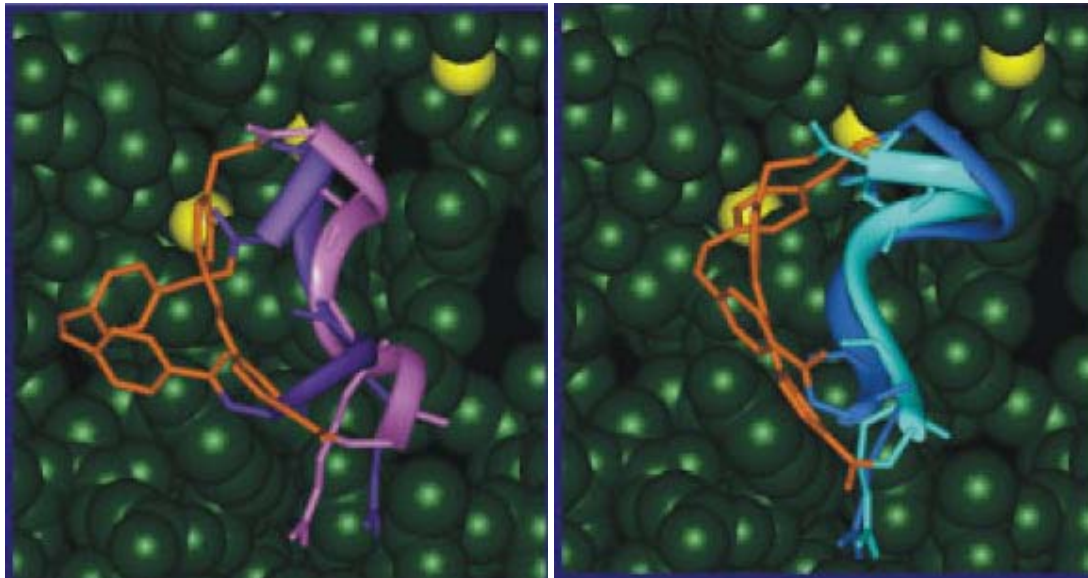


Abb. 4-25: A: Kristallstruktur der Bindungstasche von Integrin $\alpha_v\beta_3$ im Komplex mit dem Peptid c[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-]. Die Untereinheiten sind blau (α_v) bzw. rot (β_3) eingefärbt. B: Hervorhebung der spezifischen Interaktionen zwischen Integrin und Ligand, wobei Mn^{2+} -Ionen türkis (MIDAS) bzw. violett (ADMIDAS) und H-Brückenbindungen bzw. Salzbrücken gestrichelt dargestellt sind (Xiong *et al.*, 2002).

Das RGD-Motiv des *trans*-Isomers des in dem in dieser Arbeit untersuchten Peptid 1 besitzt eine ähnliche definierte räumliche Orientierung wie die Arginin- und Aspartatreste des in Xiong *et al.* (Xiong 2002) verwendeten RGD-Peptids. Die gesamte Peptidkette des *trans*-Isomers liegt parallel zu dem Azobenzolchromophor in gestreckter Form vor. In dem flexibleren *cis*-Isomer dagegen weisen diese beiden Aminosäurereste eine eher zufällige Orientierung auf. Dessen Arginin- und Lysinseitenketten nehmen im Unterschied zu dem *trans*-Isomer tendentiell eine helikale Konformation ein. Als konformationell uneingeschränktes Peptid steht dem entspannteren *cis*-Isomer ein größer Konformationsraum zur Verfügung, weshalb sich seine Bindung an Integrin als entropisch ungünstig erweisen könnte. Daraus könnte die in dieser Arbeit nachgewiesene geringere Bindungsaffinität des *cis*-Isomers beider untersuchten Peptide resultieren (siehe Kapitel 4.3.1, Kapitel 4.4). Der deutliche Bindungsunterschied innerhalb der Peptide 1 und 2 kann nur auf die veränderte Position des Azobenzolchromophors relativ zu dem RGD-Bindungsmotiv zurückgeführt werden.

Die jeweiligen Komplexe aus den Isomeren der Peptide 1 und 2 mit der Bindungstasche des Integrin $\alpha_v\beta_3$ sind in Abb. 4-26 als Strukturmodelle in ihrer jeweiligen sterisch und konformationell bevorzugten Position dargestellt. Bei der Modellierung wurde jeweils die RGD-Sequenz als bindend angenommen.



Peptid 1 trans (pink) und cis (violett)

Peptid 2 trans (hellblau) und cis (dunkelblau)

Abb. 4-26: Vergleich der Bindung der untersuchten Peptidisomere an die Bindungstasche des Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Milbradt 2005). Die Bindungstasche des Integrins ist dunkelgrün, der AMPB-Chromophor orangefarben und die Metallionen der Metallion-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS) gelb dargestellt. Die Schleifen der Peptidrückgrade sind pinkfarben (Peptid 1 trans), violett (Peptid 1 cis), hellblau (Peptid 2 trans) bzw. dunkelblau (Peptid 2 cis) eingefärbt.

Die räumliche Orientierung des RGD-Motivs entspricht dessen Anordnung in der Röntgenstruktur von Xiong et al., weshalb die Peptide 1 und 2 wahrscheinlich in der gleichen Art und Weise wie das beschriebene Peptid $c[\text{Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val}]$ an Integrin binden. Der Azobenzolchromophor befindet sich unabhängig von der Isomerisierung oder der Peptidsequenz in der jeweils gleichen Orientierung (siehe Abb. 4-26). Die jeweiligen Aminosäurereste tragen abhängig von den isomeren Zuständen und den unterschiedlichen Sequenzen unterschiedlich stark zu der Bindung bei, wobei ein Unterschied von bis zu 34 kJ mol^{-1} bestehen kann (Milbradt 2005). Die Gesamtenergie ist jedoch für die beiden Isomere beider Peptide ähnlich, wenn die jeweiligen Aminosäurereste unabhängig von ihren Positionen innerhalb der Sequenz betrachtet werden. Der Chromophor weist trotz den unterschiedlichen Isomerisierungsstadien und Sequenzpositionen nur geringe Veränderungen um $\pm 7 \text{ kJ mol}^{-1}$ auf (Milbradt 2005). Obwohl die modellierten Bindungszustände von Peptid 1 und 2 jeweils ähnliche Positionen für die RGD-Sequenz und den AMPB-Chromophor aufweisen, resultieren ihre konformellen Unterschiede in einer experimentell deutlich voneinander abweichenden Affinität für die Bindung an Integrin $\alpha_v\beta_3$. Die anhand dieser Arbeit entstandenen Daten ermöglichen ein besseres Verstehen der molekularen Grundlagen einer selektiven Interaktion von Integrin $\alpha_v\beta_3$ an Liganden mit dem RGD-Motiv. Diese Information kann beispielsweise für das Erstellen von Liganden mit optimaler Integrinbindung verwendet werden.

4.7.3 Optimierte Photomodulation mit einem Peptid 3

In dieser Arbeit wird anhand der zyklischen RGD-Peptide 1 und 2, welche jeweils einen Azobenzolchromophor zur Photoschaltung aufweisen, eine von dem jeweiligen Isomerisierungszustand abhängige Bindungsaffinität an natives Integrin $\alpha_V\beta_3$ nachgewiesen. Innerhalb der Isomere eines Peptids kann bei dem *trans*-Isomer des Peptids 1 eine zu dem Faktor 1.33 bzw. bei dem *trans*-Isomer des Peptids 2 eine zu dem Faktor 2.40 höhere Bindungsaffinität als bei den jeweiligen *cis*-Isomeren gezeigt werden. Die Gesamtbindungsaffinität des Peptids 2 ist allerdings zu niedrig, um dessen mögliche Ablösung durch die Photoschaltung detektieren zu können. Daher wurde, ausgehend von den Ergebnissen der Bindungsexperimente mit Peptid 1 und Peptid 2, bereits ein weiteres photoisomerisierbares Peptid modelliert. Dieses optimierte Peptid, welches im Folgenden als Peptid 3 bezeichnet wird (siehe *Abb. 4-27*), vereinigt die Eigenschaften einer starken Integrinbindung mit einem großen Unterschied in der Konformation beider Isomere (Milbradt 2005).

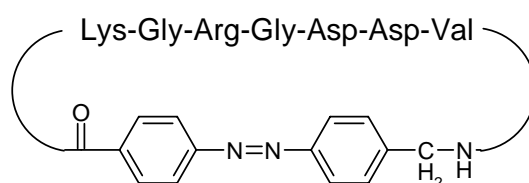
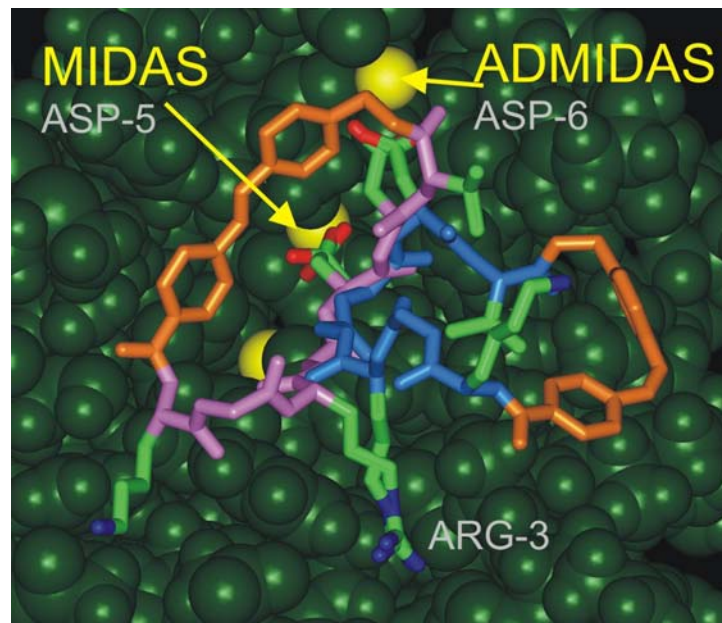


Abb. 4-27: Peptid 3, welches eine optimierte Peptidsequenz für die Bindung an Integrin $\alpha_V\beta_3$ enthält (Milbradt 2005).

Im Vergleich zu Peptid 1 (siehe *Abb. 4-1*) ist in Peptid 3 das Alanin durch Glycin substituiert (Position 2 in *Abb. 4-27*), wodurch eine flexiblere Anpassung des Peptidliganden an die Bindungsfläche des Integrins möglich wird. Gleichzeitig wird durch das Wegfallen der hydrophoben Methylgruppe des Alanins, die in Peptid 1 dem Lösungsmittel zugewandt ist, eine höhere Bindungsenergie erreicht. Aus dem gleichen Grund ermöglicht das Ersetzen des Phenylalanins durch Asparagin (Position 6 in *Abb. 4-27*), daß dem Peptid 3 mit dem daraus gebildeten Bindungsmotif RGDD zwei Aspartatreste zur Bindung sowohl an die MIDAS- als auch an die ADMIDAS (zusätzliche MIDAS)-Region zur Verfügung stehen. Aufgrund dieser verstärkten Bindung kann für das Peptid 3 eine zu 280 kJ mol^{-1} höhere Bindungsenergie im Vergleich zu Peptid 1 berechnet werden (Milbradt 2005).

Diese höhere Bindungsaffinität von Peptid 3 würde eine Detektion durch stärkere Fluoreszenzsignale erleichtern. Allerdings wäre eine Ablösung des an Integrin gebundenen Liganden langwieriger (vgl. *Kapitel 4.3.3*). Daher könnten möglicherweise nur zwei Bindungsmessungen, nämlich die jeweils eines *cis*- und eines *trans*- Isomers, auf einer identischen Membran durchgeführt werden. Eine statistische Auswertung an mehreren Membranen (vgl. *Kapitel 4.4*) könnte die Aussage dieser Bindungsmessungen bestätigen.

Die Integrinbindungen des *cis*- und *trans*-Isomers des optimierten photomodulierbaren Liganden Peptid 3 unterscheiden sich im Modell deutlich (siehe *Abb. 4-28*). Daraus kann vermutet werden, daß auch die Bindungsaffinitäten der jeweiligen Isomere signifikant voneinander abweichen. Welches Isomer jedoch die höhere Bindungsaffinität aufweist, kann nur experimentell überprüft werden. Da in den bisherigen Messungen jeweils das *trans*-Isomer der Peptide 1 und 2 eine höhere Bindungsaffinität erreicht (siehe *Kapitel 4.3.1*, (Milbradt 2005)), ist anzunehmen, daß auch das *trans*-Isomer des Peptids 3 stärker als das *cis*-Isomer bindet.



*Abb. 4-28: Modellierter Struktur des Bindungskomplexes von Peptid 3 mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Milbradt 2005). Das Peptidrückgrat des *cis*-Isomers ist blau, das des *trans*-Isomers pinkfarben dargestellt. Die Metallion-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS) sowie die zusätzliche zweite MIDAS (ADMIDAS) sind mit Pfeilen gekennzeichnet.*

Idealerweise unterscheiden sich die Bindungsaffinitäten der beiden Isomere von Peptid 3 in einer Stärke, die bei Belichtung des Komplexes eine Ablösung des Peptids bewirkt.

In *Kapitel 4.3.5* wird die Hypothese eines irreversiblen Funktionsverlusts des Integrins durch eine während der Belichtung auftretende Photooxidation aufgestellt. Diesem Prozeß könnte zunächst durch die Verwendung kürzerer Belichtungszeiten auf die Integrin-funktionalisierte Membran entgegengewirkt werden. Die Photoisomerisierung von Peptid 1 ist bereits nach 10 Sekunden beinahe abgeschlossen (siehe *Abb. 4-3*). Ob diese Zeitspanne die Funktionalität der Integrinmoleküle beeinflusst, könnte experimentell leicht nachgeprüft werden, indem die Integrin-funktionalisierte Membran für 10 Sekunden belichtet und anschließend eine Bindungsmessung mit dem Peptid 1-*trans*-Isomer durchgeführt wird.

Wie aus *Abb. 4-5* deutlich wird, kann das an den Fluorophor Cy5 gekoppelte Peptid 1 im Vergleich zu Peptid 1 nur zu etwa 20% photoisomerisiert werden. Eine verbesserte

Isomerisierung von Peptid 1-Cy5 könnte aber durch die Abtrennung der ungebundenen Fluorophormoleküle erreicht werden, welche hauptsächlich an der Störung der Photoisomerisierung des fluorophormarkierten Liganden beteiligt sind. Der erwartete starke Verlust an Liganden durch die Abtrennungsprozedur könnte dann durch eine erhöhte Peptidsynthese ausgeglichen werden. Die anhand von Peptid 3 erreichte Photoschaltung einer Integrinbindung *in situ* wäre dann nicht nur für die Grundlagenforschung an der Konformation des Bindungsmotifs interessant, sondern würde sich auch als Werkzeug für die photoschaltbare An- oder Ablösung von lebenden Zellen auf strukturierten Oberflächen eignen, wie sie im folgenden Kapitel diskutiert wird.

4.7.4 Photoschaltung der Adhäsion von lebenden Zellen

Eine photoschaltbare Adhäsion von lebenden Zellen wäre zunächst durch die Verwendung einer Zelllinie denkbar, die hauptsächlich über das RGD-Motif adhärert. Eine geeignete Zelllinie wäre z.B. die nicht-adhärente humane Zelllinie K562, die nur wenig eigene Integrinexpression aufweist und dabei kein α_V -Integrin exprimiert (Blystone 1994), (Blystone 1997). Durch eine heterologe Expression von Integrin $\alpha_V\beta_3$ können adhärente K562-Zellen generiert werden, die ein Modell für die exklusive Analyse von Integrin $\alpha_V\beta_3$ -Interaktionen *in vivo* darstellen (Boettiger 2001). Mit diesen sogenannten $K_{\alpha_V\beta_3}$ -Zellen (Boettiger 2001) könnte auf einer mit Peptid 3 (siehe Kapitel 4.7.2) beschichteten Oberfläche eine Photoschaltung der Zelladhäsion *in vivo* gelingen (siehe Abb. 4-29).

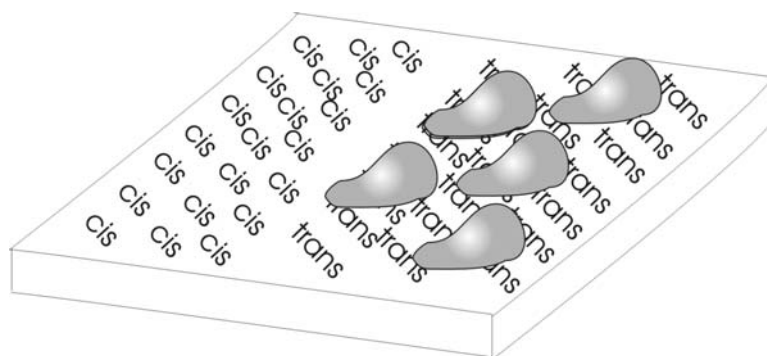


Abb. 4-29: Modellvorstellung der Photoschaltung der Adhäsion lebender Zellen.

Als Vorexperiment wäre die in Abb. 4-29 gezeigte Beschichtung der Oberfläche zu einer Hälfte mit Peptid 3-*cis*-Isomer und zur anderen Hälfte mit Peptid 3-*trans*-Isomer denkbar. Sollte, wie im vorherigen Kapitel dargestellt ist, das *trans*-Isomers eine sehr viel größere Bindungsaffinität als das *cis*-Isomers aufweisen, dann würden die $K_{\alpha_V\beta_3}$ -Zellen nach einer Inkubationszeit hauptsächlich auf der mit dem *trans*-Isomer beschichteten Fläche adhäreren. Aufgrund der fehlenden Störung durch Fluorophore wie Cy5 würde eine Belichtung von weniger als 10 Sekunden ausreichen, um die Beschichtung mit Peptid 3 zu isomerisieren.

Sofern diese Belichtungszeit den $K_{\alpha_v\beta_3}$ -Zellen keinen meßbaren Schaden durch Photooxidation zufügt, könnten dann Adhäsions- bzw. Deadhäsionsvorgänge *in vivo* beobachtet werden. Ein Gelingen dieses Experiments könnte für ein *in vivo*-Modell der Zelladhäsion genutzt werden, bei dem die aus artifiziellen Modellsystemen präzise analysierten Wechselwirkungen zwischen Integrinmolekülen und physiologischen Liganden in den komplexen Kontext lebender Zellen gesetzt werden. Damit könnte die Dynamik von Adhäsionsprozessen unter verschiedenen Versuchsbedingungen in Echtzeit dreidimensional und systematisch analysiert werden.

Die daraus gewonnenen Erkenntnisse könnten wertvolle Informationen für das bessere Verständnis der Bewegungen von Zellen liefern und beispielweise die Entwicklung hochspezifischer Inhibitoren von metastasierenden Zellen ermöglichen. Detaillierte Angaben über eine kontrollierte, spezifische Interaktion lebender Zellen mit Substraten könnten auch zur verbesserten Annahme von Implantaten oder Prothesen beitragen.

5 Zeitaufgelöste Detektion der Expression von Rinderrhodopsin in lebenden Zellen

Die genaue Funktion eines Proteins hängt entscheidend von den Bedingungen in seiner Umgebung ab (Michnick 2004). In ihrem natürlichem Umfeld sind Membranproteine der konstanten Veränderung der Membransysteme lebender Zellen ausgesetzt, welche sich in ihrer Zusammensetzung, Fluidität und Größe den jeweiligen Zyklen und Aktivitäten der Zelle anpassen (Verma 2005). Um die Dynamik von Membranproteinen in ihrem komplexen Umfeld analysieren zu können, sind daher Untersuchungen an lebenden Zellen von großer Bedeutung (Bledi 2003), (Shav-Tal 2004), (Bunt 2004). Dabei wird *in vivo* eine deutlich veränderte Aktivität von Membranproteinen im Vergleich zu rekonstituierten Systemen nachgewiesen (Fierens 2002), (Claasen 2005).

Bisher werden lebende Zellen vor allem mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Sullivan 1999), (Halbhuber 2003), (Smith 2004), wobei allerdings zellschädigende Photooxidationsprozesse zu Artefakten in den Ergebnissen führen können (Tyrrell 1990), (König 1996), (König 2000). Als alternatives Verfahren wird in dieser Arbeit erstmals die Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) an lebenden Zellen angewendet, wobei eine für die meisten biologischen Materialien zerstörungsfreie Lichtintensität von 0.8 mW benutzt wird. Dabei kann die Expression von Rinderrhodopsin als Modellmembranprotein spezifisch nachgewiesen werden. Anhand einer zeitaufgelösten Detektion der Rinderrhodopsinexpression kann die Sensitivität der verwendeten SPFS demonstriert werden. Diese *in vivo*-Detektion mittels SPFS bietet daher ein vielversprechendes Potential für die dynamische Analyse von Membranproteinen in lebenden Zellen.

5.1 Zeitaufgelöste Detektion der Rinderrhodopsin-expression in lebenden Zellen mit SPFS

5.1.1 Idee und Vorbereitung des Experiments

Das Prinzip der SPFS basiert auf der Anregung von Oberflächenplasmonen an einer Grenzfläche zwischen Wasser und einem Goldfilm (siehe *Kapitel 3*). Das dabei erzeugte

exponentiell abfallende elektromagnetische Feld bewirkt eine Fluoreszenzverstärkung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche sich innerhalb der Reichweite $\frac{1}{e}$ dieses Felds befinden. Wenn auf dem Goldfilm lebende Zellen kultiviert werden, dann befindet sich nur deren basale Membran innerhalb des evaneszenten Feldes, während das Zellinnere unberührt bleibt (siehe *Abb. 5-1*). Die heterologe Expression von Rinderrhodopsin kann in diesen Zellen, welche keine eigene Rhodopsinexpression aufweisen, mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper detektiert werden. Diese Detektion wird durch die Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an Rinderrhodopsinmoleküle in der Plasmamembran der nicht-konfluent wachsenden Zellen ermöglicht. Dabei wird ausschließlich die Fluoreszenz von denjenigen Antikörpern verstärkt, welche an Rinderrhodopsin in der basalen Membran gebunden sind, wodurch eine Detektion von Fluoreszenzsignalen möglich ist. In dieser Arbeit werden monoklonale Antikörper gegen den VSV-Tag[‡] des Rinderrhodopsins aufgrund ihrer hohen Spezifität sowie mit dem Fluorophor Alexa konjugierte sekundäre anti-Maus-Antikörper verwendet.

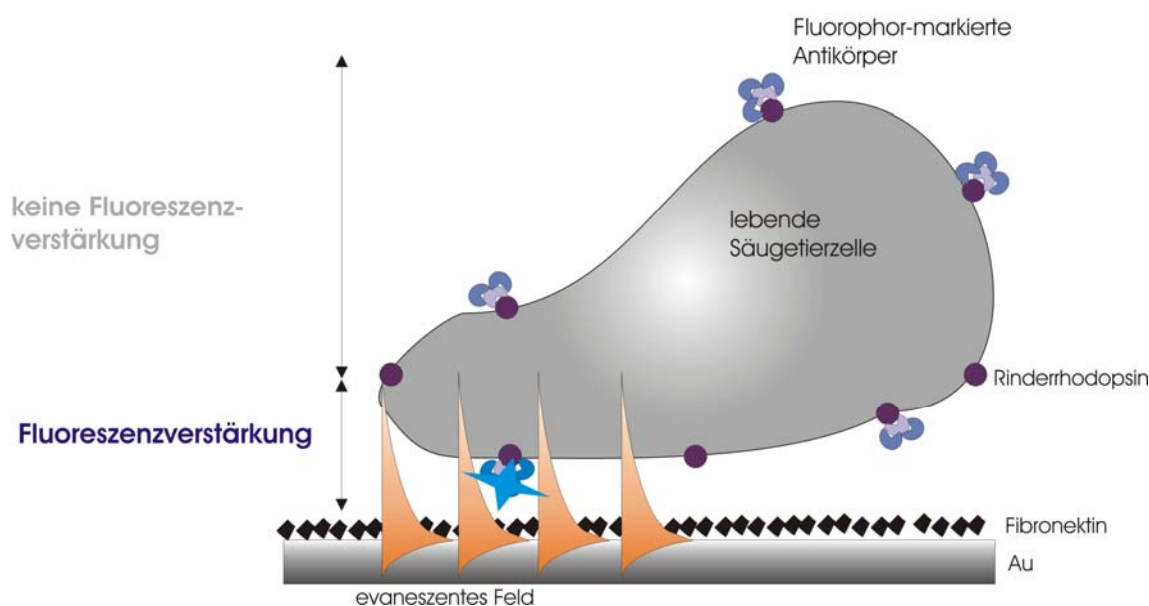


Abb. 5-1: Schema der Detektion von Rhodopsin in einer lebenden Zelle mit SPFS. Die Rhodopsinmoleküle in der basalen Zellmembran werden mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper detektiert, deren Fluoreszenz innerhalb des von Oberflächenplasmonen erzeugten evaneszenten Felds (orangefarben dargestellt) verstärkt wird.

Ein Startpunkt der zeitaufgelösten Detektion der Rhodopsinexpression wird dabei durch die Verwendung des Semliki-Forest-Virus-Expressionssystems (SFV-System, siehe *Kapitel 2.5.3*, (Liljestrom 1991), (Lundstrom 2003)) ermöglicht. Mit diesem SFV-System werden Viren generiert, welche mittels einer Infektion der BHK-Zellen als Vektoren für die

[‡] Epitop aus dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV).

Übertragung des Rinderrhodopsin-Transkripts fungieren. Da die Verschmelzung der SFV-Partikel mit der Plasmamembran innerhalb weniger Sekunden erfolgt (Wahlberg 1992), kann der Zeitpunkt der Infektion als Beginn der heterologen Expression des Rhodopsins in den zeitaufgelösten Messungen gesetzt werden. Mit fortlaufender Expressionszeit binden zusätzliche Antikörper an neu exprimierte Rhodopsinmoleküle, und es werden stärkere spezifische Signale detektiert (siehe *Abb. 5-2*).

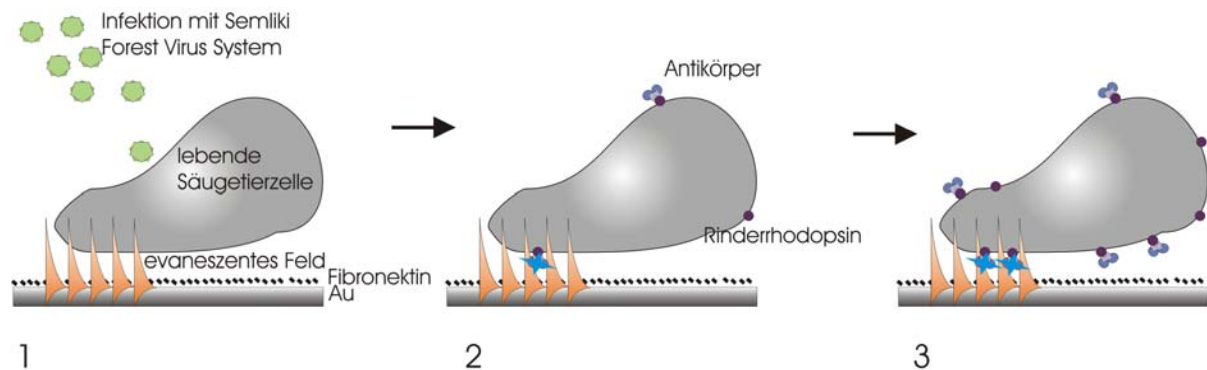


Abb. 5-2: Schema der zeitabhängigen Detektion von Rhodopsin in einer lebenden Zelle mit SPFS. Die auf einer Goldoberfläche wachsende Zelle wird mit dem SFV-System infiziert, woraufhin sie mit der Expression von Rhodopsin beginnt (1). In der Adhäsionsmembran integrierte Rhodopsinmoleküle können mittels SPFS detektiert werden (2). Mit zunehmender Expressionszeit wird eine größere Anzahl an Fluoreszenzsignalen gemessen (3).

5.1.1.1 Expression von Rhodopsin

Charakterisierung des RNA-Transkripts

Das zur Expression des Rhodopsins verwendete SFV-System besteht aus zwei Plasmiden, um eine ungewollte Infektion oder Replikation der viralen Partikel zu vermeiden (siehe *Kapitel 2.5.3*). Das Expressionsplasmid kodiert dabei für Rhodopsin, während das Helfer 2-Plasmid die Informationen für die strukturellen Proteine des Virus trägt. Für die Expression werden *in vitro* die RNA-Transkripte beider Plasmide generiert und anschließend in BHK-Zellen elektroporiert. Vor der Transfektion werden die Transkripte analysiert, um ihre Vollständigkeit zu überprüfen. *Abb. 5-3* zeigt exemplarisch ein Formaldehyd-Agarosegel, auf dem die Ansätze der *in vitro*-Transkripte der verwendeten SFV-Plasmide aufgetrennt sind. Als Kontrolle ist zusätzlich RNA aus P19-Zellen aufgetragen.

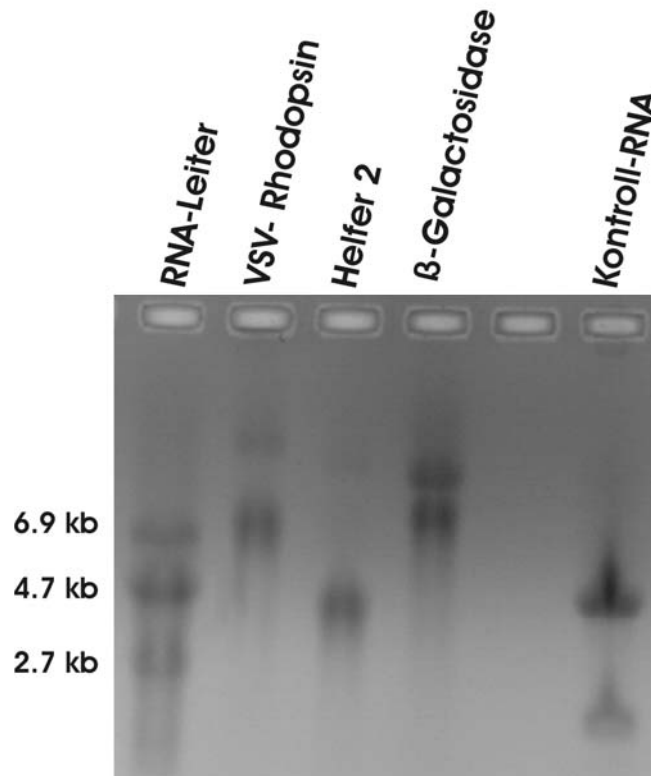


Abb. 5-3: Exemplarisches RNA-Gel mit aufgetragenen pSFV-Transkripten.

Die Proben werden auf dem Gel in jeweils zwei Banden aufgetrennt, von denen die größere dem Plasmid und die kleinere dem RNA-Transkript entspricht. Aus dem RNA-Gel werden die jeweiligen Transkriptlängen von jeweils 7 kb, 4 kb und 8 kb für VSV-Rhodopsin, Helfer 2 und β-Galaktosidase ermittelt. Dagegen kann aus den Plasmidkarten eine jeweilige Transkriptlänge von 9.9 kb, 5.8 kb und 11.8 kb errechnet werden (siehe Abb. 5-4).

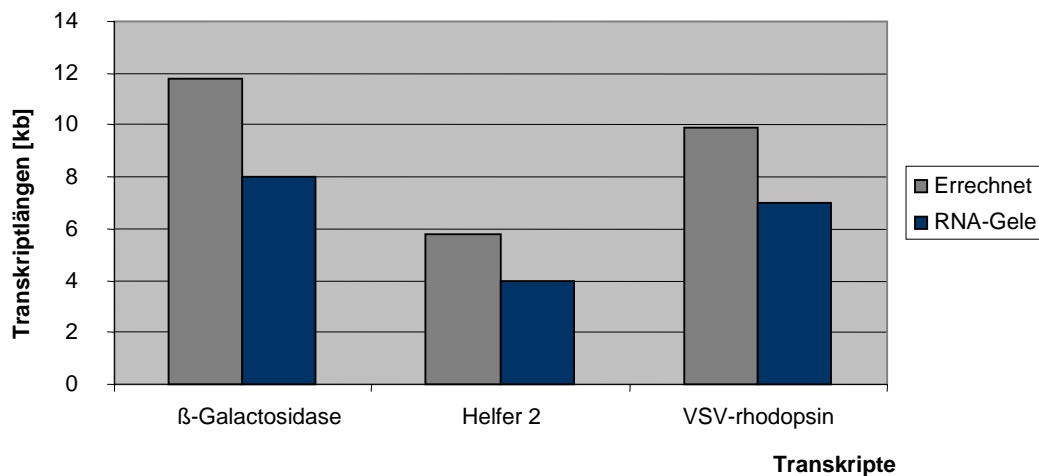


Abb. 5-4: Beobachteter Unterschied in den Transkriptlängen von pSFVlacZ (β-Galaktosidase), pSFV Helfer2 und pSFVcapVSVrhodopsin (VSV-Rhodopsin).

Dieser Unterschied der beobachteten und errechneten Transkriptlängen kann nicht durch mögliche Sekundärstrukturen der RNA in den Agarose-Gelen verursacht werden, da das in den Gelen enthaltene Formaldehyd (siehe *Kapitel 2.3.4*) die Sekundärstrukturbildung verhindert (Wicks 1986). Weiterhin könnten die kürzeren Transkriptlängen in den Agarose-Gelen durch einen Transkriptionsabbruch erklärt werden. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, soll im Folgenden zunächst die vollständige Expression des Rinderrhodopsins mit dem SFV-System nachgewiesen werden.

Nachweis der vollständigen heterologen Expression von Rinderrhodopsin

Für den Nachweis der vollständigen heterologen Rhodopsinexpression wird ein Rhodopsinkonstrukt mit C-terminalem His₆-tag verwendet. Die vollständige Expression von Rinderrhodopsin in den BHK-Zellen wird spezifisch mittels Immunofluoreszenz unter Benutzung eines anti-His-Antikörpers detektiert (siehe *Abb. 5-5*). Nach der autokatalytischen Abspaltung des Cap-Proteins von VSV-Rhodopsin unterscheiden sich die beiden Konstrukte und VSV-Rhodopsin nur in der Position und Art des Tags. Daher kann aufgrund des Nachweises von vollständig exprimiertem Rhodopsin-His₆ auch die vollständige Expression von N-terminal VSV-getagtem Rhodopsin angenommen werden.

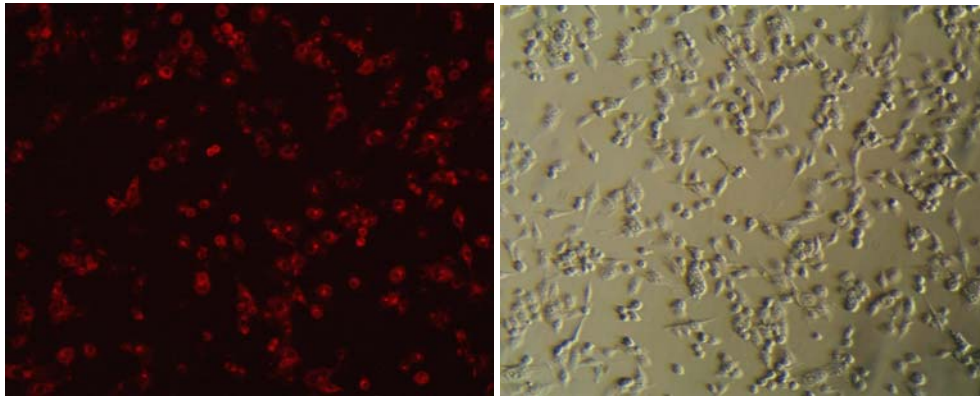


Abb. 5-5: Immunofluoreszenzfärbung (links, 100fach vergrößert) von fixierten BHK-Zellen, welche über Nacht Rinderrhodopsin mit C-terminalem His₆-tag exprimieren. Zur spezifischen Detektion unter dem Fluoreszenzmikroskop werden anti-His₅-Antikörper und anti-Maus-Cy3-konjugierter Antikörper verwendet. Rechts ist das zugehörige Transmissionsbild zu sehen.

Lokalisation der heterologen Expression von Rinderrhodopsin

Die mit dem SFV-System in BHK-Zellen exprimierten Membranproteine können im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten werden (Monastyrskaja 1999). Zu den Ursachen hierfür zählen eine inkorrekte Faltung der Proteine und ihre dadurch behinderte Bindung an die Transportproteine des ERs. Die falsch gefalteten Proteine können daraufhin aggregieren und abgebaut werden (Lu 2003). In Aufnahmen eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops ist allerdings keine Unterscheidung möglich, ob sich ein mittels

Immunofluoreszenz gefärbtes Protein in der Plasmamembran oder in dem an die Plasmamembran angrenzenden ER befindet. Daher wird im Folgenden der Expressionsort des Rinderrhodopsins in BHK-Zellen experimentell ermittelt, um die korrekte Lokalisation in der Plasmamembran zu überprüfen.

Hierfür werden zunächst Immunoblots von Präparationen der Plasmamembran sowohl aus P19-Zellen als auch von BHK-Zellen angefertigt. *Abb. 5-6* zeigt exemplarisch einen Immunoblot aus BHK-Zellen, bei dem ein anti-VSV-Antikörper zur Detektion verwendet wurde. Die aufgetragenen Aliquots bestehen aus dem Lysat der Zellen (1), welches in die Fraktionen der Gesamtmembranen (4) und dem Cytosol (5) aufgetrennt wird. Die Aliquots der Pellets nach dem 1. und 2. Pottern (2 und 3) dokumentieren den vollständigen mechanischen Aufschluß der Zellen. Aus der Gesamtmembranfraktion werden mittels der Methode der Zwei-Phasen-Separierung (siehe *Kapitel 2.5.5*, (Morre 2000)) die Plasmamembranen (7) abgetrennt. Die zurückbleibenden restlichen Membranfragmente sind ebenfalls aufgetragen (6).

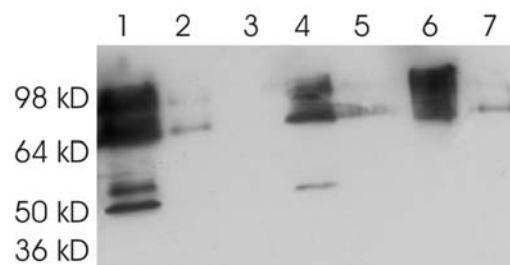


Abb. 5-6: Immunoblot einer Plasmamembranpräparation aus BHK-Zellen mit anti-VSV-Antikörper und POD-markiertem anti-Maus-Antikörper. Das VSV-Rhodopsin liegt als Aggregat vor, monomeres Rhodopsin (42.3 kD) wird nicht detektiert.

- 1) Zellysat
- 2) Pellet nach 1. Pottern
- 3) Pellet nach 2. Pottern
- 4) Gesamtmembranen
- 5) Cytosol
- 6) Fraktion der Membranen ohne die Plasmamembranen
- 7) Fraktion der Plasmamembranen

Obwohl in dem in *Abb. 5-6* gezeigten Immunoblot sämtliche Fraktionen der Plasmamembranpräparationen aufgetragen sind, kann die erwartete 42.3 kD-Bande von monomeres VSV-Rhodopsin in keinem der Aliquots erkannt werden. Dagegen werden Proteinbanden angefärbt, die einer Größe von mehr als 50 kD entsprechen. Vor allem Banden einer Größe zwischen 64 kD und 100 kD sind in den Aliquots des Zellysats, der Gesamtmembranpräparation und der Präparation von zellulären Membranen ohne die Plasmamembran sichtbar. Hier könnte es sich um Aggregate von VSV-Rhodopsin handeln, deren Solubilisierung in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wird, da der Expressionsort des Rhodopsins bestimmt werden soll.

Für eine weitere Auswertung der Immunoblots wird zunächst die korrekte Auftrennung der unterschiedlichen Membranen durch die Plasmamembranpräparation überprüft. Dazu wird ein Antikörper gegen das Plasmamembran-Markerprotein, die Ca^{2+} -ATPase der Ratte, verwendet. Mit diesem Antikörper kann allerdings kein Signal aus Plasmamembran-Präparationen von P19-Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher ist keine Verifizierung der Plasmamembran-Präparation möglich. Zur Lokalisation des heterolog exprimierten Rinderrhodopsins kann deswegen anhand von Immunoblots keine Aussage getroffen werden.

Bestimmung des Expressionsorts von Rinderrhodopsin mittels Aufnahmen des Konfokalen Laser Scanning (CLSM)-Mikroskops (Ute Reuning, Klinikum rechts der Isar)

Da anhand der Plasmamembran-Präparationen keine Bestimmung des Expressionsorts von Rinderrhodopsin möglich ist, wird dafür das konfokale Laser Scanning Mikroskop (CLSM) verwendet. Es werden sowohl Präparate fixierter BHK- als auch P19-Zellen mittels CLSM analysiert. Als Negativkontrollen dienen mittels dem SFV-System β -Galaktosidase exprimierende Zellen. Weitere Negativkontrollen sind VSV-Rhodopsin exprimierende Zellen, die nur mit jeweils dem primären Antikörper anti-VSV bzw. nur mit dem sekundären Antikörper, anti-Maus-Alexa, inkubiert werden.

Abb. 5-7 zeigt eine CLSM-Aufnahme von den fixierten P19-Zellen, die über das SFV-System Rinderrhodopsin exprimieren. Deutlich ist eine Anfärbung der Plasmamembran durch die Immunofluoreszenz erkennbar. Das heterolog exprimierte Rinderrhodopsin kann daher erfolgreich in der Plasmamembran der verwendeten Zelllinien lokalisiert werden.

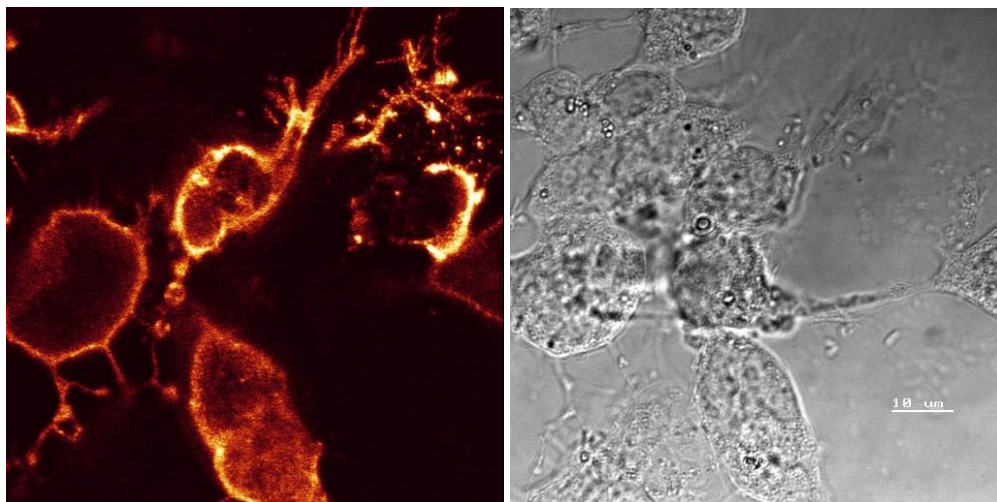
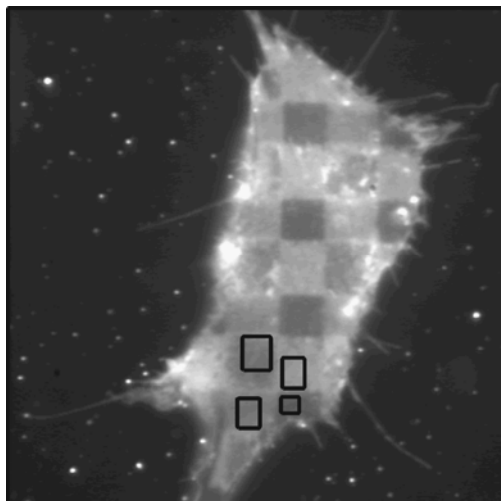


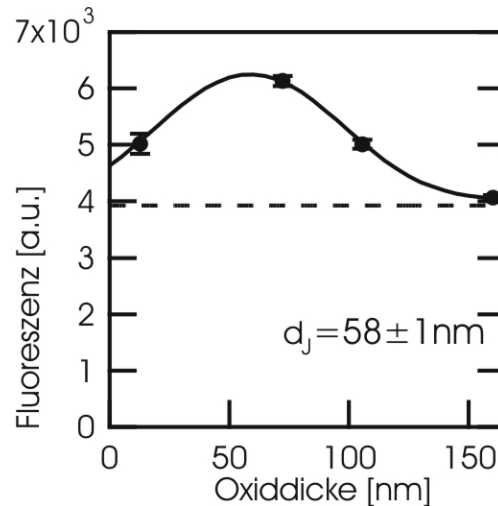
Abb. 5-7: CLSM-Aufnahme von fixierten, über Nacht Rinderrhodopsin exprimierenden P19-Zellen. Zur Immunofluoreszenz wurden anti-VSV-Antikörper und anti-Maus-Alexa konjugierter Antikörper verwendet.

5.1.1.2 Bestimmung des Abstands der Zellen zur Substratoberfläche anhand von Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (FLIC)-Messungen

Als nächstes Vorexperiment wird der genaue Abstand der Zellen zur Substratoberfläche ermittelt. Dieser je nach Zelllinie spezifische Abstand im nm-Bereich zwischen der Adhäsionsmembran und der Substratunterlage entsteht durch die von der adhärenen Zelle sezernierten Moleküle der extrazellulären Matrix (Izzard 1976), (Gleixner 2004). Für die SPFS an den Membranproteinen lebender Zellen ist diese Distanz von entscheidender Bedeutung, da die detektierbare Fluoreszenzverstärkung durch die exponentielle Abnahme des elektromagnetischen Felds nur innerhalb eines Abstands von $\frac{1}{e}$ von der Metalloberfläche stattfinden kann ((Jung 1998), siehe *Kapitel 3*). Daher wird mit Hilfe der Methode der Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (FLIC, siehe *Kapitel 2.7*) der Abstand der Adhäsionsmembran von BHK- und P19 Zellen von einer Fibronectin-beschichteten Oberfläche bestimmt. Hierfür werden die Zellen auf speziellen Silizium-Chips kultiviert, welche definierte Silizium-Oxidschichtdicken aufweisen (FLIC-Chip). Durch den Interferenzeffekt eines in der Zellmembran interkalierenden Farbstoffes vor diesen verschiedenen Schichten kann durch quantitative Auswertungen der Abstand zur Zellmembran berechnet werden (Lambacher 1996), (Lambacher 2002). In *Abb. 5-8 A* bzw. *Abb. 5-9 A* wird jeweils eine lebende BHK-bzw. P19-Zelle auf einem FLIC-Chip gezeigt. Auf diesen Chips sind die Bereiche mit vier unterschiedlichen Oxidschichtdicken (10 nm, 50 nm, 100 nm und 150 nm) deutlich erkennbar, auf denen die Zelle adhärert. Die für die FLIC-Messung ausgewählten Meßbereiche sind in den Abbildungen markiert. In *Abb. 5-8 B* bzw. *Abb. 5-9 B* ist die in diesen Meßbereichen detektierte Fluoreszenz dargestellt. Der daraus ermittelte Abstand der Zelle zur Substratunterlage beträgt bei der exemplarisch vermessenen BHK-Zelle 58 nm (siehe *Abb. 5-8 B*) und bei der exemplarisch vermessenen P19-Zelle 53 nm (siehe *Abb. 5-9 B*).

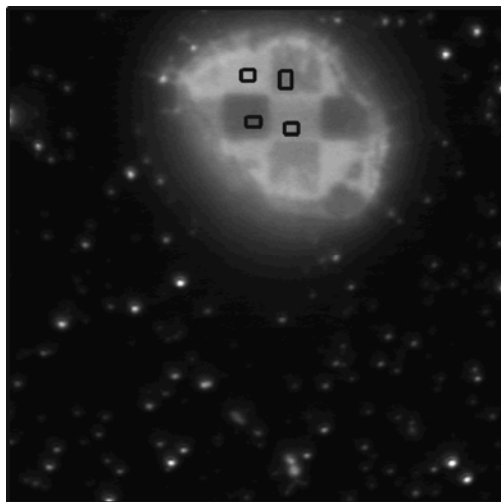


A

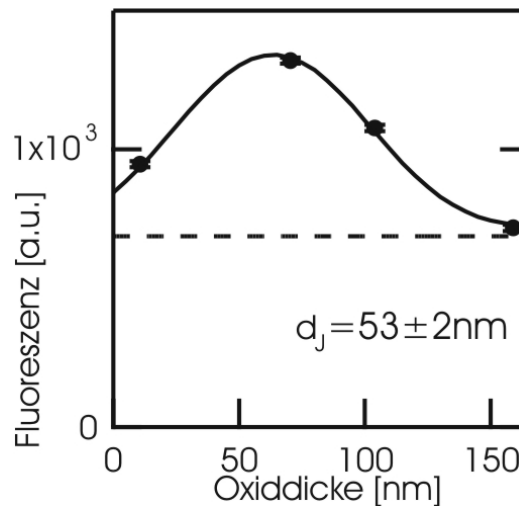


B

Abb. 5-8: Lebende BHK-Zelle auf einem FLIC-Chip aus Silizium/Siliziumoxid (A). Die unterschiedlichen Oxidschichtdicken des Chips sind im Bereich der Adhäsionsmembran der Zelle als verschieden stark fluoreszierende Rechtecke erkennbar. (B) zeigt die zugehörige exemplarische FLIC-Messung.



A



B

Abb. 5-9: Lebende P19-Zelle auf einem FLIC-Chip (A). B zeigt die zugehörige exemplarische FLIC-Messung.

Zur quantitativen Bestimmung der Distanz der Adhäsionsmembran zur Substratunterlage werden insgesamt 17 verschiedene P19-Zellen bzw. 10 verschiedene BHK-Zellen mit FLIC vermessen. Der daraus ermittelte durchschnittliche Zellabstand beträgt je nach der vermessenen Zelllinie zwischen 48 und 57 nm (siehe Abb. 5-10).

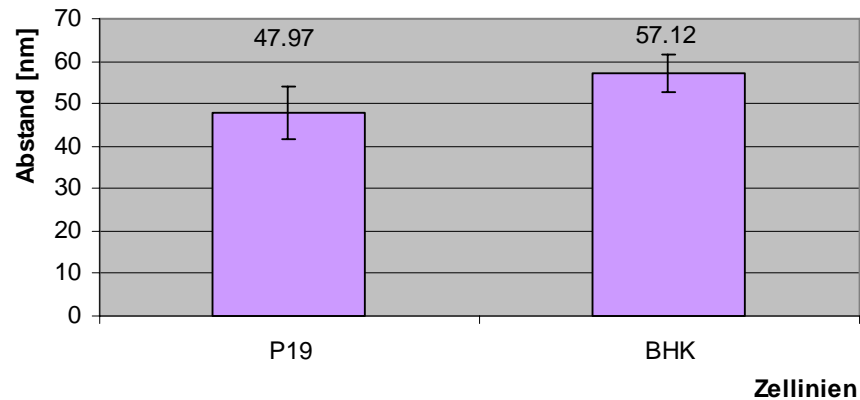


Abb. 5-10: Quantitative Auswertung der FLIC-Messungen an P19- und BHK-Zellen.

Durch die Bestimmung dieses Abstands kann die Position eines Fluorophors, welcher über die beiden Antikörper an Rhodopsin in der Adhäsionsmembran gebunden ist, abgeschätzt werden. Der hydrodynamische Radius von IgG beträgt etwa 5.5 nm (Arrio-Dupont 2000). Bei der Annahme einer dichten Packung sekundärer Antikörper um den primären Antikörper beträgt der Gesamtradius etwa das Dreifache, also 16.5 nm. Die Fluorophore der sekundären Antikörper befinden sich daher in einem Abstand von 40.5 nm bis 57 nm von der Goldoberfläche, was in *Abb. 5-11* graphisch dargestellt ist. In diesem Bereich kann eine bis zu 16fache Verstärkung der Fluoreszenzintensität durch das von Oberflächenplasmonen erzeugte evaneszente Feld erreicht werden (siehe *Kapitel 3*, (Neumann 2002)). Dadurch wird eine *in vivo* - Detektion des Rinderrhodopsins mittels SPFS möglich.

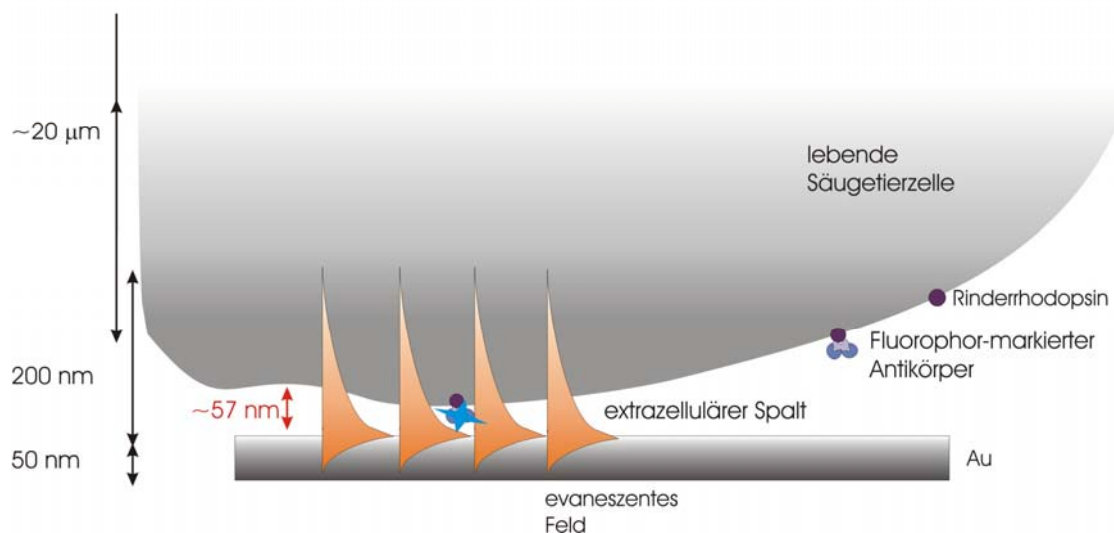


Abb. 5-11: Schema der Größenverhältnisse von SPFS an lebenden Zellen.

5.1.2 Zeitaufgelöste Detektion der Expression von Rinderrhodopsin in lebenden Zellen mit SPFS

Auf der Grundlage der Vorversuche in den vorhergehenden Kapiteln wird nun die *in vivo*-Detektion des Rinderrhodopsins experimentell gezeigt und optimiert. Durch die Aufnahme einer Zeitreihe wird der früheste Zeitpunkt ermittelt, bei dem eine Rhodopsinexpression detektiert werden kann. Für diese Zeitreihe werden zunächst verschiedene Substrate verwendet, um für jeden Zeitpunkt ein Substrat vermessen zu können. Schließlich gelingt auch die Aufnahme einer Zeitreihe auf einem einzelnen Substrat, welches zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen wird. Für alle gezeigten SPFS-Messungen werden lebende Zellen verwendet.

5.1.2.1 Kultivierung lebender Säugetierzellen auf Substraten für SPFS-Messungen

Im Folgenden wird zunächst die Kultivierung der Zellen auf dem goldbeschichteten Glassubstrat optimiert. Die Vitalität der kultivierten Zellen ist optisch durch ihre langgestreckte Form erkennbar, die auf eine Adhäsion und Proliferation der Zellen hinweist (siehe *Abb. 5-12*). Die Zellen zeigen auf den goldbeschichteten Glassubstraten eine Proliferation, die dem Wachstum in Zellkulturflaschen ähnelt.

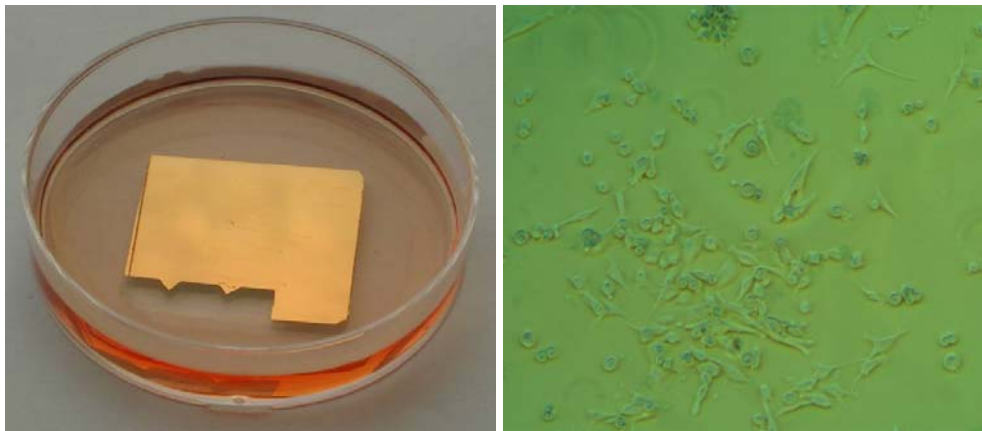


Abb. 5-12: Die Kultivierung von BHK-Zellen in Kulturmedium auf goldbeschichteten Glassubstraten. Links ist das mit Zellen bewachsene Substrat zu sehen, rechts eine 100fach vergrößerte lichtmikroskopische Aufnahme des bewachsenen Substrats.

5.1.2.2 Detektion der Rhodopsinexpression in lebenden Zellen mit SPFS

Für die *in vivo*-Detektion der Rhodopsinexpression wird ein zellbewachsenes, goldbeschichtetes Glassubstrat mit dem SFV-System infiziert. Zur *in vivo*-Detektion wird das Substrat in eine Meßzelle eingebaut (siehe *Kapitel 3, Abb. 3-6*) und der Fluoreszenzhintergrund im Kulturmedium ermittelt. Dieses Kulturmedium wird anschließend durch Medium, welches die beiden vorinkubierten Antikörper anti-VSV und anti-Maus-Alexa

enthält, ersetzt. Die eigentliche *in vivo* - Detektion erfolgt nach dem Abspülen ungebundener Antikörper mit Kulturmedium nach einer 30minütigen Inkubationszeit. Auf diese Weise können nach einer Gesamtexpressionszeit von 8 h, die auch die Inkubationszeit der Antikörper mit einbezieht, spezifische Fluoreszenzsignale von bis zu 4.5×10^4 cps gemessen werden (siehe *Abb. 5-13*).

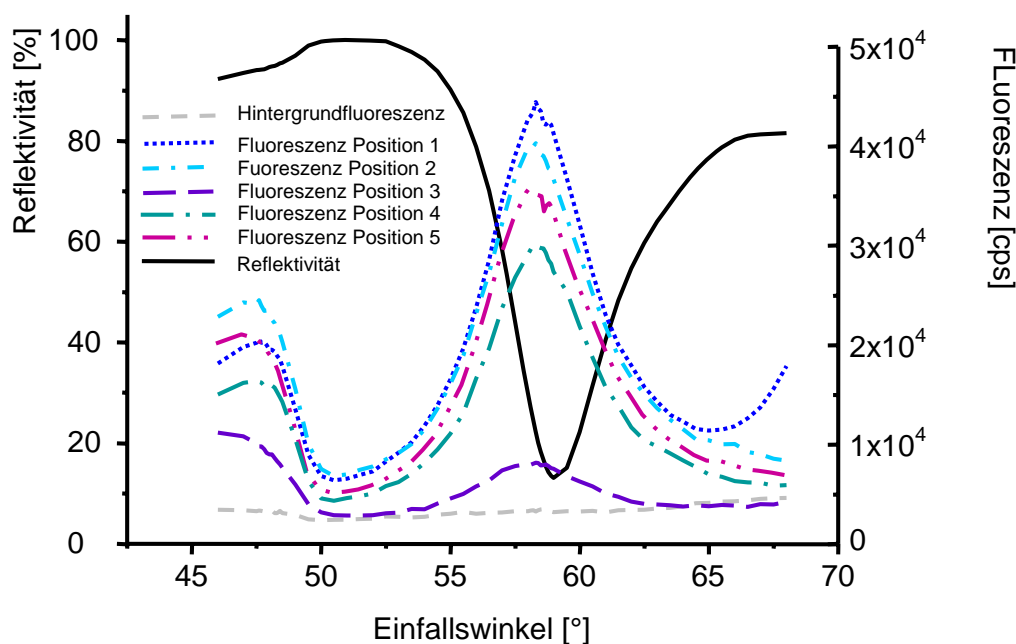


Abb. 5-13: Repräsentative SPFS-Messung, bei der Rinderrhodopsin auf einem einzelnen Substrat an verschiedenen Meßpositionen detektiert wird. Die Expressionszeit beträgt 8 h.

Wie in *Abb. 5-13* dargestellt ist, weisen die im Resonanzwinkel gemessenen Fluoreszenzsignale, die an verschiedenen Meßpositionen des zellbewachsenen Substrats vorgenommen werden, eine deutliche Heterogenität auf. Diese kann auf die unterschiedliche Verteilung der Zellen auf dem Substrat zurückgeführt werden. Für die folgenden Messungen werden daher zunächst die Parameter der Zelldichte, der Zelllinie und der Beschichtung des Substrats optimiert, um möglichst hohe und reproduzierbare Fluoreszenzsignale zu detektieren und dabei gleichzeitig den Fluoreszenzhintergrund gering zu halten.

5.1.2.3 Optimierung der Meßmethode

Die SPFS-Messungen werden zunächst sowohl mit P19- als auch mit BHK-Zellen vorgenommen. Das mit Zellen bewachsene Substrat wird in eine Meßzelle eingebaut (siehe *Kapitel 3, Abb. 3-8*). Hiervon wird der Fluoreszenzhintergrund bei $\lambda = 633$ nm bestimmt. Beide Zelllinien werden in PBS-Puffer vermessen, um einen Einfluß des unterschiedlichen Kulturmediums auf dem Fluoreszenzhintergrund zu vermeiden. Bei sonst gleichbehandelten BHK- und P19-Zellen kann ein deutlicher Unterschied des Fluoreszenzhintergrunds festgestellt werden. Einzelne repräsentative Messungen des Fluoreszenzhintergrunds BHK-

Zellen bzw. P19-Zellen auf mit Laminin beschichteten Substraten sind in *Abb. 5-14* dargestellt. Die Zellen exprimieren jeweils für 4 h heterolog Rhodopsin. Bei den Fluoreszenzmessungen der P19-Zellen (gestrichelte Linien in *Abb. 5-14*) fallen Signale im Bereich um die Einfallswinkel $\theta = 55^\circ$ und $\theta = 63^\circ$ auf. Da beide Fluoreszenzsignale sich außerhalb des Resonanzwinkels um $\theta = 58^\circ$ befinden, handelt es sich um unspezifische Hintergrundfluoreszenzsignale, welche nicht durch das evaneszente Feld des Oberflächenplasmons verstärkt werden. Diese unspezifischen Hintergrundfluoreszenzsignale der P19-Zellen in *Abb. 5-14* befinden sich in etwa in der Höhe der Fluoreszenzsignale, welche in *Abb. 5-13* mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern im Bereich des Resonanzwinkels detektiert werden. Weiterhin wird auf den mit BHK-Zellen bewachsenen Substraten (gepunktete Linien in *Abb. 5-14*) ein zu 68% geringerer Fluoreszenzhintergrund als bei den mit P19-Zellen bewachsenen Substraten detektiert. Aufgrund der hohen Hintergrundfluoreszenz der P19-Zellen wird bei allen folgenden SPFS-Messungen die BHK-Zelllinie verwendet.

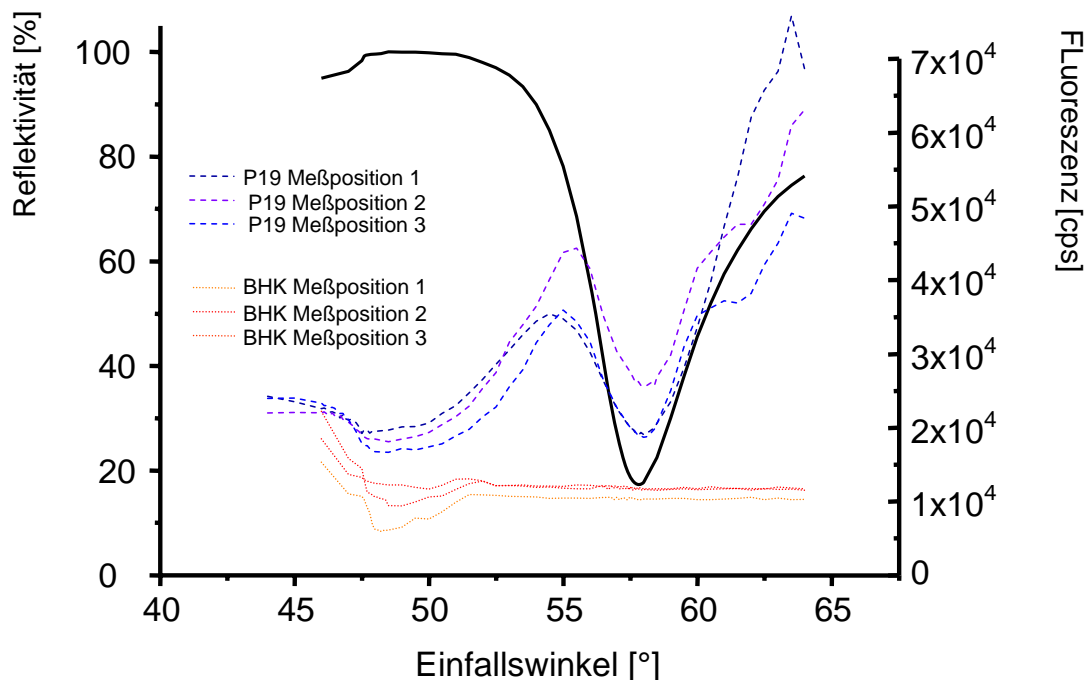


Abb. 5-14: Vergleich der Hintergrundfluoreszenzen vor der Zugabe fluoreszenzmarkierter Antikörper von BHK- bzw. P19-Zellen auf Laminin-beschichteten Substraten, welche für jeweils 4 h heterolog Rhodopsin exprimieren.

Optimierung der Zelladhäsion

Die BHK-Zellen können auf einer reinen Goldoberfläche kultiviert werden. Die für die Immunodetektion notwendigen Spülvorgänge erfordern jedoch eine starke Adhäsions-

fähigkeit der Zellen. Diese kann erhöht werden, indem die Goldoberfläche mit einem Protein aus der extrazellulären Matrix (ECM) beschichtet wird (Underwood 1993), (Carnegie 1993). *Abb. 5-15* zeigt SPFS-Messungen von gleich behandelten, VSV-Rhodopsin exprimierenden BHK-Zellen aus einer identischen Kultur, die auf unterschiedlich beschichteten Substraten wachsen.

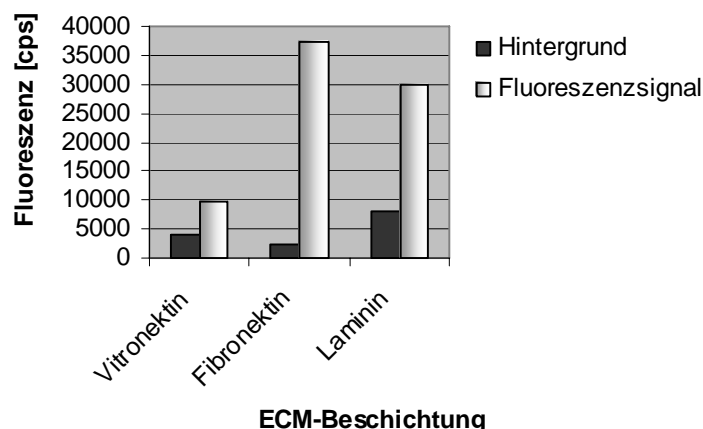


Abb. 5-15: Vergleich verschiedener extrazellulärer Matrixproteine zur Verbesserung der Zelladhäsion auf den Substraten. Jedes Substrat wird mit etwa $3,5 \times 10^5$ BHK-Zellen einer identischen Kultur angeimpft. Die SPFS-Messungen erfolgen nach Infektion mit dem SFV-System und einer Expressionszeit von etwa 6.5 h.

Im Vergleich unterschiedlicher Beschichtungen werden auf dem Fibronektin-beschichteten Substrat die geringste Hintergrundfluoreszenz und zugleich das höchste Fluoreszenzsignal detektiert. Diese voneinander abweichenden Signalstärken könnten aus einer unterschiedlichen Oberflächenstruktur der auf Vitronektin, Fibronektin und Laminin kultivierten Zellen resultieren. Es ist bekannt, daß Beschichtungen mit Laminin bzw. Fibronektin eine unterschiedliche Produktion von Proteinen der ECM in Zellkulturen hervorrufen (Underwood 1993), (Zamir 1999) und die Struktur kultivierter Zellen beeinflussen können (McAteer 2002), (Iwanaga, 2000). Der in *Abb. 5-15* beobachtete Unterschied des Fluoreszenzhintergrunds von BHK-Zellen auf verschieden beschichteten Substraten könnte daher mit einer jeweils unterschiedlichen Zellform und einer variablen Zusammensetzung der ECM erklärt werden. Weiterhin ist ein Einfluß der Beschaffenheit der ECM auf den Diffusionskoeffizienten von Immunglobulinen bekannt (Davies 2002). Daher könnte sich eine von der jeweiligen Beschichtung der Substrate beeinflusste unterschiedliche Zusammensetzung der ECM verschieden auf die Diffusion der zur Detektion verwendeten Antikörper auswirken. Dieser Effekt könnte der Abhängigkeit der Höhe der gewünschten Fluoreszenzsignale von der Beschichtung des jeweiligen Substrats zugrunde liegen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird in den Messungen der folgenden Kapitel ausschließlich Fibronektin zur Beschichtung der Substrate verwendet.

Heterogenität der Zelldichte

Die SPFS-Messung erfolgt auf einem Bereich von ungefähr 1 mm^2 . Um unterschiedliche SPFS-Messungen vergleichen zu können, ist daher die Dichte der Zellen auf dem Substrat von entscheidender Bedeutung. Zur Ermittlung der optimalen Zelldichte wird zunächst die Reproduzierbarkeit der Zelldichte von identisch behandelten Substraten untersucht. Hierfür werden Substrate mit jeweils 3×10^5 Zellen angeimpft und über Nacht inkubiert, um optimale Adhäsions- und Expressionsbedingungen zu erreichen. Für ein Animpfen mit möglichst gleicher Zellzahl werden die von der Kulturflasche abgelösten Zellen unmittelbar vor jeder Entnahme vorsichtig suspendiert, um eine ungleiche Verteilung der Zellen im Kulturmedium durch Sedimentation zu vermeiden. Die Proliferation der ausgesäten Zellen verläuft jedoch ungleichmäßig (vgl. *Abb. 5-16*). Eine Auszählung der Zelldichte an 16 identisch behandelten, mit Zellen bewachsenen Substraten unter dem Lichtmikroskop ergibt eine deutliche Heterogenität der Zelldichte. Diese Heterogenität kann daraus resultieren, daß zur Ansaat der Zellen ein relativ kleines Volumen von $500 \mu\text{l}$ auf den Fibronectin-beschichteten Goldsubstraten verwendet wird. Die Unebenheit des Kulturmediums, welches für die Adhäsion der Zellen in eine Tropfenform auf den Substraten bildet, kann zu Unregelmäßigkeiten in der Zellproliferation führen (McAteer 2002). Es ist auch bekannt, daß kultivierte Zellen unabhängig von dem Volumen ihrer Ansaat in den verwendeten runden Kulturschalen ungleichmäßig adhäreren (McAteer 2002). Ebenso kann die Proliferation der Zellen von der Position der Kulturschalen in dem Inkubator abhängen (McAteer 2002).

Mit den zur Verfügung stehenden Methoden können daher nur zellbewachsene Substrate mit einer annähernd ähnlichen Zelldichte erzeugt werden. Aus diesem Grund werden in den folgenden Messungen jeweils 10 unterschiedliche Positionen auf dem Substrat vermessen und das Ergebnis gemittelt.

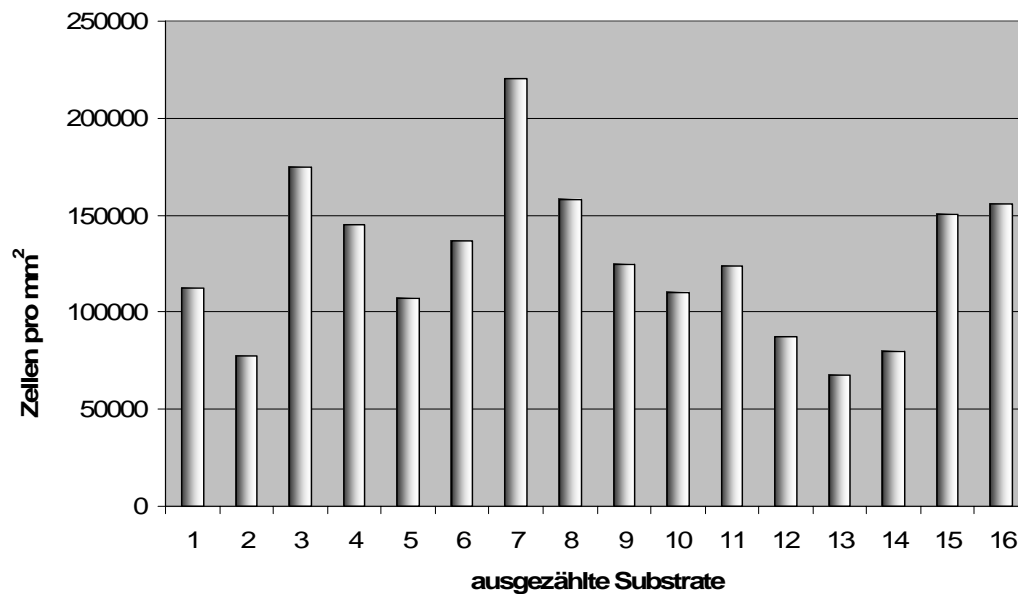


Abb. 5-16: Verteilung der BHK-Zellen auf 16 Fibronectin-beschichteten Substraten.

5.1.2.4 Zeitabhängige Meßreihe an verschiedenen Substraten

Die vorhergehenden Kapitel zeigen die erfolgreiche Detektion der Rhodopsinexpression in lebenden BHK-Zellen mit SPFS sowie die Optimierung dieser Messungen. Die hier verwendeten Expressionszeiten befinden sich im Bereich von 6 - 8 h, um genügend starke Fluoreszenzsignale zu gewährleisten. Durch die hohe Sensitivität der SPFS besteht allerdings die Möglichkeit, die Rhodopsinexpression auch zu einem früheren Zeitpunkt zu detektieren. Der Expressionszeitpunkt, an dem die erste Detektion möglich ist, wird durch das Erstellen einer zeitaufgelösten Meßreihe ermittelt.

Für jeden zu messenden Zeitpunkt wird ein Substrat mit BHK-Zellen aus einer identischen Kultur besetzt und über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgt die Infektion mit dem SFV-System, wodurch die Expression des VSV-Rhodopsins initiiert wird. Durch sorgfältiges Abziehen des virushaltigen Mediums nach einer Stunde Inkubationszeit werden nachträgliche Infektionen verhindert, so daß alle infizierten Zellen in ihrer Expressionszeit vergleichbar sind. Es wird eine Zeitreihe von 1.5 h bis 18 h Expressionszeit aufgenommen, wobei die Substrate bis zu ihrer Verwendung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert werden. Abb. 5-17 zeigt die aus jeweils 10 Einzelmessungen gemittelten Fluoreszenzsignale für jeden Zeitpunkt. Als Negativkontrollen werden nicht infizierte Zellen verwendet sowie Zellen, die mit Hilfe des SFV-Systems für 10 h β -Galaktosidase exprimieren (LacZ in Abb. 5-17).

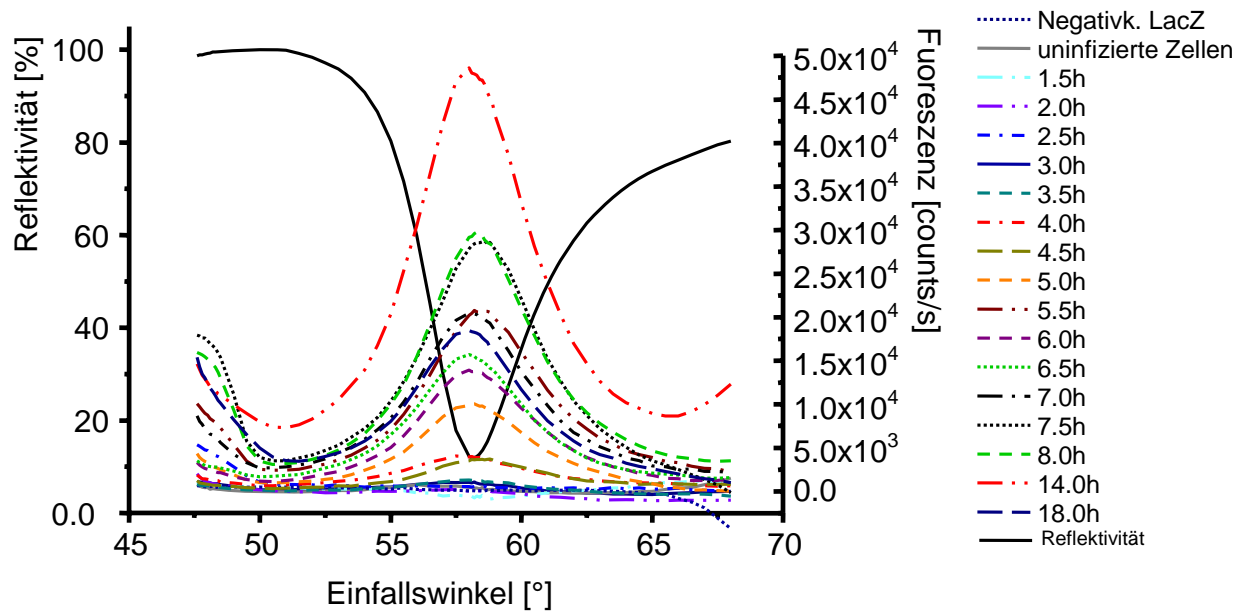


Abb. 5-17: Zusammenfassung der zeitaufgelösten SPFS-Messungen. Es werden Expressionszeiten von 1,5 bis 18 h vermessen. Als Negativkontrollen werden nicht infizierte Zellen sowie Zellen, die für 10 h β -Galaktosidase exprimieren, (LacZ) verwendet.

Zur besseren Erkennbarkeit der unterschiedlichen Werte sind die lokalen Fluoreszenzmaxima der einzelnen SPFS-Messungen aus der in *Abb. 5-17* gezeigten Zeitreihe als Diagramm dargestellt (siehe *Abb. 5-18*). Hier fällt zunächst auf, daß die beiden Negativkontrollen (nicht infizierte Zellen und für 10 h β -Galaktosidase exprimierende Zellen) keine detektierbare Fluoreszenz aufweisen. Die verwendeten Antikörper anti-VSV und anti-Maus-Alexa Fluor binden daher nicht an nicht infizierte BHK-Zellen oder BHK-Zellen, welche durch die Infektion mit dem SFV-System modifiziert worden sind. Da keine Fluoreszenzsignale detektiert werden können, kann auch ausgeschlossen werden, daß die fluoreszenzmarkierten Antikörper von den lebenden Zellen inkorporiert worden sind. Die bei den Rinderrhodopsin exprimierenden Zellen gemessenen Fluoreszenzsignale können aus diesen Gründen als spezifisch angesehen werden. Mit zunehmender Expressionszeit wird eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals detektiert, wobei der höchste gemessene Wert bei 14,0 h Expressionszeit liegt. Bei der Expressionszeit von 18,0 h wird ein schwächeres Fluoreszenzsignal als bei 14,0 h gemessen.

Weiterhin ist aus *Abb. 5-18* sichtbar, daß der Fluoreszenzhintergrund zu jedem gemessenen Zeitpunkt einen gleichbleibend niedrigen Wert behält. Daraus kann auf eine hohe Spezifität der gemessenen Fluoreszenzsignale geschlossen werden, welche aus der Bindung der mit dem Chromophor Alexa markierten Antikörper an heterolog exprimiertes Rhodopsin in der adhären Membran der BHK-Zellen resultieren.

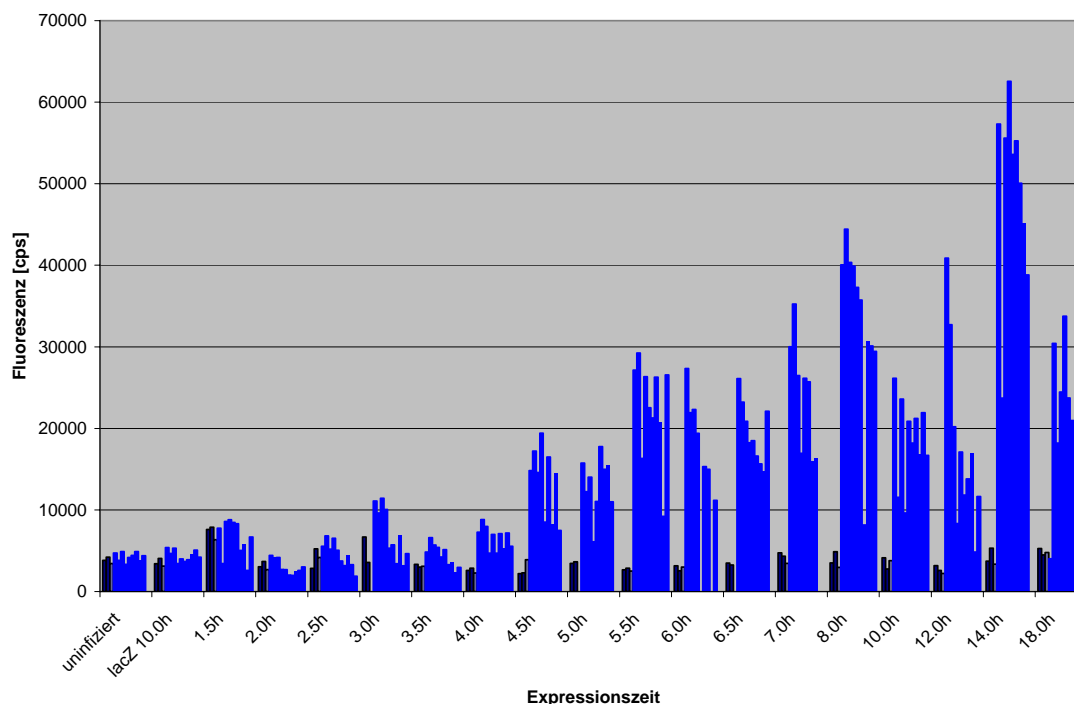


Abb. 5-18: Zusammenfassung der lokalen Fluoreszenzmaxima der zeitaufgelösten Meßreihe. Für jeden Zeitpunkt werden 10 Einzelmessungen gezeigt. Der Fluoreszenzhintergrund der einzelnen Zeitpunkte ist schwarz, die Fluoreszenzsignale blau dargestellt.

Für die einzelnen Zeitpunkte der in *Abb. 5-18* dargestellten Zeitreihe werden die Substrate jeweils an 10 unterschiedlichen Positionen vermessen. Die Fluoreszenzmessungen weisen daher innerhalb eines Zeitpunkts die bereits in *Abb. 5-16* beschriebene Heterogenität auf. Obwohl die Immunfluoreszenzsignale innerhalb jedes Meßsubstrats variieren (blau in *Abb. 5-18*), kann von allen Substraten eine ähnlich geringe Hintergrundfluoreszenz gemessen werden (schwarz in *Abb. 5-18*). Die jeweils unterschiedliche Expressionszeit wirkt sich aufgrund dieser Beobachtung nicht auf die Hintergrundfluoreszenz vor der Zugabe fluoreszenzmarkierter Antikörper aus. Anhand dieser ähnlichen Hintergrundfluoreszenz kann davon ausgegangen werden, daß die untersuchten Substrate zumindest ähnlichen äußeren Bedingungen ausgesetzt sind. Es ist daher wahrscheinlich, daß die mit SPFS gemessenen Immunfluoreszenzsignale ausschließlich von der heterologen Expression des Rhodopsins an der jeweiligen Meßposition stammen.

Um die beschriebene Heterogenität der Fluoreszenzsignale zu umgehen und allein den von der Expressionszeit abhängigen Anstieg der Fluoreszenz zu verdeutlichen, werden in *Abb. 5-19* die gemittelten Fluoreszenzmaxima abzüglich der jeweiligen gemittelten Hintergründe dargestellt.

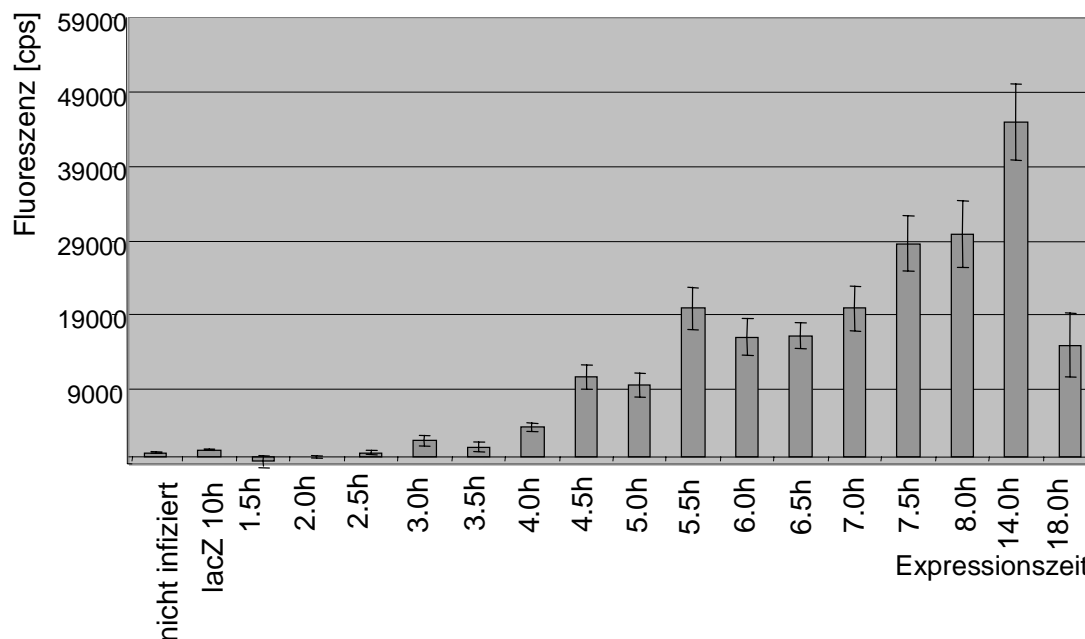


Abb. 5-19: Darstellung der zeitabhängigen SPFS-Meßreihe der Expression von Rinderrhodopsin. Jeder gezeigte Datenpunkt besteht aus zehn gemittelten Einzelmessungen. Die Hintergrundfluoreszenzen sind jeweils von den Gesamtsignalen abgezogen.

Aus Abb. 5-19 wird kann der früheste Zeitpunkt bestimmt werden, bei dem eine Detektion des Rhodopsins mit SPFS möglich ist. Ein deutlich höheres Fluoreszenzsignal als die zugehörige Hintergrundfluoreszenz wird erstmals nach einer Expressionszeit von 3.0 h gemessen. Das bei dem nachfolgenden Zeitpunkt 3.5 h post infectionem (p.i.) detektierte Signal ist geringer als bei 3.0 h. Dieses Signal überragt jedoch das Hintergrundsignal der Negativkontrollmessungen der nicht infizierten Zellen und der mit dem SFV-System infizierten, β -Galaktosidase exprimierenden Zellen. Diese Unregelmäßigkeit der Fluoreszenzsignale mit zunehmender Expressionszeit ist in der gesamten Zeitreihe sichtbar. Von Pulse-Label-Experimenten ist bekannt, daß die Gesamtproteinexpression von SFV-infizierten BHK Zellen nach etwa 12 h p.i. nicht mehr ansteigt und nach 48 h p.i. zum Erliegen kommt (K. Hölscher, pers. Kommunikation). Der Abfall der Fluoreszenz zwischen den Expressionszeitpunkten 14 h und 18 h kann daher womöglich auf ein nach 14 h p.i. eintretendes Abstoppen der Expression mit anschließendem Abbau des Rhodopsins zurückgeführt werden. Die Infektion mit dem SFV-System führt dazu, daß nach etwa 6 h p.i. die zelleigene Proteinexpression unterdrückt wird (Liljestrom 1991). Daher ist anzunehmen, daß der Abbau des Rhodopsins nach 14 h p.i. durch das Absterben der infizierten Zellen zustande kommt. Es ist auch bekannt, daß mit dem SFV-System infizierte BHK-Zellen zu dem Zeitpunkt um 80 h p.i. vollständig abgestorben sind (K. Hölscher, pers. Kommunikation). Die Analyse von BHK-Zellen, welche mit dem SFV-System infiziert sind,

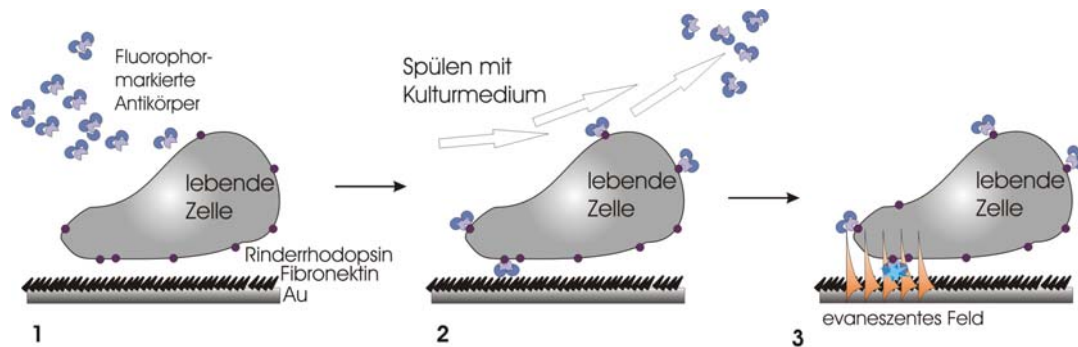
ist aus diesem Grund über länger als 2 Tage nicht möglich. Der für die Zeitreihe in dieser Arbeit verwendete Zeitraum sollte zumindest bis zu dem Zeitpunkt von 6 h p.i. nicht von Abbauprozessen beeinflusst werden.

Im allgemeinen weisen BHK-Zellen, welche mit dem SFV-System zur Produktion von Membranproteinen infiziert sind, nach 16-18 h p.i. die höchste heterologe Expression auf (Lundstrom 2003). Da in der in dieser Arbeit durchgeführten Zeitreihe bis zu dem Zeitpunkt von 14 h p.i. ein Anstieg der Fluoreszenzsignale beobachtet werden kann, besteht die Möglichkeit, daß die heterologe Expression von Rhodopsin bis zu diesem Zeitpunkt keinen Abbauprozessen unterliegt oder davon nicht maßgeblich beeinflusst wird.

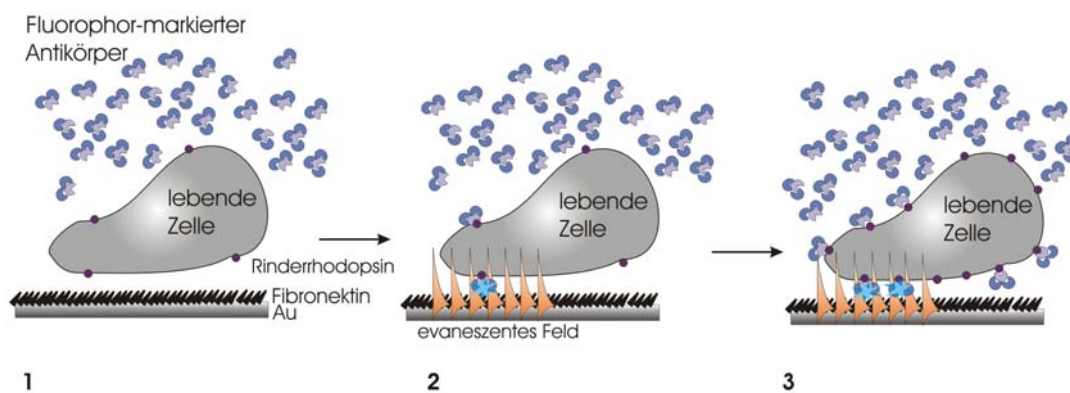
5.1.2.5 Zeitaufgelöste Meßreihe an einem individuellen Substrat

Im vorhergehenden Kapitel wird die erfolgreiche Detektion der Rhodopsinexpression an lebenden Zellen mit SPFS anhand einer Zeitreihe mit jeweils einem zellbewachsenen Substrat pro Meßzeitpunkt gezeigt. Für die in *Abb. 5-19* dargestellte Messung wurden daher insgesamt 18 mit BHK-Zellen bewachsene Substrate benötigt, die unter möglichst identischen Bedingungen kultiviert wurden. Allein die Verwendung mehrerer Substrate kann aber bereits zu geringfügigen Unterschieden in der genauen Beschaffenheit des Glassubstrats, der Beschichtung mit Fibronectin oder der Zelldichte führen, weshalb in *Abb. 5-19* die jeweiligen Mittelwerte aufgeführt sind. Die Variation der Reaktionen der Zellen innerhalb einer geklonten Zellpopulation könnte durch diese geringfügigen Unterschiede in ihrer Umgebung beeinflusst werden (Brehm-Stecher 2004). Aus diesem Grund bietet eine Detektion der Rhodopsinexpression einer identischen Zellpopulation auf einem individuellen, mit BHK-Zellen bewachsenen Substrat zu mehreren Zeitpunkten einen besseren Vergleich der an den Zeitpunkten aufgenommenen Daten.

Im Folgenden wird gezeigt, daß eine Zeitreihe auch auf einem individuellen, mit lebenden BHK-Zellen bewachsenen Substrat aufgenommen werden kann. Hierfür wird zunächst die Meßmethode verändert, damit SPFS-Messungen mit einer identischen Antikörperkonzentration auf dem Substrat ermöglicht werden. Die Zugabe und das Abspülen von Antikörpern zu jedem Meßzeitpunkt wäre bei der Zeitreihe auf einem individuellen Substrat zwar möglich, allerdings kann nicht verhindert werden, daß sich eine durch jeden Spülvorgang eine geringe Zahl der Zellen ablöst. Weiterhin ist nicht bekannt, inwiefern durch das verhältnismäßig sanfte Spülen jegliche Antikörper entfernt werden. Die Verwendung einer Meßmethode ohne Spülvorgänge garantiert gleichzeitig die Konstanz der Antikörperkonzentration und der Zellzahl. Die Unterschiede der Meßmethoden der Zeitreihen an mehreren bzw. einem einzelnen mit lebenden BHK-Zellen bewachsenen Substrat sind in *Abb. 5-20* graphisch dargestellt.



A) SPFS-Messungen auf verschiedenen Substraten



B) SPFS-Messungen auf einem einzigen Substrat

Abb. 5-20: Vergleich der verwendeten SPFS-Meßmethoden an lebenden Zellen.

Bei Messungen auf verschiedenen, mit lebenden Zellen bewachsenen Substraten (siehe *Abb. 5-20 A*) wird der Fluoreszenzhintergrund detektiert, fluoreszenzmarkierte Antikörper auf die lebenden Zellen gegeben (1) und nicht gebundene Antikörper nach einer Inkubationszeit abgespült (2). Anschließend erfolgen die eigentlichen SPFS-Messungen (3). Diese Prozedur wird zu jedem Zeitpunkt mit einem neuen, mit lebenden Zellen bewachsenen Substrat wiederholt. Bei der Aufnahme einer Zeitreihe an einem einzelnen Substrat (siehe *Abb. 5-20 B*) erfolgt die SPFS-Messung nach der Inkubationszeit (1) mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ohne Abspülen. Hierbei wird zwar nur die Fluoreszenz derjenigen Antikörper verstärkt, die sich innerhalb des evaneszenten Feldes befinden (2). Durch die ungebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper, welche sich innerhalb des evaneszenten Feldes des Oberflächenplasmons befinden, wird allerdings eine höhere Gesamtfluoreszenz gemessen. Diese Gesamtfluoreszenz kann schwächere spezifische Fluoreszenzsignale überlagern, weshalb für die Messungen in *Abb. 5-20 B* eine geringere Antikörperkonzentration als für die Messungen in *Abb. 5-20 A* gewählt wird. Eine fortschreitende Expressionszeit ermöglicht die

Bindung einer größeren Anzahl der Antikörper an Rhodopsin innerhalb des evaneszenten Feldes, woraufhin stärkere Fluoreszenzsignale detektiert werden (3).

Eine solche Zeitreihe an einem zellbewachsenen Substrat ist exemplarisch in *Abb. 5-21* gezeigt. Es wird die Expressionszeit von 2.5 h bis 7.5 h in sechs Meßpunkten dargestellt. Diese Meßpunkte bestehen aus jeweils 3 gemittelten Meßsignalen auf einem identischen Substrat.

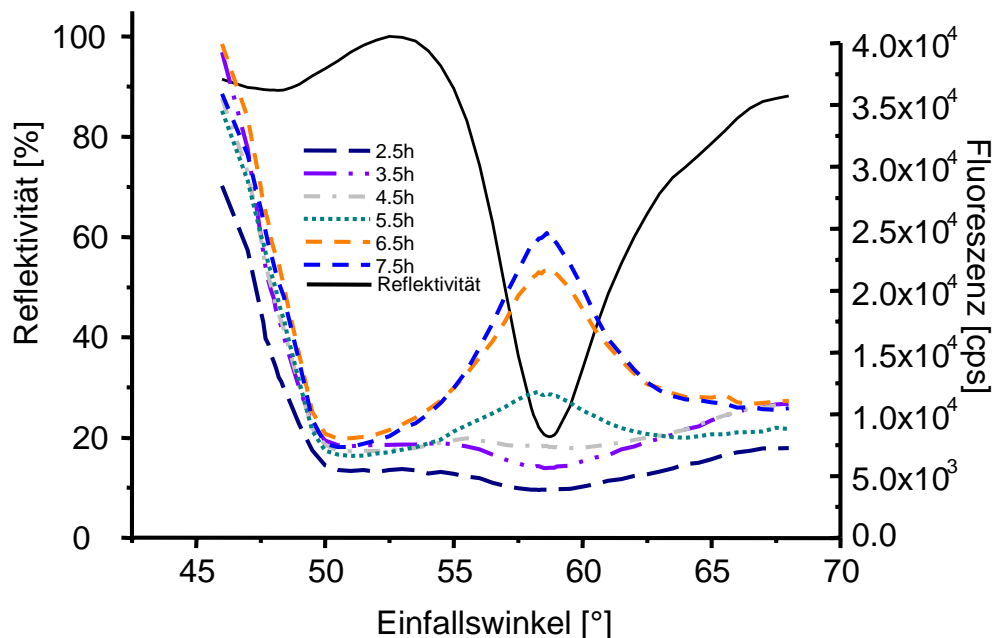


Abb. 5-21: Zeitabhängige SPFS-Meßreihe an einem einzelnen Substrat. Die Fluoreszenzsignale sind aus Messungen an drei verschiedenen Meßpunkten gemittelt. Es wird mit einer Antikörperkonzentration von 1:2000 gemessen.

In der Zeitreihe in *Abb. 5-21* wird durch die in der Meßküvette vorhandenen fluoreszenzmarkierten ungebundenen Antikörper eine hohe Gesamtfluoreszenz gemessen. Daher werden bei der verwendeten Antikörperkonzentration von 1:2000 spezifische Signale unterhalb einer Fluoreszenz von etwa 1×10^4 cps von der Gesamtfluoreszenz überlagert. Ab dem Zeitpunkt 5.5 h p.i. sind spezifische Meßsignale im Resonanzwinkel sichtbar. Die Messungen bei den vorherigen Zeitpunkten 2.5 h p.i., 3.5 h p.i. und 4.5 h p.i. weisen kein Fluoreszenzsignal im Resonanzwinkel auf. Das dort jeweils im Resonanzwinkel erkennbare Fluoreszenzminimum entsteht dadurch, daß in diesem Winkelbereich der zusätzlich die Fluoreszenz der Chromophore anregende Rückstrahl des Lasers fehlt (E. Sinner, pers. Mitteilung). Da die Gesamtfluoreszenz bis zu einem Zeitpunkt von 5.5 h das Meßsignal überdeckt, könnte eine Verringerung der Antikörperkonzentration und die dadurch bedingte Verringerung der an die Antikörper gekoppelten Chromophore die Detektion zu einem früheren Zeitpunkt ermöglichen. Bei SPFS- Messungen mit der Antikörperkonzentration

1:10000 (Daten nicht gezeigt) werden allerdings durch die geringere Konzentration an Fluorophoren schwächere Fluoreszenzsignale detektiert, welche ebenfalls von der Gesamtfluoreszenz überlagert werden.

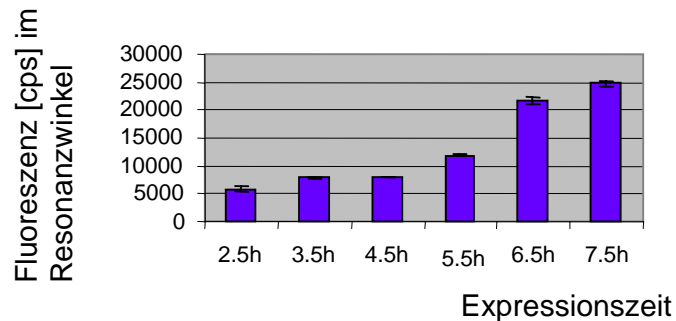


Abb. 5-22: Diagramm der bei der Zeitreihe an einem einzelnen Substrat jeweils im Resonanzwinkel gemessenen Fluoreszenz.

In Abb. 5-22 sind die jeweils im Resonanzwinkel gemessenen Fluoreszenzwerte aus Abb. 5-21 als Diagramm aufgetragen. Dabei ist ein deutlicher Anstieg der gemessenen Fluoreszenz mit zunehmender Expressionszeit sichtbar. Obwohl in Abb. 5-21 erst ab 5.5 h p.i. ein deutliches Signal erkannt werden kann, ist in Abb. 5-22 auch bei den Zeitpunkten 2.5 h p.i., 3.5 h p.i. und 4.5 h p.i., bei denen mögliche schwächere Fluoreszenzsignale von der Gesamtfluoreszenz überlagert sind, ein Anstieg der Fluoreszenz im Resonanzwinkel zu sehen. Eine mögliche Sedimentation der fluoreszenzmarkierten Antikörper wird durch ein vorsichtiges Durchmischen der Lösung in der Meßküvette vor jedem Meßzeitpunkt verhindert. Die konstante Konzentration der fluoreszenzmarkierten Antikörper während den Messungen läßt die Vermutung zu, daß der beobachtete Fluoreszenzanstieg im Resonanzwinkel auf der Bindung einer größeren Anzahl der Antikörpern an Rhodopsin in der Zellmembran im Bereich des evaneszenten Felds beruht.

Die Aufnahme einer Zeitreihe an einem mit lebenden BHK-Zellen bewachsenen Substrat ermöglicht das direkte Beobachten der Rhodopsinexpression einer individuellen Zellpopulation in Echtzeit. Die SPFS bietet damit ein neues Verfahren, die Dynamik von molekularen Interaktionsprozessen an einem Membranprotein innerhalb einer Zellpopulation im Detail zu charakterisieren.

5.2 Zeitaufgelöste Detektion der Rinderrhodopsin-expression mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie

Die Detektion von Membranproteinen auf der Oberfläche lebender Zellen mittels SPFS ist ein neuartiges Verfahren. Um damit gemessenen Signale mit einer etablierten Methode zu überprüfen, wird mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop eine Zeitreihe der Rhodopsinexpression aufgenommen. Hierfür wird, wie zuvor bei den SPFS-Messungen, die gleiche Anzahl an BHK-Zellen angesät und nach einer Inkubation über Nacht mit dem SFV-System infiziert. Als Negativkontrolle wird eine Zeitreihe der Expression von β -Galaktosidase verwendet, um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu überprüfen. Die korrekte Expression der β -Galaktosidase wird nach 8 h p.i. durch den Nachweis ihrer Enzymaktivität bestätigt (siehe *Abb. 5-23*). Dabei wird das Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid von β -Galaktosidase zu Galaktose und 4-Chlor-3-Brom-Indigo umgesetzt, was zu einer Blaufärbung der β -Galaktosidase exprimierenden Zellen führt. Diese Blaufärbung ist in *Abb. 5-23* deutlich zu erkennen.

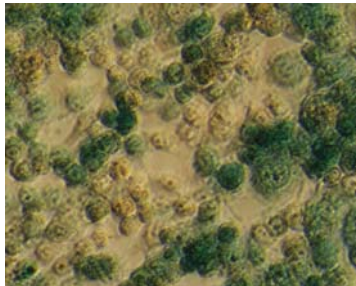


Abb. 5-23: Nachweis der Expression von β -Galaktosidase in der Zeitreihe der Negativkontrolle

Die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Zeitreihen der Expression von Rinderrhodopsin und β -Galaktosidase, die jeweils zu den Zeitpunkten 0 - 8 h p.i. durch Fixierung abgestoppt wurden, sind nebeneinander aufgeführt (siehe *Abb. 5-24*). Dabei sind alle Zellpräparate mit den identischen Antikörperlösungen behandelt. Jedes Fluoreszenzbild ist als jeweils identisch bearbeitete Aufnahme dargestellt (Bildreihen A für β -Galaktosidase und C für Rinderrhodopsin). Die jeweils zweite Bildreihe zeigt das zugehörige Transmissionsbild.

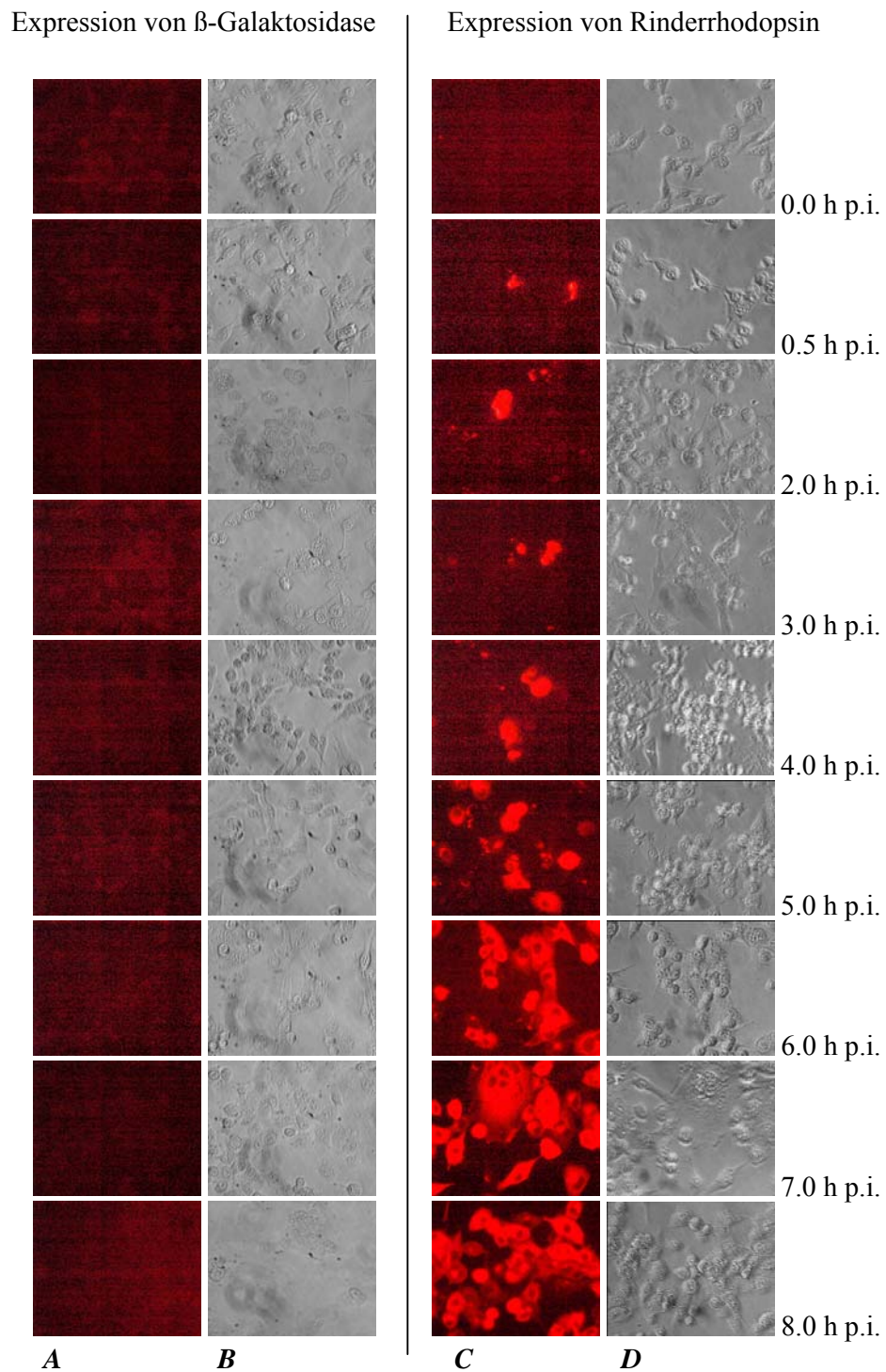


Abb. 5-24: Fluoreszenzmikroskopisch zeitaufgelöst detektierte Expression von Rinderrhodopsin in fixierten Zellen. Als Negativkontrolle wird die Expression von β -Galaktosidase verwendet. Die Detektion der Immunofluoreszenz erfolgt mittels anti-VSV-Antikörper und anti-Maus-Cy3 konjugiertem Antikörper in Blocking-Puffer. A, C: jeweils identisch bearbeitete Fluoreszenzaufnahme; B, D: Transmissionsbild.

Als zusätzliche Negativkontrolle zu der Zeitreihe der β -Galaktosidase-Expression werden nicht infizierte Zellen mit den verwendeten Antikörperlösungen inkubiert und nach den Waschschrritten fotografiert (siehe *Abb. 5-25*). Hier ist im Vergleich zur Fluoreszenzmarkierung der β -Galaktosidase exprimierenden Zellen (siehe *Abb. 5-24 A-C*) kein Unterschied sichtbar. Die verwendeten Antikörper binden daher weder an nicht infizierte Zellen noch an mit dem SFV-System β -Galaktosidase exprimierende Zellen. Diese Beobachtung bestätigt, daß die durch die Infektion mit dem SFV-System ausgelösten zellulären Veränderungen (Lundstrom 2001) nicht zu einer unspezifischen Bindung der verwendeten Antikörper führen.

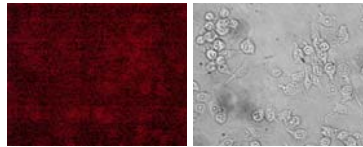


Abb. 5-25: Fluoreszenzmarkierung nicht infizierter fixierter Zellen ca. 24 h nach der Aussaat mit den verwendeten Antikörpern

Anhand der Zeitreihe der β -Galaktosidase-Expression (linke Bildreihe in *Abb. 5-24*) wird nachgewiesen, daß mit den verwendeten Antikörpern keine Fluoreszenzsignale in β -Galaktosidase exprimierenden Zellen detektiert werden können. Die durch die verwendeten Negativkontrollen bestätigte Spezifität der Antikörper ermöglicht den Nachweis der Expression von Rinderrhodopsin mit dem SFV-System in BHK-Zellen (rechte Bildreihe in *Abb. 5-24*). Zu dem Zeitpunkt 0.5 h p.i. sind bereits die ersten Fluoreszenzsignale sichtbar, die allerdings nicht die Größe ganzer fluoreszenzmarkierte Zellen erreichen. Da durch die Fixierung mit Methanol die Plasmamembran aufbricht, ist das Zellinnere für die Antikörper zugänglich (Krutzik 2003). Daher kann eine Detektion stattfinden, sobald der N-terminale VSV-Tag translatiert worden ist. Ganze fluoreszenzmarkierte Zellen sind in *Abb. 5-24* ab 4 h p.i. erkennbar. Weiterhin ist die deutliche Zunahme angefärbter Zellen mit steigender Expressionszeit zu sehen. Dadurch kann nachgewiesen werden, daß die Rhodopsinexpression erst nach der Infektion mit dem SFV-System beginnt und die verwendeten Antikörper spezifisch diese Expression detektieren.

Mit dem zur Verfügung stehenden Fluoreszenzmikroskop ist auch die Aufnahme einer Zeitreihe der Rhodopsinexpression in lebenden Zellen möglich (siehe *Abb. 5-26*). Zusätzlich wird eine Zeitreihe der Expression von β -Galaktosidase in lebenden Zellen mikroskopiert, um die Spezifität der verwendeten Antikörper auch bei lebenden Zellen zu überprüfen. Analog zu der Fluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen wird auch die Anfärbung nicht infizierter lebender Zellen mit den verwendeten Antikörpern analysiert (siehe *Abb. 5-26*). Eine Immunodetektion von Rinderrhodopsin mit vorinkubierten Antikörpern, wie sie für die SPFS-Messungen verwendet werden, führt mit dem verwendeten Fluoreszenzmikroskop zu

keinen detektierbaren Fluoreszenzsignalen (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenzmarkierung lebender, Rhodopsin exprimierender Zellen wird möglich, wenn beide Antikörper nacheinander inkubiert werden. Diese Inkubationsschritte erfolgen bei 4°C, um durch die Verlangsamung des zellulären Stoffwechsels eine Metabolisierung der Antikörper zu verhindern. Aufgrund der Vitalität der Zellen wird die Inkubationszeit des primären Antikörpers anti-VSV noch zur Expressionszeit gerechnet. Wie bereits zu den Fluoreszenzaufnahmen der fixierten Zellen ausgeführt ist, werden auch die in *Abb. 5-26* gezeigten Bilder in zwei Reihen dargestellt. Die jeweils linke Reihe besteht dabei aus den Fluoreszenzaufnahmen, welche mit erhöhter Intensität gezeigt werden, um jeweils auch schwächere Signale erkennen zu können. Rechts jedes Fluoreszenzbilds ist das zugehörige Transmissionsbild dargestellt.

Die in *Abb. 5-26* gezeigte Immunofluoreszenzfärbung lebender, Rhodopsin exprimierender Zellen bestätigt die Möglichkeit, die Rhodopsinexpression *in vivo* ohne eine Temperierung der Zellen auf 37°C detektieren zu können. Im Gegensatz zu der Färbung fixierter Zellen können bei lebenden Zellen ausschließlich Rhodopsinmoleküle in der Plasmamembran detektiert werden. In *Abb. 5-26* ist ab einem Expressionszeitpunkt von 5.5 h die Anfärbung der Plasmamembran deutlich sichtbar. Bereits ab 1.5 h p.i. fallen jedoch stark fluoreszierende Partikel auf, die in der gesamten Zeitreihe erkannt werden können. Da diese Partikel in der Aufnahme der nicht infizierten Zellen (*Abb. 5-27*) und in der Zeitreihe der β -Galaktosidase-Expression (*Abb. 5-26 A* und *B*) nicht sichtbar sind, entsprechen sie spezifischen Signalen der Immunofluoreszenzfärbung. Hier könnte es sich um abgestorbene Zellen handeln, worauf auch die abgerundete Form der Partikel schließen läßt. Es ist bekannt, daß sowohl durch Apoptosis als auch durch den nekrotischen Zelltod Defekte in der Plasmamembran verursacht werden (Jaeschke 2003), was in einer Permeabilität der Plasmamembran für die verwendeten Antikörper resultieren könnte. Die Infektion mit dem SFV-System sowie die Prozedur der Immunofluoreszenzfärbung könnte ein Absterben der untersuchten Zellen begünstigen (Liljestrom 1991). In diesen abgestorbenen Zellen könnte wie auch in einem fixierten Präparat das VSV-markierte Rhodopsin im Zellinneren detektiert werden. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß die beobachteten Partikel den frühen Fluoreszenzsignalen der Zeitreihe der fixierten Zellen ähneln. Ganze angefarbte Zellen dagegen können ab 5.5 h p.i. eindeutig nachgewiesen werden. Man erkennt hier deutlich die Anfärbung der Plasmamembran. Dabei ist eine Zunahme solcher angefarbter Zellen zwischen den Zeitpunkten 5.5 h p.i. und 9 h p.i. sichtbar. Bei den Zeitpunkten vor 5.5 h p.i. kann aus den Abbildungen nicht eindeutig bestimmt werden, ob es sich bei den erkennbaren Signalen um abgestorbene oder unvollständig fluoreszenzmarkierte lebende Zellen handelt.

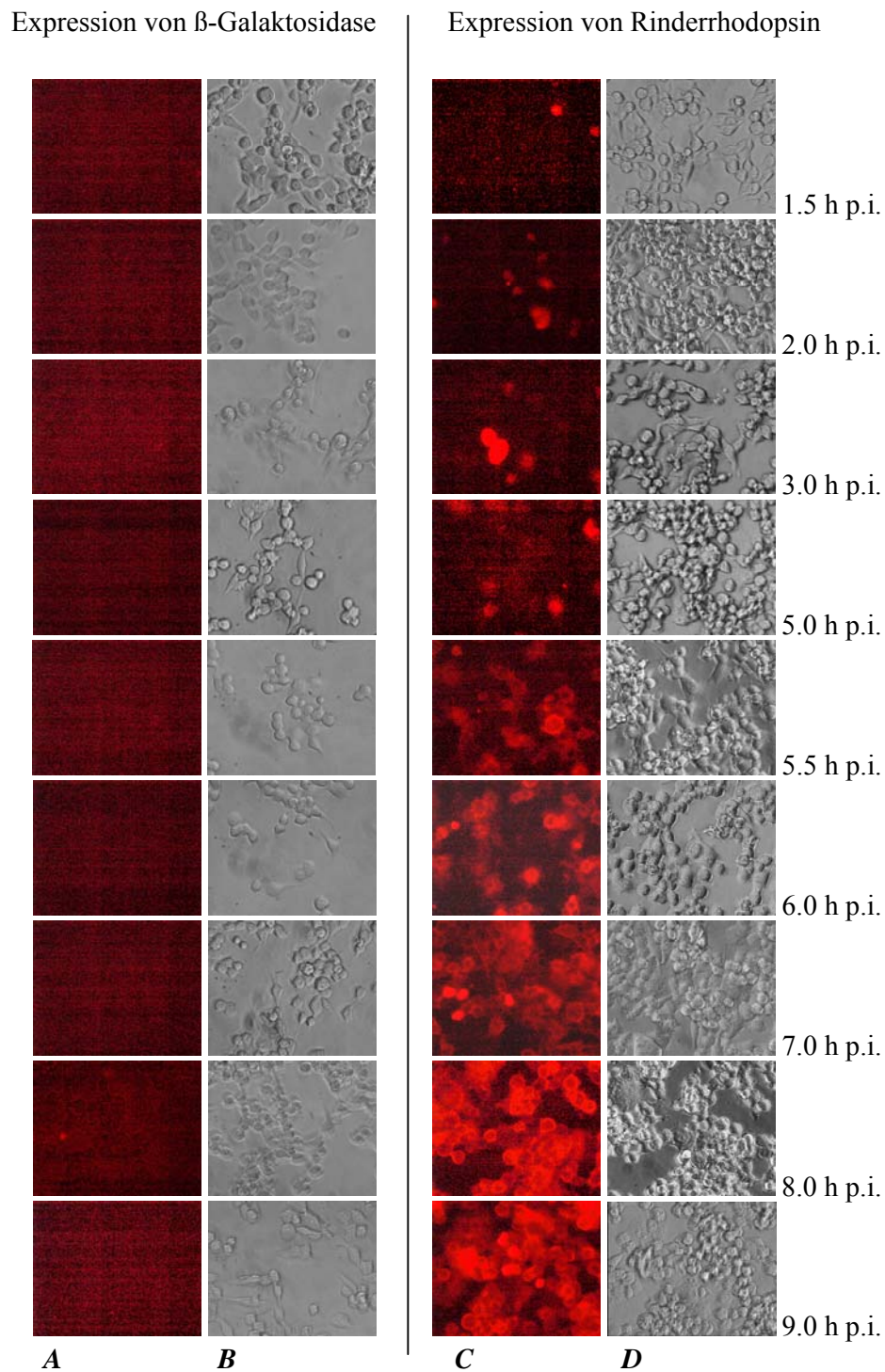


Abb. 5-26: Fluoreszenzmikroskopisch zeitaufgelöst detektierte Expression von Rinderrhodopsin in lebenden Zellen. Als Negativkontrolle wird die Expression von β -Galaktosidase verwendet. Die Detektion der Immunofluoreszenz erfolgt mittels anti-VSV-Antikörper und anti-Maus-Cy3 konjugiertem Antikörper in Blocking-Puffer. A, C: jeweils identisch bearbeitete Fluoreszenzaufnahme; B, D: Transmissionsbild.

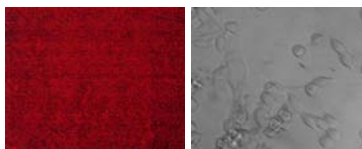


Abb. 5-27: Anfärbung nicht infizierter lebender Zellen mit den verwendeten Antikörpern

Auszählung der angefärbten Zellen im Fluoreszenzmikroskop

Die im Blickfeld des Mikroskops sichtbaren angefärbten Zellen werden für beide Zeitreihen der fixierten und lebenden Rhodopsin exprimierenden Zellen ausgezählt (siehe Abb. 5-28). Diese Anzahl wird jeweils zu der Gesamtzahl der Zellen in Relation gesetzt. Wie bereits zu Abb. 5-24 beschrieben ist, kann bei fixierten Zellen aufgrund der aufgebrochenen Zellmembran auch VSV-getagtes Rhodopsin innerhalb der Zellen detektiert werden. Dieses wird im Fluoreszenzbild als Zellfragment erkannt. In Abb. 5-28 ist die Anzahl ausgezählter Zellfragmente eigenständig aufgeführt.

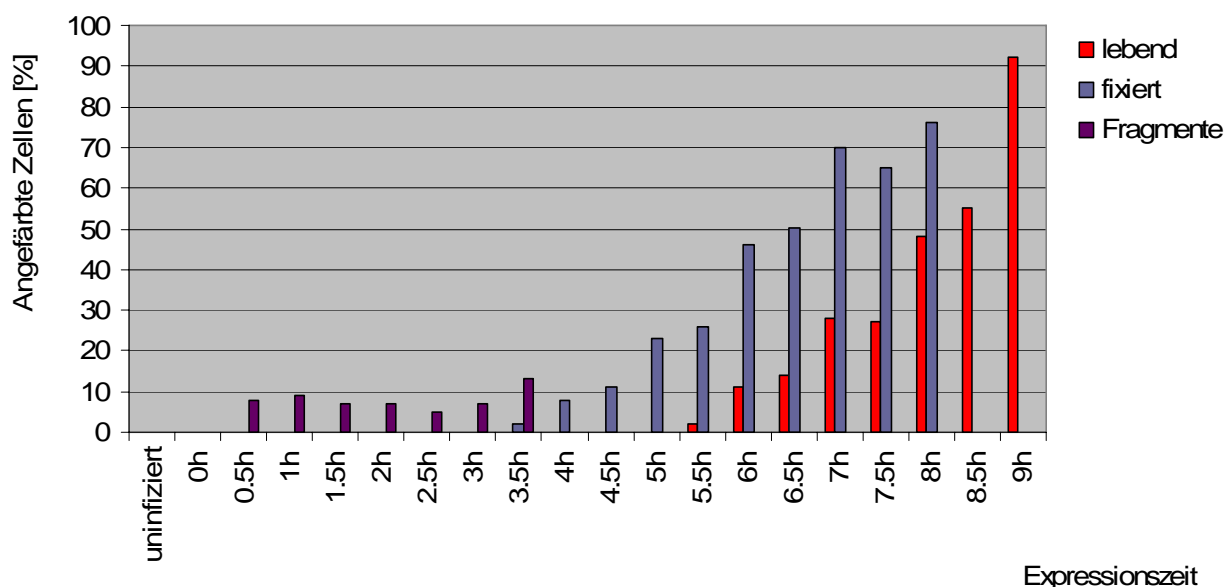


Abb. 5-28: Vergleich der zeitaufgelösten fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Rinderrhodopsinexpression in lebenden und fixierten BHK-Zellen. Es sind jeweils die Prozentzahlen angefärbter Zellen dargestellt. Als Fragmente sind Fluoreszenzsignale aus fixierten Zellen bezeichnet, welche keinen ganzen Zellen zugeordnet werden können.

Aus Abb. 5-28 ist ersichtlich, daß die Expression von Rinderrhodopsin in fixierten Zellen zu einem früheren Zeitpunkt als in lebenden Zellen detektiert wird. Dieser Zeitunterschied beträgt etwa 2 h und kann wahrscheinlich auf die Permeabilität der Plasmamembran der

fixierten Zellen für die verwendeten Antikörper zurückgeführt werden. Auf diese Weise ist in fixierten Zellen die Detektion von Fluoreszenzsignalen mit dem anti-VSV-Antikörper möglich, sobald der N-terminale VSV-tag exprimiert worden ist. Bei den in *Abb. 5-28* aufgeführten Fragmenten, d.h. Fluoreszenzsignalen innerhalb von Zellen, könnte es sich um solche noch nicht vollständig exprimierte oder noch nicht zur Membran transportierte Rhodopsinmoleküle handeln. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, daß bei den Kontrollen der nicht infizierten Zellen und den für 0 h infizierten Zellen keine Fragmente beobachtet werden können, es sich also nicht um einen Artefakt der Immunofluoreszenzfärbung handelt. Diese Fragmente werden bereits ab einem Expressionszeitpunkt von 0.5 h detektiert. Daher kann vermutet werden, daß zumindest der VSV-tag nach 0.5 h p.i. zu einer mit dem verwendeten Fluoreszenzmikroskop detektierbaren Menge exprimiert wird. Da in lebenden Zellen erst eine deutliche Anfärbung der Plasmamembran ab 5.5 h p.i. möglich ist, kann angenommen werden, daß auch bei den fixierten Zellen zu Zeitpunkten vor 5.5 h p.i. vor allem Rhodopsinmoleküle im ER und im Golgi-Apparat angefärbt werden.

Insgesamt ist die Anzahl angefärbter Zellen jeweils unter den fixierten Zellen deutlich höher als die Anzahl angefärbter lebender Zellen, da bei einem fixierten Präparat auch die noch nicht vollständig exprimierten oder noch nicht zur Plasmamembran transportierten Rhodopsinmoleküle angefärbt werden können. Im Gegensatz dazu werden in lebenden Zellen ausschließlich die korrekt in die Plasmamembran integrierten Rhodopsinmoleküle detektiert. Das könnte die deutlich schwächeren Fluoreszenzsignale bei lebenden Zellen im Vergleich zu einem fixierten Präparat erklären (siehe auch *Kapitel 5.4.2*).

Insgesamt weisen die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Zeitreihen die Expression des Rinderrhodopsins in den verwendeten BHK-Zellen sowie die Spezifität des verwendeten anti-VSV-Antikörpers nach. Die Zeitreihe in *Abb. 5-26* zeigt eindeutig, daß der spezifische Nachweis einer Rinderrhodopsinexpression auch in lebenden Zellen möglich ist, und bestätigt dadurch die mittels SPFS durchgeführten Messungen.

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel wird die direkte Expression eines Membranproteins *in vivo* erstmals mit Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) dokumentiert (Krupka, in Vorbereitung). Als Modellmembranprotein wird Rinderrhodopsin verwendet, dessen heterologe Expression in der Plasmamembran der verwendeten Zelllinien P19 und BHK nachgewiesen wird. Von diesen Zelllinien wird mit Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie (FLIC) ein Abstand zur Substratoberfläche von 48 bzw. 57 nm gemessen. Das heterolog exprimierte Rhodopsin in der adhärierenden Membran der lebenden Zellen befindet sich daher in dem Bereich des evaneszenten Feld des Plasmons, in dem die Fluoreszenz der zur Immunodetektion verwendeten Antikörper verstärkt wird. Gleichzeitig vermeidet diese Entfernung einen möglichen Dämpfungseffekt der Fluorophore, den sogenannten Förstertransfer, an der Goldoberfläche.

Die Rhodopsinexpression in lebenden BHK-Zellen wird in einer Zeitreihe ab einer Expressionszeit von 3 h mit SPFS detektiert. Weiterhin ist sogar die zeitaufgelöste Detektion der Rhodopsinexpression auf einem einzelnen zellbewachsenen Substrat möglich. Dadurch bleiben möglichst viele Parameter wie die Beschaffenheit des Substrats und die Dichte der darauf wachsenden Zellen während dem Zeitraum der Analyse unverändert, was die Reproduzierbarkeit der SPFS-Messungen an lebenden Zellen erhöht.

Die mit SPFS gemessenen Signale können durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie an fixierten Präparaten und an lebenden Zellen bestätigt werden. Diese fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen weisen auch die Spezifität des verwendeten primären Antikörpers nach, was die Genauigkeit der SPFS-Messungen verifiziert. Aus den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen resultiert daher eindeutig, daß das Verfahren der SPFS zur sensitiven und präzisen Analyse von Bindungsreaktionen an der Oberfläche lebender Zellen verwendet werden kann. Damit sind neuartige Anwendungen für eine systematische Charakterisierung von Membranproteinen in lebenden Zellen sowie von dynamischen Prozessen auf deren Oberfläche denkbar, wie im folgenden Kapitel diskutiert wird.

5.4 Diskussion und Ausblick

5.4.1 Zeitspanne der Biosynthese von Rinderrhodopsin

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Expression von Rinderrhodopsin mittels SPFS in lebenden Zellen als alternatives Verfahren zur Fluoreszenzmikroskopie zeitaufgelöst detektiert. Für die SPFS-Messungen wird in einer Zeitreihe eine früheste Detektion von Rinderrhodopsin bei 3 h nach der Infektion mit dem Semliki-Forest-Virus (post infectionem, p.i.) ermittelt. Noch früher kann das Rinderrhodopsin in der Plasmamembran womöglich nicht detektiert werden, da von der Infektion der Zellen bis zur Insertion der ersten Rinderrhodopsinmoleküle in der Plasmamembran eine noch unbekannte Zeitspanne benötigt wird. Von dem Rinderrhodopsin vergleichbaren Membranproteinen, die auch zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören, ist beispielsweise für den humanen Neurokinin 1 Rezeptor mit dem SFV-System eine Expressionszeit von 6 h bekannt (Lundstrom 2001).

Die Expression von Rinderrhodopsin mit dem SFV-System konnte bisher mit Pulse-Chase-Experimenten ab 4 h p.i. durch schwache Signale auf einem Western-Blot nachgewiesen werden (K. Hölscher, pers. Kommunikation). Diese Experimente unterscheiden aber nicht zwischen reifen Rinderrhodopsinmolekülen in der Plasmamembran und Rinderrhodopsin, welches noch im Zellinneren modifiziert und transportiert wird. Eine erfolgreiche Insertion des Rinderrhodopsins in die Plasmamembran erfordert nämlich mehrere posttranslationale Prozessierungsschritte, welche unterschiedlich lange Zeitspannen beanspruchen (vgl. *Abb. 5-29*).

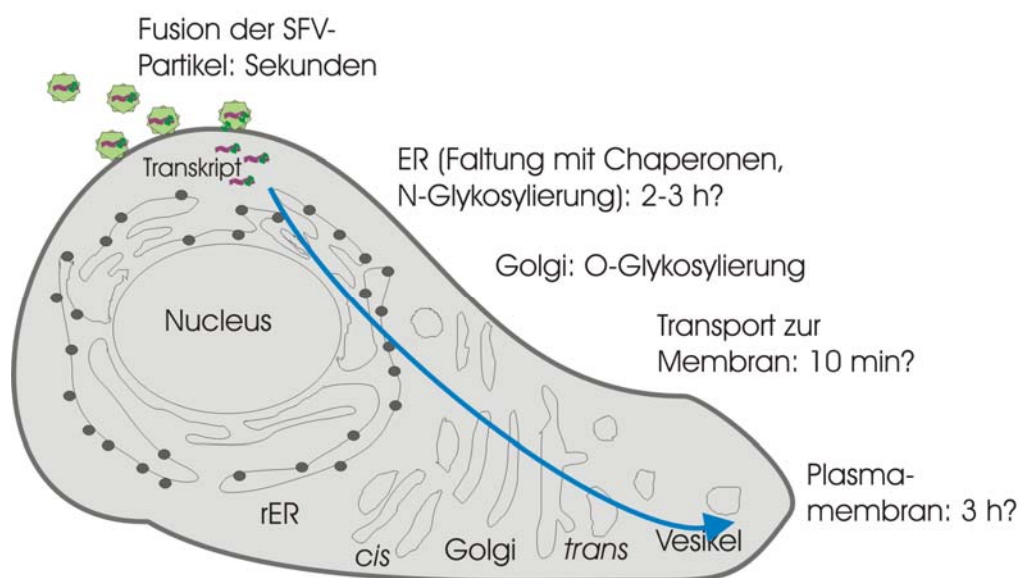


Abb. 5-29: Schematische Darstellung der Biosynthese von Rinderrhodopsin mit dem SFV-System

Es ist bekannt, daß die für die Virusinfektion nötige Fusion des SFV mit der Plasmamembran der Zellen innerhalb von Sekunden abläuft (Wahlberg 1992). Der GPCR Humaner Delta Opioid Rezeptor (HDOR) gelangt nach einer Halbwertszeit von 2 h nach Transkriptionsbeginn in das ER und benötigt für den Transport zur Plasmamembran weitere 10 min (Petaja-Repo 2000). Andere Membranproteine wie z.B. der 5HT3-Rezeptor können allerdings erst nach 3 h im ER und nach 4 h in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Ilegems 2004). Da besonders die Prozessierung im ER den limitierenden Schritt für die Biosynthese darstellt (Petaja-Repo 2000), könnte entsprechend dem Ausmaß der posttranslationalen Modifizierung eine für jedes Membranprotein individuelle Expressionszeit benötigt werden. Die posttranslationale Modifizierung von Rinderrhodopsin erfordert viele N- und O-Glykosylierungsvorgänge (Heymann 1997). Auch werden für die effiziente Faltung und den Transport von Rinderrhodopsin spezielle Chaperon-ähnliche und Eskorten-ähnliche Proteine benötigt (Ferreira 1995). Daher könnte die in dieser Arbeit gemessene Expressionszeit von 3 h durchaus die Zeitspanne von der Infektion der Zellen bis zur Insertion der ersten Rinderrhodopsinmoleküle in der Plasmamembran darstellen. Die Expression von Membranproteinen, welche weniger posttranslationale Prozessierungsschritte als das Rinderrhodopsin benötigen, könnte mit SPFS daher womöglich nach einer kürzeren Zeit als 3 h p.i. detektiert werden.

5.4.2 Vergleich der *in vivo* - Detektion mittels SPFS und Fluoreszenzmikroskopie

Bisher wird die Proteinexpression in lebenden Zellen vor allem mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen (Smith 2004). Die intensive Beleuchtung der untersuchten Zellen verursacht allerdings Artefakte durch Photooxidation und die dadurch bedingte chemische Zersetzung der Farbstoffe, welche zelluläre Prozesse stören und toxisch auf die Zelle wirken können (König 2000), (Knight 2003), (Javitch 2004). Daher wird in dieser Arbeit die SPFS an lebenden Zellen als alternative Detektionsmethode überprüft, bei der die untersuchte Zelle nicht vollständig beleuchtet wird. Lediglich die basale Membran liegt in der Reichweite des von Oberflächenplasmonen erzeugten evaneszenten Feldes (vgl. *Abb. 5-11*).

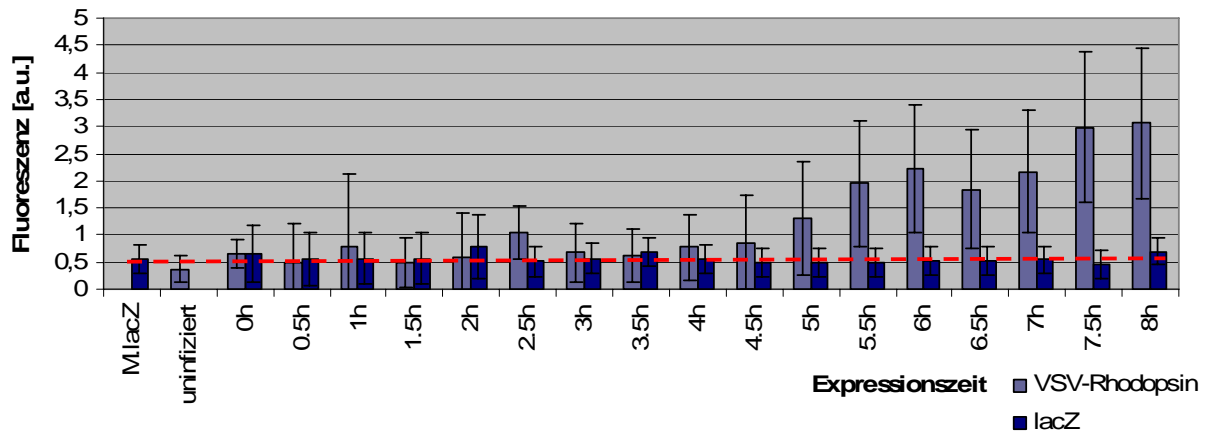
Die meisten Photooxidationsprozesse entstehen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche in den Mitochondrien gebildet werden (Jou 2004), (Peng 2004). Da eine SPFS-Messungen aufgrund der Verwendung des evaneszenten Felds nur wenige Mitochondrien bestrahlt, wird weniger zellulärer Schaden als bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie verursacht. Diese Behauptung wird dadurch bestätigt, daß bei der Totalen Internen Reflektions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM), welche ähnlich wie SPFS ein evaneszentes Feld zur Fluoreszenzdetektion benutzt, nur sehr geringe Zellschäden durch Ausbleichen oder Bestrahlung bekannt sind (Almers 2001).

Ein direkter Vergleich der in dieser Arbeit mittels Fluoreszenzmikroskopie und SPFS gemessenen Fluoreszenzintensität ist nicht möglich, da die Fluoreszenz jeweils mit einer digitalen Kamera bzw. mit einem Photomultiplier detektiert wird und die für jedes Verfahren

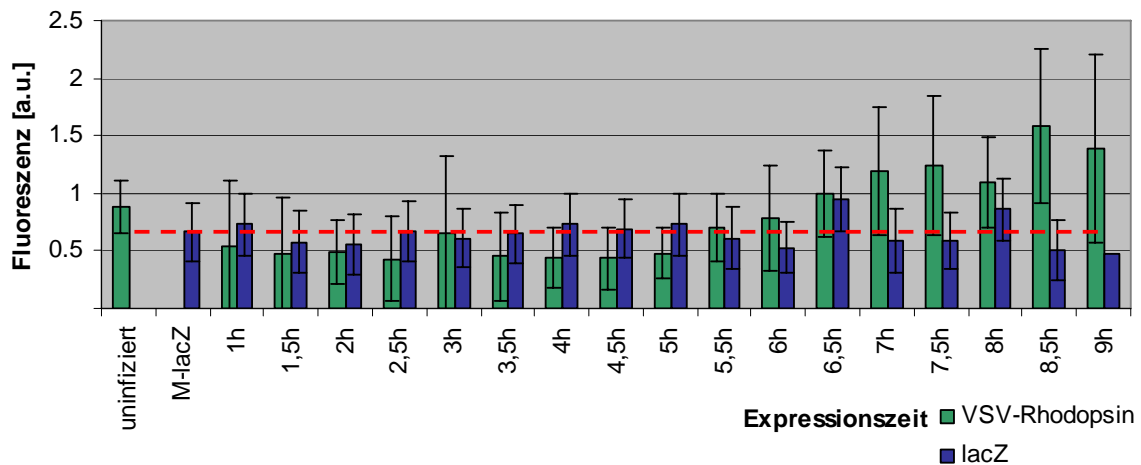
optimalen Konzentrationen und Inkubationszeiten der Antikörper gewählt werden. Zudem werden unterschiedliche Chromophore und unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet. Es ist bekannt, daß primäre Antikörper nach ihrer Markierung mit sekundären Antikörpern die Affinität für ihr spezifisches Antigen behalten (Brown 2004). Für die Immunfluoreszenzmarkierung der BHK-Zellen in den SPFS-Messungen wird dieser Effekt ausgenutzt, um die Inkubationszeiten mit den Antikörpern zu verkürzen und damit eine Metabolisierung der Antikörper durch die lebenden Zellen zu verhindern. Mit den vorinkubierten Antikörpern anti-VSV-Antikörper und anti-Maus-Alexa Fluor Antikörper in der jeweiligen Konzentration 1:100 genügt eine Inkubationszeit von 30 Minuten in Kulturmedium bei Raumtemperatur für eine Detektion von Rhodopsin in der Membran lebender Zellen mittels SPFS. Für eine Detektion fluoreszenzmarkierter lebender Zellen mit dem verwendeten Fluoreszenzmikroskop ist diese Inkubationszeit mit den vorinkubierten Antikörpern anti-VSV-Antikörper und anti-Maus Cy3 konjugierter Antikörper in identischen Bedingungen jedoch nicht ausreichend. Daher erfolgen die Analysen mit dem Fluoreszenzmikroskop gemäß einem standardisierten Protokoll für die Immunfluoreszenz lebender Zellen, bei dem beide Antikörper hintereinander bei 4°C für 30 Minuten für den primären Antikörper bzw. für 45 Minuten für den sekundären Antikörper in den jeweiligen Endverdünnungen von 1:1000 inkubiert werden. Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher sekundärer Antikörper, Chromophore und Inkubationsbedingungen kann aus der kürzeren Inkubationszeit für die SPFS-Messungen keine Aussage zu dem Verhältnis der Empfindlichkeit beider Detektionsmethoden zueinander getroffen werden. Der geringere Zeitaufwand für eine SPFS-Messung vereinfacht jedoch die Aufnahme einer Zeitreihe an einer identischen Zellpopulation, wie sie für vergleichende Analysen benötigt wird, da die Anzahl der vorangegangenen Zellteilungen das Verhalten der Zellen und damit das Meßergebnis beeinflussen kann.

Auch in der Art und Weise der Detektion von Fluoreszenzsignalen bestehen signifikante Unterschiede zwischen einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme und einer SPFS-Messung. Bei einer Betrachtung durch das Fluoreszenzmikroskop kann zwischen Hintergrundsignalen und fluoreszenzmarkierten Zellen unterschieden werden, was die Auswahl eines Bereichs mit geringem Hintergrund erlaubt. Der Zustand der Zellen ist anhand ihrer Form erkennbar, so daß intakte adhärierende Zellen für die Aufnahme ausgewählt werden können. Dagegen wird bei einer SPFS-Messung die gesamte Fluoreszenz des Meßbereichs von ungefähr 1 mm² detektiert. Analog dazu kann die anhand einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme detektierte Fluoreszenz quantifiziert werden, indem die Gesamtfluoreszenz dieser Aufnahme dargestellt wird. Diese aus den jeweiligen Originalbildern der Zeitreihe der lebenden Zellen gemittelten Fluoreszenzintensitäten sind in *Abb. 5-30* als Diagramm aufgeführt, wobei die Werte der als Negativkontrolle exprimierten β -Galaktosidase für jeden Zeitpunkt neben den Fluoreszenzsignalen aus der Rinderrhodopsin-expression gezeigt sind.

Aufgrund von Faktoren wie der heterogenen Infektion der Zellen mit dem SFV-System, der unterschiedlichen Reaktion individueller Zellen auf diese Infektion oder der Zelldichte in dem jeweiligen analysierten Bereich weisen die detektierten Signale eine Schwankungsbreite auf. Daraus entsteht die Schwierigkeit, schwächere Signale von den Hintergrundsignalen der als Negativkontrolle verwendeten β -Galaktosidaseexpression zu unterscheiden. In *Abb. 5-30* wird der Mittelwert der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Negativkontrollen als Anhaltspunkt angenommen.



A



B

Abb. 5-30: Jeweilige Gesamtintensität der fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen der Expression von Rhodopsin und β -Galaktosidase in lebenden (A) und fixierten Zellen (B). Die jeweiligen Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrollen aus der gemittelten Intensität der β -Galaktosidaseexpression (M-lacZ) ist als rot gestrichelte Linie dargestellt.

In *Abb. 5-30 A* ist der Fluoreszenzhintergrund aus dem Mittelwert der gesamten Zeitreihe der β -Galaktosidaseexpression (M-lac) als gestrichelte Linie dargestellt. Sowohl der individuelle Hintergrund der β -Galaktosidaseexpression zu jedem Zeitpunkt als auch der Mittelwert der

gesamten β -Galaktosidaseexpression wird ab dem Zeitpunkt von 5.5 h p.i. von dem Fluoreszenzsignal der Rinderrhodopsin exprimierenden Zellen überragt. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Auszählung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop, bei der ab 5.5 h p.i. die erste angefärbte Zelle sichtbar ist (vgl. *Abb. 5-26*). Auch der Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmender Expressionszeit ist in *Abb. 5-30 A* ab diesem Zeitpunkt zu sehen. Da der Wert bei 5.5 h p.i. nur eine sehr geringe Differenz zu dem als gestrichelte Linie gesetzten Hintergrund der gemittelten Kontrollmessungen aufweist, muß allerdings der nachfolgende Wert bei 6 h p.i. als deutliche frühestmögliche Detektion von Rinderrhodopsin in *Abb. 5-30 A* betrachtet werden. Auffallend ist, daß der Hintergrund der nicht infizierten Zellen höher als Mittelwert der β -Galaktosidaseexpression liegt. Da die Fluoreszenz der nicht infizierten Zellen jedoch von dem Wert der β -Galaktosidaseexpression bei 6.5 h p.i. übertroffen wird, befindet sich der Wert der Einzelmessung der nicht infizierten Zellen innerhalb des Schwankungsbereichs der Werte der β -Galaktosidaseexpression.

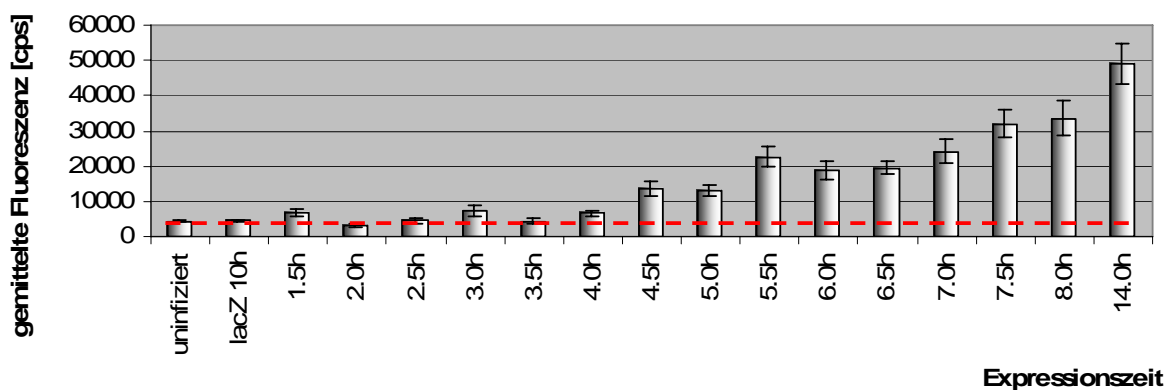
In *Abb. 5-30 B* wird eine quantitative Darstellung der Fluoreszenzaufnahmen der fixierten BHK-Zellen als Mittelwert der Gesamtintensität der Originalbilder aus *Abb. 5-24* gezeigt. Bei den Gesamtintensitäten der fixierten Präparate in *Abb. 5-30 B* fällt zunächst ab etwa 5 h p.i. auf, daß die Fluoreszenzwerte bis zu dreimal höher als bei den lebenden Zellen liegen (vgl. *Abb. 5-30 A*). Die Werte unterhalb 5 h p.i. dagegen ähneln denen der lebenden Zellen. Entsprechend zu den Abbildungen *5-30 A* ist in *Abb. 5-30 B* der Mittelwert sämtlicher β -Galaktosidaseexpressionen als rot gestrichelte Linie im Diagramm dargestellt. Diese Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrollen wird ab 2.5 h p.i. von allen nachfolgenden Fluoreszenzsignalen überragt. Dabei übertrifft der Wert bei 3.5 h p.i. die Hintergrundfluoreszenz jedoch nur knapp, während die zugehörige Negativkontrolle der β -Galaktosidaseexpression bei 3.5 h über dem Fluoreszenzsignal liegt. Aufgrund dessen kann der nachfolgende Wert bei 4 h als erster die Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrolle übertreffende Zeitpunkt gesehen werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Fluoreszenzwerte bei 1.0 h p.i. und 2.5 h p.i. dem bei 4 h p.i. detektierten Wert ähneln bzw. sogar darüber liegen. Bei diesen beiden Werten könnte es sich um eine Schwankungsbreite der Fluoreszenzsignale handeln, da der nachfolgende Wert bei 3.5 h sogar eine schwächere Fluoreszenz als die Kontrollexpression der β -Galaktosidase aufweist. Diese Schwankungsbreite könnte zusätzlich zu den bei lebenden Zellen beschriebenen Faktoren auch aus Unterschieden in der Permeabilität der Plasmamembranen resultieren. Konsistent mit der Detektion der Rhodopsinexpression ab 4 h p.i. bei fixierten BHK-Zellen sind auch in einer Auszählung im Mikroskop ab einem Zeitpunkt von 4 h p.i. fluoreszenzmarkierte ganze Zellen sichtbar.

Die höhere Fluoreszenzintensität der fixierten Präparate im Vergleich zu den Werten der lebenden Zellen könnte dadurch zustande kommen, daß aufgrund der Permeabilität der Zellmembran ein Signal detektiert werden kann, sobald der N-terminale VSV-tag translatiert ist. Auf diese Weise wird zusätzlich zu dem VSV-Rhodopsin in der Plasmamembran auch das

VSV-Rhodopsin während seiner Expression, den posttranslationalen Modifikationen und dem Transport zur Plasmamembran angefärbt. Im Gegensatz dazu kann bei den lebenden Zellen nur das Rhodopsin in der Plasmamembran detektiert werden. Eine Inkorporation der Antikörper durch die lebenden Zellen kann ausgeschlossen werden, da bei den β -Galaktosidase exprimierenden Kontrollen keine Fluoreszenz sichtbar ist. Es besteht aber die Möglichkeit, daß die verwendeten Antikörper von den Zellen metabolisiert werden, woraufhin weniger Fluoreszenz im Mikroskop sichtbar ist. Aufgrund dieser höheren Fluoreszenzintensität kann bei den fixierten Zellpräparaten ein günstigeres Verhältnis der Fluoreszenzsignale zu den Hintergrundsignalen gemessen werden. Bei dem Wert von 8 h p.i. zum Beispiel beträgt dieses Verhältnis bei lebenden Zellen einen Faktor von 2.1, bei fixierten Präparaten jedoch den Faktor 5.4.

Analog zu den Gesamtintensitäten der fluoreszenzmikroskopischen Analysen können auch die

mit SPFS gemessenen Fluoreszenzintensitäten als Gesamtintensitäten der zu jedem Zeitpunkt der Rhodopsinexpression detektierten Fluoreszenz gezeigt werden (siehe *Abb. 5-31*). Ebenso wie in *Abb. 5-30* erschweren bei den SPFS-Messungen in *Abb. 5-31* die Schwankungen der schwächeren Fluoreszenzsignale die Unterscheidung der gewünschten Fluoreszenzsignale von den Hintergrundsignalen.



5-31: Gesamtintensitäten der mittels SPFS detektierten Fluoreszenz von heterolog Rhodopsin exprimierenden lebenden Zellen. Die jeweiligen Hintergrundfluoreszenzen der Negativkontrollen aus der gemittelten Intensität der β -Galaktosidase-Expression (*M-lacZ*) bzw. aus der β -Galaktosidase-Expression für 10 h sind als rot gestrichelte Linie hinterlegt.

In *Abb. 5-31* ist der Hintergrund aus den Kontrollmessungen der nicht infizierten und β -Galaktosidase exprimierenden Zellen als gestrichelte Linie dargestellt. Anhand dieser Linie wird eine Schwankung der Fluoreszenzintensitäten deutlich. Bei einer Berücksichtigung der Schwankungsbreite der Fluoreszenzmessungen kann die Rhodopsinexpression ab 4.5 h p.i. nachgewiesen werden. Wird allerdings bei allen Meßpunkten der zugehörige Fluoreszenzhintergrund des jeweiligen zellbewachsenen Substrats von der Gesamtfluoreszenz abgezogen (siehe *Abb. 5-19*), dann kann aufgrund der resultierenden geringen

Fluoreszenzsignale der frühen Expressionszeiten bereits ab 3.0 h p.i. ein höherer Wert als bei den Kontrollmessungen detektiert werden. Aus *Abb. 5-18* ist ersichtlich, daß bei den Zeitpunkten bis einschließlich 3.0 h p.i. ein höherer jeweiliger Fluoreszenzhintergrund des zellbewachsenen Substrats als bei den späteren Zeitpunkten gemessen wird. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, daß die untersuchten Zellen zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit dem SFV eine veränderte Aktivität aufweisen (Lundstrom 1994), wodurch womöglich ein höherer Fluoreszenzhintergrund in den SPFS-Messungen entsteht. Daher liefert die Darstellung der Fluoreszenzsignale abzüglich des jeweiligen Fluoreszenzhintergrunds in *Abb. 5-19* genauere Daten, wonach die Rhodopsinexpression frühestens ab 3.0 h detektiert werden kann.

Da bei den SPFS-Messungen und der Detektion mit dem Fluoreszenzmikroskop unterschiedliche Lichtstärken, Anregungswellenlängen, Chromophore und Sekundärantikörper verwendet werden, kann das jeweilige Verhältnis des Fluoreszenzsignals bezüglich des Hintergrundsignals der Negativkontrolle nicht direkt verglichen werden. Aufgrund der ausschließlichen Verstärkung der Fluoreszenz innerhalb des evaneszenten Feldes in den SPFS-Messungen erfolgt jedoch eine geringe Detektion von Hintergrundsignalen aus fluoreszierenden Bereichen des Zytosols oder des umgebenden Kulturmediums als mit fluoreszenzmikroskopischen Verfahren. Die Reichweite des evaneszenten Feldes von etwa 100 nm in die untersuchten Zellen illuminiert einen geringeren Bereich des Zytosols als bei konfokalen Mikroskopen, mit denen selbst bei einer Fokussierung auf die Plasmamembran etwa ein Bereich von einem halben Mikrometer des Zellinneren betrachtet wird (Almers 2001). Aus diesem Grund werden bei der Mikroskopie vermehrt Hintergrundsignale aus dem Zytosol detektiert, die unter Umständen auch schwache Fluoreszenzsignale der untersuchten Membranproteine überdecken können. Bei den verwendeten Verfahren weisen daher die mit SPFS gemessenen Signale einen niedrigeren Fluoreszenzhintergrund auf.

5.4.3 SPFS - Messungen an einer einzelnen Zelle

Die Vorteile des Fluoreszenzmikroskops, einen Meßbereich mit geringem Hintergrund und vitalen Zellen auszuwählen, könnten auch für SPFS-Messungen erreicht werden, indem die Fluoreszenz zusätzlich mit Hilfe eines Mikroskops mit angeschlossener CCD-Kamera abgebildet wird. Im vorigen Kapitel ist ausgeführt, daß ein Betrachten einzelner Zellen im Vergleich zu der gemittelten Fluoreszenz eines Meßbereichs zu einer früheren Detektion von Fluoreszenzsignalen führt. Daher könnte die Sensitivität von SPFS durch das Auswählen des Meßbereichs zusätzlich erhöht werden. Bei der Verwendung einer geringen Zelldichte wären dann auch SPFS-Messungen an einer einzelnen Zelle möglich. Messungen an einzelnen Zellen bieten einen Einblick in die Variation der unterschiedlichen Reaktionen verschiedener individueller Zellen, welche sogar in geklonten Zellpopulationen bestehen (Brehm-Stecher 2004). Auf diese Weise können weitaus detailliertere Daten als mit gemittelten Werten aus Zellpopulationen generiert werden. SPFS-Messungen könnten die individuelle Expression eines Membranproteins einer einzelnen Zelle zeitaufgelöst detektieren, und es könnten womöglich Veränderungen dieser Expression aufgrund der Zugabe von Hormonen oder anderen Faktoren registriert werden. Die Ermittlung weiterer Parameter wie eine Messung des pH-Werts oder des Sauerstoffgehalts durch zusätzliche Sensoren in der Meßküvette könnte hier weitere Aussagen über das Verhalten der Zellen ermöglichen. Die Sensitivität der SPFS könnte durch eine erhöhte Laserleistung zusätzlich gesteigert werden, deren Unschädlichkeit auf die Lebensfähigkeit der Zellen jedoch überprüft werden sollte.

Zusammenfassend bietet die zeitaufgelöste *in vivo* - Detektion von Membranproteinen mittels SPFS neue Anwendungsmöglichkeiten, mit hoher Sensitivität und nicht-invasiv die komplexe Dynamik auf der Oberfläche lebender Zellen und möglicherweise sogar von individuellen Einzelzellen zu analysieren. Dabei könnten womöglich sogar dynamische Prozesse wie die Endocytose und Exocytose von fluoreszenzmarkierten Einzelmolekülen gemessen werden.

5.4.4 Weitere Anwendungsmöglichkeiten von SPFS an lebenden Zellen

Im Unterschied zur etablierten Methode der Totalen Internen Reflektions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) (Ambrose 1961), (McCutchen 1964), (Stout 1989), welche auf einem evaneszenten Feld durch die Einstrahlung eines Lasers auf eine Glasoberfläche basiert, wird bei SPFS die Anregung von Oberflächenplasmonen auf einer Goldoberfläche zur Erzeugung des evaneszenten Felds verwendet. Diese Versuchsanordnung bietet vielfältige weitere Anwendungsmöglichkeiten der SPFS an lebenden Zellen. Die Verwendung der Goldoberfläche ermöglicht die spezifische thiolvermittelte Chemisorption von Molekülen, wodurch eine definierte Schicht aufgebaut werden kann. Anhand des Modus der Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR) können diese wohldefinierten strukturierten Oberflächen überprüft werden, wobei anschließend in dem identischen Versuchsaufbau lebende Zellen mittels SPFS charakterisiert werden können. Da selbst

Fokalkontakte lebender Zellen einen Abstand von 10-15 nm zu einer Substratoberfläche aufweisen (Alberts 1989), (Iwanaga 2001), kann das Phänomen des Förstertransfers, der zwischen Fluorophoren und einer Metalloberfläche innerhalb einer Distanz von 10 nm stattfindet, zwar nicht zur Abstandsbestimmung von adhärierenden Zellen verwendet werden. Eine Abstandsbestimmung fluoreszenzmarkierter lebender Zellen von dem jeweiligen Substrat wäre jedoch unter der Verwendung des evaneszenten Felds denkbar. Weiterhin könnte die Interaktion lebender Zellen mit einer auf der Goldoberfläche aufgebauten artifiziellen Membran mit inkorporierten Rezeptormolekülen analysiert werden.

Die Verwendung eines identischen Versuchsaufbaus für verschiedenartige Analysen an lebenden Zellen erleichtert den Vergleich der gewonnenen Daten, da Artefakte durch den Transport, unterschiedliche Faktoren in der Umgebung der Zellen wie Temperatur oder Luftfeuchtigkeit oder ein variables Verhalten der Zellen auf verschiedenen Substratoberflächen vermieden werden können. Mittels unterschiedlicher Wellenlängen des eingestrahnten Lichts kann zusätzlich die jeweils gewünschte Ausbreitung des von Oberflächenplasmonen erzeugten evaneszenten Felds moduliert werden. Bei den SPFS-Messungen an lebenden Zellen ist von Vorteil, daß bei einer eingestrahnten geringen Laserleistung, von der für die verwendeten biologischen Materialien keine schädigende Wirkung beobachtet wurde, ein starkes evaneszentes Feld generiert werden kann. Sofern bei Winkelstellungen gemessen wird, bei denen die eingestrahlte Lichtleistung auf das Plasmon übertragen wird, werden die lebenden Zellen nur an ihrer adhärierenden Membran von dem evaneszenten Feld belichtet. Dadurch ist bei einer geringen Toxizitätswirkung eine sensitive Detektion der Interaktion von Molekülen auf der Oberfläche lebender Zellen möglich.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden molekulare Interaktionen an biofunktionalisierten Grenzflächen in zwei unterschiedlichen Ansätzen analysiert. Zum einen wird an einer artifiziellen Modellmembran mit inkorporierten Zelladhäsionsrezeptoren Integrin $\alpha_v\beta_3$ deren unterschiedliche Bindung an photoschaltbaren Peptidliganden mit Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) nachgewiesen. Weiterhin wird das Verfahren der SPFS erstmals an lebenden Zellen angewendet, um die Insertion von heterolog exprimiertem Rhodopsin als Modell eines Membranproteins in die Plasmamembran zeitaufgelöst zu detektieren.

Im ersten Teil der Arbeit wird gezeigt, daß die synthetischen Peptid-Stereoisomere, welche das RGD-Bindungsmotiv beinhalten, unterschiedlich stark an natives Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden. Dabei wird der Einfluß der Konformation und der die RGD-Sequenz umgebenden Aminosäurereste auf die Bindungsaffinität der Peptide eindeutig nachgewiesen.

Der direkte Vergleich der Bindungsaffinitäten von RGD-Peptiden mit identischer Aminosäuresequenz, aber unterschiedlicher Konformation ist durch die enthaltene 4-Aminomethyl-Phenylazobenzoe-Säure (AMPB) möglich, welche bei Belichtung mit definierten Wellenlängen die isomeren Konformationen *cis* bzw. *trans* einnimmt. Diese Photoisomerisierung überträgt sich auf die gesamte Konformation der zyklischen Peptide. Die Bindungsmessungen der Integrinrezeptoren an die Peptidliganden erfolgen mittels der hochsensitiven Methode der SPFS, welche auf der Fluoreszenzverstärkung von Chromophor-gekoppelten Peptiden bzw. Antikörpern innerhalb eines evaneszenten Felds basiert (Neumann 2002). Dabei wird die Funktionalität der nativen Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren durch deren Integration in eine artifizielle peptidunterstützte Membran gewährleistet.

In den SPFS-Messungen wird für beide analysierten Peptidliganden, welche als Peptid 1 (c[KARGDFV-AMPB]) und Peptid 2 (c[ARGDFVK-AMPB]) bezeichnet werden, im Gegensatz zu einer bisherigen Studie (Haubner 1997) eine eindeutig höhere Bindungsaffinität des *trans*-Isomers nachgewiesen (Milbradt 2005). Diese zu dem Faktor 1.33 höhere Affinität des *trans*-Isomers kann dadurch erklärt werden, daß dieses Isomer bereits in Lösung eine ähnliche Konformation wie im Komplex mit Integrin aufweist, wodurch die Integrinbindung leichter erfolgt (Schütt 2003). Die höhere Bindungsaffinität des *trans*-Isomers von Peptid 1 bezüglich dessen *cis*-Isomer wird unabhängig von der vermessenen Integrin-funktionalisierten Membran oder der Meßreihenfolge bestätigt (Schütt 2003). Ein weiteres Ergebnis ist die signifikant stärkere Bindung beider Isomere des Peptids 1 relativ zu Peptid 2 um den Faktor

4.41 in der *cis*-Konformation bzw. um den Faktor 2.76 in der *trans*-Konformation (Milbradt 2005). Diese stärkere Bindung resultiert aus der Veränderung einer einzigen Position in der Peptidsequenz.

Weiterhin wird gezeigt, daß ein als Negativkontrolle gedachtes zyklisches Peptid ohne RGD-Sequenz (c[K-**AMPB**-KCATCDKK]) zwar nicht an die Integrin-funktionalisierte Membran bindet, aber unerwartet die Bindungsfähigkeit der Integrinmoleküle irreversibel beeinflusst. Dieser Effekt könnte aus einer Interaktion der vier Lysin-Reste des Kontroll-Peptids mit der artifiziellen Membran resultieren, welche eine Verstärkung der mit Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (SPR) nicht detektierbaren Defekte der Lipiddoppelschicht bewirken könnte. Die dadurch veränderte Membranumgebung könnte eine teilweise Inaktivierung der Integrinmoleküle induzieren.

Ein weiterer irreversibler Funktionsverlust der Integrinmoleküle wird nach der direkten Belichtung von fluoreszenzmarkiertem Peptid 1 im Komplex mit Integrin nachgewiesen. Eine Abtrennung der ungebundenen Fluorophore könnte die Isomerisierbarkeit der Liganden verbessern und dadurch die Belichtungszeit erheblich verkürzen, was die direkte Photoschaltung von Peptiden im Komplex mit Integrin ohne dessen Funktionsverlust ermöglichen könnte. Die aus diesen Experimenten gewonnenen Informationen könnten zu einer Weiterentwicklung zu der photoschaltbaren Adhäsion von lebenden Zellen führen. Die in dieser Arbeit mit SPFS eindeutig gemessene Selektivität stereospezifischer Bindung von RGD-Peptiden an Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt einen Einblick in die molekularen Grundlagen der Integrinbindung an Liganden mit dem RGD-Motiv sowie wichtige Informationen für das Erstellen von selektiven Integrin-Inhibitoren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird das Verfahren der SPFS erstmals an lebenden Zellen angewendet (Krupka, in Vorbereitung). Damit ist die Analyse von Membranproteinen innerhalb der Komplexität lebender Organismen möglich, wobei ausschließlich die adhärierende Membran der untersuchten Zellen beleuchtet wird. Dadurch können die bei der üblichen Methode der Fluoreszenzmikroskopie auftretenden zellschädigenden Photooxidationsprozesse (König 2000), (Dixit 2003) weitgehend umgangen werden.

Zum Nachweis der Sensitivität und Spezifität der SPFS wird die Expression von Rinderrhodopsin als Modell eines Membranproteins in lebenden Zellen zeitaufgelöst detektiert. Die Rinderrhodopsinexpression wird mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie an lebenden und fixierten Zellen kontrolliert. Im Vergleich mit der Fluoreszenzmikroskopie werden bei SPFS deutlich weniger Hintergrundsignale aus dem Zytosol gemessen, da nur Fluoreszenzsignale innerhalb des etwa 100 nm in die untersuchten Zellen dringenden evaneszenten Felds detektiert werden.

Eine Kombination der SPFS mit einem Mikroskop könnte Messungen an einer einzelnen Zelle ermöglichen. Dabei könnte mit SPFS die Bindung dieser Zelle an eine mit SPR wohldefinierte Oberfläche analysiert werden. Diese Oberfläche könnte z.B. aus einer artifiziellen Membran mit inkorporierten Rezeptormolekülen bestehen. Ohne eine

Veränderung des Versuchsaufbaus könnte mittels SPFS die Bindung von lebenden Zellen an diese Rezeptormoleküle sowie eine dadurch induzierte Expression von Membranproteinen zeitaufgelöst detektiert werden. Weiterhin wäre eine Abstandsbestimmung adhätierender Zellen durch die Ausnutzung des evaneszenten Felds denkbar. Damit bieten SPFS-Messungen an lebenden Zellen vielfältige Anwendungen innerhalb eines einzigen Versuchsaufbaus, bei denen eine biologische Materialien kaum schädigende geringe Laserleistung durch die Erzeugung eines starken evaneszenten Felds die sensitive Detektion von Molekülen im Bereich der adhätierenden Zellmembran ermöglicht.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1-1: Schematisches Modell einer Zellmembran</i>	2
<i>Abb. 1-2: cis-trans Isomerisierung von Azobenzolverbindungen</i>	4
<i>Abb. 2-1: Schematische Darstellung des Semliki Forest Virus-Expressionssystems.</i>	21
<i>Abb. 2-2: Schematische Darstellung von Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (FLIC)</i>	27
<i>Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Anregung von Oberflächenplasmonen in der Kretschmann-Konfiguration</i>	30
<i>Abb. 3-2: Anregung von Oberflächenplasmonen mit einem Laser einer festen Frequenz durch die Änderung des Einfallswinkels θ_i</i>	31
<i>Abb. 3-3: Chemisorption eines Peptids</i>	32
<i>Abb. 3-4: Plasmonenspektroskopische Kinetik-Messung der Adsorption einer Peptidschicht</i>	33
<i>Abb. 3-5: Schematische Darstellung eines elektromagnetischen Feldes, das durch ein Oberflächenplasmon verursacht wird, sowie der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors in diesem Feld</i>	33
<i>Abb. 3-6: Schematische Anordnung der in dieser Arbeit vermessenen Proben</i>	34
<i>Abb. 3-7: Schema des verwendeten Meßaufbaus</i>	35
<i>Abb. 4-1: Struktur der photomodulierbaren Peptidliganden 1 und 2</i>	40
<i>Abb. 4-2: Stabmodelle von Peptid 1 in trans und cis Konformation</i>	41
<i>Abb. 4-3: UV-Vis-Spektren von photoisomerisiertem Peptid 1</i>	42
<i>Abb. 4-4: Molekülstrukturen der mit Cy5-NHS-Ester fluoreszenzmarkierten Peptide 1 und 2</i>	43
<i>Abb. 4-5: Vergleich der UV-Vis Spektren von Peptid 1 und Peptid 1-Cy5 nach jeweils 20 min Belichtungszeit</i>	44
<i>Abb. 4-6: Schematisches Modell einer artifiziellen peptidunterstützten Membran mit dem inkorporiertem Integrin $\alpha_v\beta_3$-Rezeptor</i>	46
<i>Abb. 4-7: Chemisorption des Lamininpeptids an die Goldoberfläche</i>	47
<i>Abb. 4-8: Ankopplung von DMPE an die aktivierte Carboxygruppe des Thiopeptids.</i>	47

<i>Abb. 4-9: Schematische Darstellung der Vesikelspreitung.</i>	48
<i>Abb. 4-10: Plasmonenspektroskopische Kinetikmessung des Aufbaus einer artifiziellen Membran mit inkorporiertem Integrin $\alpha_V\beta_3$.</i>	50
<i>Abb. 4-11: Vergleich der SPFS-Messungen der Bindungen von Peptid 1 und 2 in cis- bzw. trans-Konformation an einer artifiziellen Integrin-funktionalisierten Membran</i>	52
<i>Abb. 4-12: Darstellung der lokalen Fluoreszenzmaxima von Peptid 1 und 2 in cis bzw. trans-Konformation</i>	53
<i>Abb. 4-13: Orientierung der Seitenketten von komplexiertem c[RGDfMV] und freiem Peptid 1 in trans-Konformation</i>	54
<i>Abb. 4-14: SPFS-Messung einer artifiziellen, Integrin- funktionalisierten Membran auf einer Goldoberfläche vor und nach dem Abspülen nach der Inkubation mit einem zyklischen Kontrollpeptid ohne Bindungssequenz c[K-AMPB-KCATCDKK]</i>	55
<i>Abb. 4-15: Verringerte Bindung von Peptid1-trans-Isomer nach Abspülen der Negativkontrolle</i>	56
<i>Abb. 4-16: SPFS-Messungen von Peptid 1 in trans-Konformation, welches an Integrin gebunden ist sowie nach Inkubation mit EDTA für 2 h bzw. für 4 h</i>	58
<i>Abb. 4-17: SPFS-Messungen von Peptid 1 in cis- sowie trans-Konformation auf einer 4 Tage alten, Integrin $\alpha_V\beta_3$-funktionalisierten artifiziellen Membran</i>	59
<i>Abb. 4-18: Die Heterogenität der SPFS-Messungen der Bindung des Peptid 1-trans-Isomers an Integrin $\alpha_V\beta_3$</i>	61
<i>Abb. 4-19: SPFS-Messungen von Peptid 1-trans-Isomer, welches an eine Integrin-funktionalisierte Membran gebunden ist</i>	62
<i>Abb. 4-20: Darstellung der lokalen Fluoreszenzmaxima der Bindungsmessung von Peptid 1 cis- und trans- Isomeren</i>	65
<i>Abb. 4-21: Durchschnittliche Bindung von Peptid 1 in trans- bzw. cis-Konformation.</i>	65
<i>Abb. 4-22: Vergleich der Bindungsaffinitäten der cis und trans Isomere von Peptid 1 durch die Division der nacheinander gemessenen lokalen Fluoreszenzmaxima.</i>	66
<i>Abb. 4-23: Vergleich der Bindungsaffinitäten der Peptid 1 cis und trans Isomere durch die Division der versetzt gemessenen lokalen Fluoreszenzmaxima.</i>	67
<i>Abb. 4-24: Darstellung von dem Mittelwert und den Standardabweichungen von SPFS-Messungen, die jeweils die Bindung von Peptid 1 darstellen.</i>	68
<i>Abb. 4-25: Kristallstruktur der Bindungstasche von Integrin $\alpha_V\beta_3$ im Komplex mit dem Peptid c[Arg-Gly-Asp-D-Phe-(Me)Val-]</i>	73
<i>Abb. 4-26: Vergleich der Bindung der untersuchten Peptidisomere an die Bindungstasche des Integrin $\alpha_V\beta_3$</i>	74
<i>Abb. 4-27: Peptid 3, welches eine optimierte Peptidsequenz für die Bindung an Integrin $\alpha_V\beta_3$ enthält</i>	75
<i>Abb. 4-28: Modellierter Struktur des Bindungskomplexes von Peptid 3 mit Integrin $\alpha_V\beta_3$</i>	76
<i>Abb. 4-29: Modellvorstellung der Photoschaltung der Adhäsion lebender Zellen.</i>	77

<i>Abb. 5-1: Schema der Detektion von Rhodopsin in einer lebenden Zelle mit SPFS</i>	80
<i>Abb. 5-2: Schema der zeitabhängigen Detektion von Rhodopsin in einer lebenden Zelle mit SPFS</i>	81
<i>Abb. 5-3: Exemplarisches RNA-Gel mit aufgetragenen pSFV-Transkripten.</i>	82
<i>Abb. 5-4: Beobachteter Unterschied in den Transkriptlängen von pSFVlacZ (β-Galactosidase), pSFV Helfer2 und pSFVcapVSVrhodopsin (VSV-Rhodopsin).</i>	82
<i>Abb. 5-5: Immunofluoreszenzfärbung von fixierten BHK-Zellen, welche über Nacht Rinderrhodopsin mit C-terminalem His₆-tag exprimieren.</i>	83
<i>Abb. 5-6: Immunoblot einer Plasmamembranpräparation aus BHK-Zellen mit anti-VSV-Antikörper und POD-markiertem anti-Maus-Antikörper</i>	84
<i>Abb. 5-7: CLSM-Aufnahme von fixierten, über Nacht Rinderrhodopsin exprimierenden P19-Zellen</i>	85
<i>Abb. 5-8: Lebende BHK-Zelle auf einem FLIC-Chip</i>	87
<i>Abb. 5-9: Lebende P19-Zelle auf einem FLIC-Chip</i>	87
<i>Abb. 5-10: Quantitative Auswertung der FLIC-Messungen an P19- und BHK-Zellen</i>	88
<i>Abb. 5-11: Schema der Größenverhältnisse von SPFS an lebenden Zellen</i>	88
<i>Abb. 5-12: Die Kultivierung von BHK-Zellen in Kulturmedium auf goldbeschichteten Glassubstraten</i>	89
<i>Abb. 5-13: Repräsentative SPFS-Messung, bei der Rinderrhodopsin auf einem einzelnen Substrat an verschiedenen Meßpositionen detektiert wird</i>	90
<i>Abb. 5-14: Vergleich der Hintergrundfluoreszenzen vor der Zugabe fluoreszenzmarkierter Antikörper von BHK- bzw. P19-Zellen auf Laminin-beschichteten Substraten</i>	91
<i>Abb. 5-15: Vergleich verschiedener extrazellulärer Matrixproteine zur Verbesserung der Zelladhäsion auf den Substraten</i>	92
<i>Abb. 5-16: Verteilung der BHK-Zellen auf 16 Fibronectin-beschichteten Substraten</i>	94
<i>Abb. 5-17: Zusammenfassung der zeitaufgelösten SPFS-Messungen</i>	95
<i>Abb. 5-18: Zusammenfassung der lokalen Fluoreszenzmaxima der zeitaufgelösten Meßreihe</i>	96
<i>Abb. 5-19: Darstellung der zeitabhängigen SPFS-Meßreihe der Expression von Rinderrhodopsin</i>	97
<i>Abb. 5-20: Vergleich der verwendeten SPFS-Meßmethoden an lebenden Zellen</i>	99
<i>Abb. 5-21: Zeitabhängige SPFS-Meßreihe an einem einzelnen Substrat</i>	100
<i>Abb. 5-22: Diagramm der bei der Zeitreihe an einem einzelnen Substrat jeweils im Resonanzwinkel gemessenen Fluoreszenz</i>	101
<i>Abb. 5-23: Nachweis der Expression von β-Galactosidase in der Zeitreihe der Negativkontrolle</i>	102
<i>Abb. 5-24: Fluoreszenzmikroskopisch zeitaufgelöst detektierte Expression von Rinderrhodopsin in fixierten Zellen</i>	103
<i>Abb. 5-25: Anfärbung nicht infizierter Zellen mit den verwendeten Antikörpern</i>	104
<i>Abb. 5-26: Fluoreszenzmikroskopisch zeitaufgelöst detektierte Expression von Rinderrhodopsin in lebenden Zellen</i>	106
<i>Abb. 5-27: Anfärbung nicht infizierter Zellen mit den verwendeten Antikörpern</i>	107

<i>Abb. 5-28: Vergleich der zeitaufgelösten fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Rinderrhodopsinexpression in lebenden und fixierten BHK-Zellen</i>	107
<i>Abb. 5-29: Schematische Darstellung der Biosynthese von Rinderrhodopsin mit dem SFV-System</i>	110
<i>Abb. 5-30: Jeweilige Gesamtintensität der fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen der Expression von Rhodopsin und β-Galaktosidase in lebenden und fixierten Zellen</i>	113
<i>Abb. 5-31: Gesamtintensitäten der mittels SPFS detektierten Fluoreszenz von heterolog Rhodopsin exprimierenden lebenden Zellen</i>	115

7.2 Abkürzungsverzeichnis

2P-LSM	2 Photonen-Laser Scanning Mikroskop
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
ADMIDAS	zusätzliche MIDAS
AMPB	4-Aminomethyl-Phenylazobenzoe-Säure
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Au	Gold
Bp	Basenpaar
Bidest.	Bidestilliert
BHK	Baby Hamster Kidney
BSA	bovines Serum Albumin
c	Geschwindigkeit
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD	charge-coupled device
CLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
cps	counts per second
Cy5	Cyanin5 (Fluoreszenzfarbstoff, Molecular Probes)
Cys	Cystein
D	Aspartat
Δ	Differenz
DMPE	Dimyristoyl-Phosphatidyl-Ethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
E	Energie
ϵ	Extinktionskoeffizient
ECM	extrazelluläre Matrix
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -Dimethylaminopropyl-Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
f	Brennweite
F	Phenylalanin
FLIC	Fluoreszenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (je nach Kontext)
G	Glycin
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde(n)
ħ	Planck'sches Wirkungsquantum
HDOR	Humaner Delta Opioid Rezeptor
He	Helium
His ₆ -tag	Peptidmarkierung aus 6 Histidinen
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
J	Joule
k	Wellenvektor
K	Lysin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Broth
λ	Wellenlänge
M	Molar
mbar	Millibar
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MIDAS	metal-ion dependent adhesion site
min	Minute
MilliQ	MilliQ-aufbereitetes Wasser
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mW	Milliwatt
n	Brechungsindex
NHS	<i>N</i> -Hydroxy-Succinimid
Ne	Neon
nm	Nanometer

NMR	Kernmagnetresonanz
p	Impuls
P19	Zelllinie aus einem Mäuseratocarcinom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionenaktivität
p.i.	post infection
pmol	Pikomol
θ	Winkel
θ_c	kritischer Winkel
θ_i	bestimmter Einfallswinkel
θ_{SPP}	Resonanzwinkel
R	Reflexion bzw. Reflexivität bzw. Arginin (je nach Kontext)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SFV	Semliki Forest Virus
Si	Silicium
SPFS	Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (surface plasmon fluorescence enhanced spectroscopy)
SPP	Oberflächenplasmon-Polariton
t	Zeit
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt bzw. Valin (kontextbezogen)
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbar
VSV	Vesikulärer Stomatitis Virus
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
ω	Frequenz
w/v	Masse pro Volumen

w/w	Masse pro Masse
X-Gal	5-Brom-3-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde(n)
\hbar	Planck'sches Wirkungsquantum
HDOR	Humaner Delta Opioid Rezeptor
He	Helium
His ₆ -tag	Peptidmarkierung aus 6 Histidinen
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
J	Joule
k	Wellenvektor
K	Lysin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Broth
λ	Wellenlänge
M	Molar
mbar	Millibar
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
MIDAS	metal-ion dependent adhesion site
min	Minute
MilliQ	MilliQ-aufbereitetes Wasser
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mW	Milliwatt
n	Brechungsindex
NHS	<i>N</i> -Hydroxy-Succinimid
Ne	Neon
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetresonanz
p	Impuls
P19	Zelllinie aus einem Mäuseteratocarcinom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionenaktivität
p.i.	post infectionem
pmol	Pikomol
θ	Winkel
θ_c	kritischer Winkel
θ_i	bestimmter Einfallswinkel
θ_{SPP}	Resonanzwinkel
R	Reflexion bzw. Reflexivität bzw. Arginin (je nach Kontext)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SFV	Semliki Forest Virus
Si	Silicium
SPFS	Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (surface plasmon fluorescence spectroscopy)
SPP	Oberflächenplasmon-Polariton
SPR	Oberflächenplasmon
t	Zeit
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt bzw. Valin (kontextbezogen)
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbar
VSV	Vesikulärer Stomatitis Virus
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
ω	Frequenz
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
X-Gal	5-Brom-3-Chlor-3-Inoyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

vgl.	vergleiche
VIS	sichtbar
VSV	Vesikulärer Stomatitis Virus
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
ω	Frequenz
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
X-Gal	5-Brom-3-Chlor-3-Inoyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

7.3 Literaturverzeichnis

- Abels C, Fickweiler S, Weiderer P, Baumler W, Hofstadter F, Landthaler M, Szeimies RM (2000). Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch Dermatol Res.* 292(8): 404-11.
- Almers W, Steyer JA. (2001). A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 268 -275.
- Ambrose, EJ (1961). The movements of fibrocytes. *Exp. Cell Res.* 8, 54-73.
- Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. (2002). Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr Opin Cell Biol.* 14(5): 641-51.
- Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. (2002). Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion. *Immunol Rev.* 186: 125-40.
- Arrio-Dupont M, Foucault G, Vacher M, Devaux PF, Cribier S. (2000). Translational diffusion of globular proteins in the cytoplasm of cultured muscle cells. *Biophys J.* 78(2): 901-7.
- Attridge JW, Daniels PB, Deacon JK, Robinson GA, Davidson GP (1991). Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface plasmon resonance fluoroimmunoassay. *Biosensors and Bioelectronics* 6(3): 201-214.
- Aumailley M, Gurrath M, Muller G, Calvete J, Timpl R, Kessler H. (1991). Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* 291(1):50-4.
- Becher A, McIlhinney RA (2005). Lipids, Rafts and Traffic: Chapter 15 - Consequences of lipid raft association on G-protein-coupled receptor function. *Biochem Soc Symp.* (72):151-64.
- Berglund P, Sjoberg M, Garoff H, Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljestrom P. (1993). Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology (N Y).* 11(8):916-20.

- Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23.
- Bledi Y, Inberg A, Linial M. (2003). PROCEED: A proteomic method for analysing plasma membrane proteins in living mammalian cells. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2(3): 254-65.
- Blystone SD, Williams MP, Slater SE, Brown EJ. (1997). Requirement of Integrin $\alpha 3$ Tyrosine 747 for $\alpha 3$ Tyrosine Phosphorylation and Regulation of $\alpha v \beta 3$ Avidity. *J. Biol. Chem.* 272: 28757-28761.
- Blystone SD, Graham I, Lindberg FP, Brown EJ (1994). Integrin $v \beta 3$ differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor $\alpha 5 \beta 1$. *The Journal of Cell Biology,* 127: 1129-1137.
- Boettiger D, Lynch L, Blystone S, and Huber F (2001). Distinct Ligand-binding Modes for Integrin $\alpha v \beta 3$ -Mediated Adhesion to Fibronectin versus Vitronectin. *J. Biol. Chem.,* 276 (34): 31684-31690.
- Bokel C, Brown N. (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell.* 3(3):311-21.
- Boonacker E, Stap J, Koehler A, Van Noorden CJ. (2004). The need for metabolic mapping in living cells and tissues. *Acta Histochem.* 106(2):89-96.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Braun D, Fromherz P. (1997). Fluorescence Interference-Contrast Microscopy of Cell Adhesion on Oxidized Silicon. *Applied Physics A* 65:341-348.
- Brehm-Stecher BF, Johnson E. (2004). Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 8(3):538-59.
- Brown JK, Pemberton AD, Wright SH and Miller HRP (2004). Primary Antibody–Fab Fragment Complexes : A Flexible Alternative to Traditional Direct and Indirect

- Immunolabeling Techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 52 (9): 1219-1230
- Buehler C, Kim KH, Dong CY, Masters BR, So PT (1999). Innovations in two-photon deep tissue microscopy. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 18(5):23-30.
- Bunjes N, Schmidt EK, Jonczyk A, Rippmann F, Beyer D, Ringsdorf H, Graber P, Knoll W, Naumann R (1997). Thiopeptide-Supported Lipid Layers on Solid Substrates. *Langmuir* 13, 6188-6194.
- Bunt G, Wouters F. (2004). Visualization of molecular activities inside living cells with fluorescent labels. *Int Rev Cytol.* 237:205-77.
- Burstein E, Chen W, Chen YJ, Hartstein A. (1972). Surface polaritons—propagating electromagnetic modes at interfaces. *J. Vac. Sci. Technol.* 11:100419.
- Campbell ID, Ginsberg M. (2004). The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground. *Trends Biochem Sci.* 29(8):429-35.
- Carrier D, Pezolet M (1986). Investigation of polylysine-dipalmitoyl-phosphatidylglycerol interactions in model membranes. *Biochemistry* 25(14):4167-74.
- Carnegie JA, Cabaca O (1993). Extracellular matrix composition and resilience: two parameters that influence the in vitro migration and morphology of rat inner cell mass-derived cells. *Biol Reprod.* 48(2): 287-99.
- Cezanne L, Lopez A, Loste F, Parnaud G, Saurel O, Demange P, Tocanne JF (1999). Organization and dynamics of the proteolipid complexes formed by annexin V and lipids in planar supported lipid bilayers. *Biochemistry.* 38(9): 2779-86.
- Cheresh DA, Eliceiri BP (1999). The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Invest.* 103, 1227.
- Claasen B, Axmann M, Meinecke R, Meyer B. (2005). Direct Observation of Ligand Binding to Membrane Proteins in Living Cells by a Saturation Transfer Double Difference (STDD) NMR Spectroscopy Method Shows a Significantly Higher

- Affinity of Integrin alpha(IIb)beta(3) in Native Platelets than in Liposomes. *J Am Chem Soc* 127(3): 916-9.
- Cornelius F (1991). Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted Na/K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1071, 19–66.
- Cornelius F (2001). Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol. Steady-state kinetics, *Biochemistry* 40: 8842–8851.
- Coronado, R (1986). Recent Advances in Planar Phospholipid Bilayer Techniques for Monitoring ION Channels. *Ann. Reo. Biophys. Biophys. Chem.* 15: 259-77.
- Cremer PS, Boxer SG (1999). Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *J. Phys. Chem. B.* 103: 2554–2559.
- Dard MM, Schaffner P (2003). Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cell Mol Life Sci.* 60(1): 119-32.
- Davies C de L, Berk DA, Pluen A and Jain RK (2002). Comparison of IgG diffusion and extracellular matrix composition in rhabdomyosarcomas grown in mice versus in vitro as spheroids reveals the role of host stromal cells. *British Journal of Cancer* 1639-1644.
- Deverall MA, Gindl E, Sinner EK, Besir H, Ruehe J, Saxton MJ, Naumann CA. (2004). Membrane Lateral Mobility Obstructed by Polymer-Tethered Lipids Studied at the Single Molecule Level. *Biophys J* 88(3):1875-86.
- Diederich A, Bahr G, and Winterhalter M (1998). Influence of polylysine on the rupture of negatively charged membranes. *Langmuir.* 14: 4597–4605.
- Dixit R, Cyr R. (2003). Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *Plant J.* 36(2): 280-90.
- Dopheide SM, Yap CL, Jackson SP (2001). Dynamic aspects of platelet adhesion under flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28(5-6): 355-63.

- Ekgasit S, Thammacharoen C, Yu F, Knoll W (2004). Evanescent field in surface plasmon resonance and surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopies. *Anal Chem.* 76(8): 2210-9.
- Ekroos K, Ejsing CS, Bahr U, Karas M, Simons K, Shevchenko A (2003). Charting molecular composition of phosphatidylcholines by fatty acid scanning and ion trap MS3 fragmentation. *J Lipid Res.* 44(11): 2181-92.
- Ferreira PA, Hom J, Pak WL (1995). Retina-specifically expressed novel subtypes of bovine cyclophilin. *J Biol Chem.* 270(39): 23179-88.
- Fierens FL, Vanderheyden P, Roggeman C, Vande Gucht P, De Backer JP, Vauquelin G (2002). Distinct binding properties of the AT(1) receptor antagonist [(3)H]candesartan to intact cells and membrane preparations. *Biochem Pharmacol.* 63(7):1273-9.
- Förster, T (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann.Phys.* 2: 55-75.
- Franzin CM, Macdonald PM (2001). Polylysine-induced 2H NMR-observable domains in phosphatidylserine/phosphatidylcholine lipid bilayers. *Biophys J.* 81(6): 3346-62.
- Fullekrug J, Simons K (2004). Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann N Y Acad Sci.* 1014:164-9.
- Füreder-Kitzmüller JH, Ebner A, Gruber HJ, Schütz G (2005). Non-exponential bleaching of single bioconjugated Cy5 molecules. *Chemical Physics Letters* 404: 13–18.
- Furdon PJ, Kole R (1987). RNA fingerprinting using a small horizontal agarose gel electrophoresis apparatus. *Anal Biochem.* 162(1):74-9.
- Galla HJS, Sackmann E (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 401, 509.
- Giebel K, Bechinger C, Herminghaus S, Riedel M, Leiderer P, Weiland U, Bastmeyer M. (1999). Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy. *Biophys J.* 76: 509-16.

- Giess F, Friedrich MG, Heberle J, Naumann RL, Knoll W (2004). The protein-tethered lipid bilayer: a novel mimic of the biological membrane. *Biophys J.* 87(5): 3213-20.
- Gleixner, R (2004). Fluoreszenzspektroskopische Messung des spezifischen Elektrolytwiderstands in der Adhäsionsregion des Neuron-Silizium-Kontakts. Dissertation, Technische Universität München.
- Gottschalk K-E, Kessler H (2002). The structures of integrins and integrin-ligand complexes: Implications for drug design and signal transduction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 3767–3774.
- Gumbiner B (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84(3): 345-57.
- Halbhuber KJ, König K (2003). Modern laser scanning microscopy in biology, biotechnology and medicine. *Ann Anat.* 185(1):1-20.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4): 557-80.
- Haubner R, Finsinger D, Kessler H (1997). Stereoisomeric Peptide Libraries and Peptidomimetics for Designing Selective Inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ Integrin for a New Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition in English* 36 (13-14): 1374 - 1389.
- Heilemann M, Margeat E, Kasper R, Sauer M, Tinnefeld P (2005). Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J Am Chem Soc.* 127(11): 3801-6.
- von Heijne G (1999). A Day in the Life of Dr K. or How I Learned to Stop Worrying and Love Lysozyme: a tragedy in six acts. *J. Mol. Biol.* 293, 367-379.
- Helgeland K, Reistad R (1967). Effect of actinomycin D in tissue culture cells: an altered DNA distribution after extraction with phenol or chloroform-butanol. *Biochim Biophys Acta.* 145(1): 214-7.

- Heymann JA, Subramaniam S (1997). Expression, stability, and membrane integration of truncation mutants of bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(10):4966-71.
- Holly SP, Larson M., Parise LV (2000). Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res.* 261(1): 69-74.
- Hölscher K (1999). Heterologe Expression von Insekten- und Rinderopsin unter Verwendung des Semliki Forest Virus-Expressionssystems. Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg.
- Humphries MJ, Mould AP (2004). Cell biology: Adhesion articulated. *Nature* 432, 27 - 28.
- Humphries MJ, Mould AP, Barton SJ, Buckley PA, Bella J, Mould AP (2003). Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci.* 28(6): 313-20.
- Hurley JH (2003). Membrane Proteins: Adapting to Life at the Interface. *Chemistry and Biology* 10 (1): 2-3.
- Hynes R (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48(4):549-54.
- Hynes R (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6):673-87.
- Hynes RO (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *CELL* 69 (1): 11-25.
- Ilag L 2003. Direct methods for modulating protein function. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 6(2): 262-8.
- Ilegems E, Pick HM, Deluz C, Kellenberger S, Vogel H (2004). Noninvasive imaging of 5-HT3 receptor trafficking in live cells: from biosynthesis to endocytosis. *J Biol Chem.* 279(51): 53346-52.
- Iwanaga Y (2000). Cell-substrate distance measurement in correlation with distribution of adhesion molecules by fluorescence microscopy. Dissertation, Technische Universität München.

- Iwanaga Y, Braun D, Fromherz P (2001). No correlation of focal contacts and close adhesion by comparing GFP-vinculin and fluorescence interference of Dil. *Eur Biophys J.* 30(1): 17-26.
- Izzard CS, Lochner LR (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci.* 21(1): 129-59.
- Jaeschke H, Lemasters JJ (2003). Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology.* 125(4): 1246-57.
- Javitch JA (2004). Finding needles in haystacks. *Nature Biotechnology* 22, 394 - 396.
- Jin H, Varner J (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer* 90, 561 – 565.
- Johannsson A, Smith GA and Metcalfe JC (1981). The effect of bilayer thickness on the activity of Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 641, 416–421.
- Jou MJ, Jou SB, Guo MJ, Wu HY, Peng TI (2004). Mitochondrial reactive oxygen species generation and calcium increase induced by visible light in astrocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1011: 45-56.
- Jung LS, Campbell CT, Chinowsky TM, Mar MN, Yee SS (1998). Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir*, 14 (19), 5636 -5648.
- Palczewski TK, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, H. Motoshima, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–745.
- Kieft IE, Broers JL, Caubet-Hilloutou V, Slaaf DW, Ramaekers FC, Stoffels E. (2004). Electric discharge plasmas influence attachment of cultured CHO K1 cells. *Bioelectromagnetics* 25(5): 362-8.
- Knight MM, Roberts SR, Lee DA, Bader DL (2003). Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: 1083-1089

- Knoll, W (1998). Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annu Rev Phys Chem.* 49: 569-638.
- Knoll W, Frank CW, Heibel C, Naumann R, Offenhausser A, Ruhe J, Schmidt EK, Shen WW, Sinner A (2000). Functional tethered lipid bilayers. *J Biotechnol.* 74(3): 137-58.
- König K (2000). Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc.* 200: 83-104.
- König K, Krasieva T, Bauer E, Fiedler U, Berns MW, Tromberg BJ, Greulich KO (1996). Cell damage by UVA radiation of a mercury microscopy lamp probed by autofluorescence modifications, cloning assay, and comet assay. *J. Biomed. Optics*, 1 (2), 217-222.
- Konstantopoulos K, Kukreti S, McIntire LV (1998). Biomechanics of cell interactions in shear fields. *Adv Drug Deliv Rev.* 33(1-2):141-64.
- Kraljic I (1986). Detection of singlet oxygen and its role in dye-sensitized photooxidation in aqueous and micellar solutions. *Biochimie* 68(6):807-11.
- Kretschmann E (1971). *Z. Physik* 241: 313.
- Kretschmann E, Raether H (1968). Radiative decay of nonradiative surface plasmon excited by light. *Z.Naturf.* 23A: 2135-2136.
- de Kruijff B, Rietveld A, Telders N, Vaandrager B (1985). Molecular aspects of the bilayer stabilization induced by poly(L-lysines) of varying size in cardiolipin liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 820(2): 295-304.
- Krutzik PO, Nolan GP (2003). Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry A.* 55(2):61-70.
- Kuhn K, Eble J (1994). The structural bases of integrin-ligand interactions. *Trends Cell Biol.* 4(7): 256-61.
- Kwon G, Axelrod D, Neubig RR (1994). Lateral mobility of tetramethylrhodamine (TMR) labelled G protein alpha and beta gamma subunits in NG 108-15. *Cell. Signalling* 6, 663-679.

- Laemmli U (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-5.
- Lakowicz J (2004). Radiative decay engineering 3. Surface plasmon-coupled directional emission. *Anal Biochem.* 324(2): 153-69.
- Lambacher A, Fromherz P (1996). Fluorescence Interference-Contrast Microscopy on Oxidized Silicon using a Monomolecular Dye Layer. *Applied Physics A* 63: 207-216.
- Lambacher A, Fromherz P (2002). Luminescence of dye molecules on oxidized silicon and fluorescence interference contrast microscopy of biomembranes. *Journal of the Optical Society of America B* 19: 1435-1453.
- Lawall R (1992). Oberflächenplasmonen-optische Untersuchungen an asymmetrischen Seifenfilmen, Dissertation, Universität Mainz.
- Lednev IK, Ye T-Q, Hester RE, Moore JN (1996). Femtosecond time-resolved UV-visible absorption spectroscopy of trans-azobenzene in solution. *J. Phys. Chem.* 100, 13338-13341.
- Li E, Hristova K (2004). Imaging Förster resonance energy transfer measurements of transmembrane helix interactions in lipid bilayers on a solid support. *Langmuir.* 20(21): 9053-60.
- Liebermann T, Knoll W (2000). Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 171: 115–130.
- de Lima Santos H, Lopes ML, Maggio B, Ciancaglini P (2005). Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 41(4): 239-48.
- Liljestrom P, Garoff H (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y).* 9(12): 1356-61.
- Lindl, T (2000). Zell- und Gewebekultur, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin.

- Liu D, Karanicolas J, Yu C, Zhang Z, Woolley GA (1997). Site-specific incorporation of photoisomerizable azobenzene groups into ribonucleases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 2677-2680.
- Locardi E, Mullen DG, Mattern RH, Goodman M (1999). *J Pept Sci* 1999, 5, 491-506.
- Löweneck M (2005). Synthese lichtschtbarer Azobenzol-enthaltender Peptide und deren biophysikalische Charakterisierung. Dissertation, Technische Universität München.
- Lu M, Echeverri F, Moyer BD (2003). Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic.* 4(6): 416-33.
- Lu X, Lu D, Scully MF, Kakkar VV (2003). Modulation of integrin-binding selectivity by mutation within the RGD-loop of snake venom proteins: a novel drug development approach. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 1(2): 189-96.
- Lundstrom K, Schweitzer C, Rotmann D, Hermann D, Schneider EM, Ehrenguber MU (2003). Novel semliki forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. *Mol Ther.* 7(2): 202-9.
- Lundstrom K (2003). Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1610(1): 90-6.
- Lundstrom K, Mills A., Buell G, Allet E, Adami N, Liljestrom P (1994). High-level expression of the human neurokinin-1 receptor in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. *Eur J Biochem.* 224(3): 917-21.
- Lundstrom K, Schweitzer C, Rotmann D, Hermann D, Schneider EM, Ehrenguber MU (2001). Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Lett.* 504(3): 99-103.
- Luo BH, Springer TA, Takagi J (2003). High affinity ligand binding by integrins does not involve head separation. *J Biol Chem.* 278(19): 17185-9.

- Luttrell DK, Lutrell LM (2003). Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases. *Assay Drug Dev Technol.* 1(2): 327-38.
- MacPherson I, Stoker M (1962). Polyoma transformation of hamster cell clones--an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology.* 16:147-51.
- Maeda T, Imanishi Y, Palczewski K (2003). Rhodopsin phosphorylation: 30 years later. *Prog Retin Eye Res.* 22(4): 417-34.
- Manes S, Mira E, Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Martinez C (2000). Cells on the move: a dialogue between polarization and motility. *IUBMB Life.* 49(2): 89-96.
- McAteer JA, Davis JM (2002). *Basic Cell Culture Techniques and the maintenance of cell lines.* Davis J, Basic Cell Culture. New York: Oxford University Press.
- McBurney MW, Rogers BJ (1982). Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol.* 89(2): 503-8.
- McCutchen CW (1964). Optical systems for observing surface topography by frustrated total internal reflection and by interference. *The Review of Scientific Instruments* 35, 1340-1345.
- Michnick S (2004). Proteomics in living cells. *Drug Discov Today* 9(6): 262-7.
- Milbradt AG, Löweneck M, Krupka SS, Reif M, Sinner EK, Moroder L, Renner C (2005). Photomodulation of conformational states. IV. Integrin binding RGD-peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent. *Biopolymers* 77(5): 304-13.
- Monastyrskaia K, Goepfert F, Hochstasser R, Acuna G, Leighton J, Pink JR, Lundstrom K (1999). Expression and intracellular localisation of odorant receptors in mammalian cell lines using Semliki Forest virus vectors. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 19, 687-701.
- Morre DM, Morre D (2000). Aqueous two-phase partition applied to the isolation of plasma membranes and Golgi apparatus from cultured mammalian cells. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 743(1-2): 377-87.

- Morrow JF, Berg P (1972). Cleavage of Simian virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69(11): 3365-9.
- Müller G, Gurrath, M., Kurz, M and Kessler H (1993). Beta VI turns in peptides and proteins: a model peptide mimicry. *Proteins* 15, 235–251.
- Nagaraj R, Joseph M, Reddy GL (1987). Perturbation of the lipid bilayer of model membranes by synthetic signal peptides. *Biochim Biophys Acta*. 903 (3): 465-72.
- Nagle JF, Tristram-Nagle S (2000). Lipid bilayer structure. *Curr Opin Struct Biol*. 10(4): 474-80.
- Naumann CA, Prucker O, Lehmann T, Ruhe J, Knoll W, Frank CW (2002). The polymer-supported phospholipid bilayer: tethering as a new approach to substrate-membrane stabilization. *Biomacromolecules* 3(1): 27-35.
- Neumann T, Johansson M-L, Kambhampati D, Knoll W (2002). Surface-Plasmon Fluorescence Spectroscopy. *Adv. Funct. Mater.* 12 (9): 575-586.
- Odell GB, Brown RS, Holtzman NA (1970). Dye-sensitized photooxidation of albumin associated with a decreased capacity for protein-binding of bilirubin. *Birth Defects Orig Artic Ser.*6(2): 31-6.
- Okadaa T, Ernst OP, Palczewski K, Hofmann KP (2001). Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends in Biochemical Sciences* 26(5): 318-324.
- Paunola E, Suntio T, Jamsa E, Makarow M (1998). Folding of active beta-Galactosidase in the yeast cytoplasm before translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 9(4): 817-27.
- Peng TI, Jou MJ (2004). Mitochondrial swelling and generation of reactive oxygen species induced by photoirradiation are heterogeneously distributed. *Ann N Y Acad Sci*. 1011: 112-22.
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Walker P, Bouvier M (2000). Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell

- surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem*; 275(18): 13727-36.
- Peters R (1988). Lateral mobility of proteins and lipids in the red cell membrane and the activation of adenylate cyclase by beta-adrenergic receptors. *FEBS Lett.* 234, 1-7.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 639 -650.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 3-9;309 (5963): 30-3.
- Pilch J, Habermann R, Felding-Habermann B (2002). Unique ability of integrin alpha(v) beta3 to support tumor cell arrest under dynamic flow conditions. *J Biol Chem.* 277 (24): 21930-8.
- Plow EF, Haas TA, Li Zhang, Loftus J, Smith JW (2000). Ligand Binding to Integrins. *J. Biol. Chem.*, 275 (29): 21785-21788.
- Rädler J, Strey H and Sackmann E (1995). Phenomenology and kinetics of lipid bilayer spreading on hydrophilic surfaces. *Langmuir.* 11: 4539–4548.
- Raether H (1988). *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings.* Heidelberg, Springer-Verlag.
- Rau H (1990). *Studies in Organic Chemistry: Photochromism, Molecules and Systems.* Dürr H, Bonas-Laurent H, Amsterdam, Elsevier. 40: 165-192.
- Razin S, Rosansky R (1959). Mechanism of the antibacterial action of spermine. *Arch. Biochem. Biophys.* 81: 36-54.
- Reimhult E, Höök F and Kasemo B (2003). Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* 19: 1681–1691.

- Renner C, Kusebauch U, Loweneck M, Milbradt AG, Moroder L (2005). Azobenzene as photoresponsive conformational switch in cyclic peptides. *J Pept Res.* 65(1): 4-14.
- Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E (1996). Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 47: 555–606.
- Roks AJ, Pinto YM, Paul M, Pries F, Stula M, Eschenhagen T, Orzechowski HD, Gschwendt S, Wilschut J, van Gilst WH (1997). Vectors based on Semliki Forest virus for rapid and efficient gene transfer into non-endothelial cardiovascular cells: comparison to adenovirus. *Cardiovasc Res.* 35(3): 498-504.
- Rossetti FF, Reviakine I, Csucs G, Assi F, Voros J, Textor M (2004). Interaction of poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) with supported phospholipid bilayers. *Biophys J.* 87(3): 1711-21.
- Roux M, Neumann JM, Bloom M, Devaux PF (1988). ²H and ³¹P NMR study of pentyllysine interaction with headgroup deuterated phosphatidylcholine and phosphatidylserine. *Eur Biophys J.* 16(5): 267-73.
- Ruoslahti E, Pierschbacher M D (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238 (4826): 491-497.
- Sackmann E (1996). Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* 271: 43–48.
- Sackmann E, Tanaka M (2000). Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. *Trends Biotechnol.* 18, 58-64.
- Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T (2000). Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol.* 2(3): 168-72.
- Salinovich O, Montelaro RC (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 156(2):341-7.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74 (12): 5463-7.
- Schiller SM, Naumann R, Lovejoy K, Kunz H, Knoll W (2003). Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42(2): 208-11.
- Schmidt EK (1998). Charakterisierung thiopeptidunterstützter Lipidschichten zur Inkorporation von Membranproteinen. Dissertation, Universität Hannover.
- Schmidt EK, Liebermann T, Kreiter M, Jonczyk A, Naumann R, Offenhausser A, Neumann E, Kukol A, Maelicke A, Knoll W (1998). Incorporation of the acetylcholine receptor dimer from *Torpedo californica* in a peptide supported lipid membrane investigated by surface plasmon and fluorescence spectroscopy. *Biosens Bioelectron.* 13(6): 585-91.
- Schmitt J, Durr UM (1970). The differentiation of animal proteins using vertical polyacrylamid gel electrophoresis. 4. Serum proteins of the Carnivora. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 77 (22): 584-7.
- Schneckenburger H (2005). Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Curr Opin Biotechnol.* 16(1):13-8.
- Schütt M, Krupka SS, Milbradt AG, Deindl S, Sinner EK, Oesterhelt D, Renner C, Moroder L. (2003). Photocontrol of cell adhesion processes: model studies with cyclic azobenzene-RGD peptides. *Chem Biol.* 10(6): 487-90.
- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta.* 1666 (1-2):105-17.
- Shav-Tal Y, Singer RH, Darzacq X (2004). Imaging gene expression in single living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(10): 855-61.
- Sims PJ, Ginsberg M, Plow EF, Shattil SJ (1991). Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.*, 266 (12): 7345-7352.
- Singer SJ, Nicolson GL (1972). *Science* 175: 723.

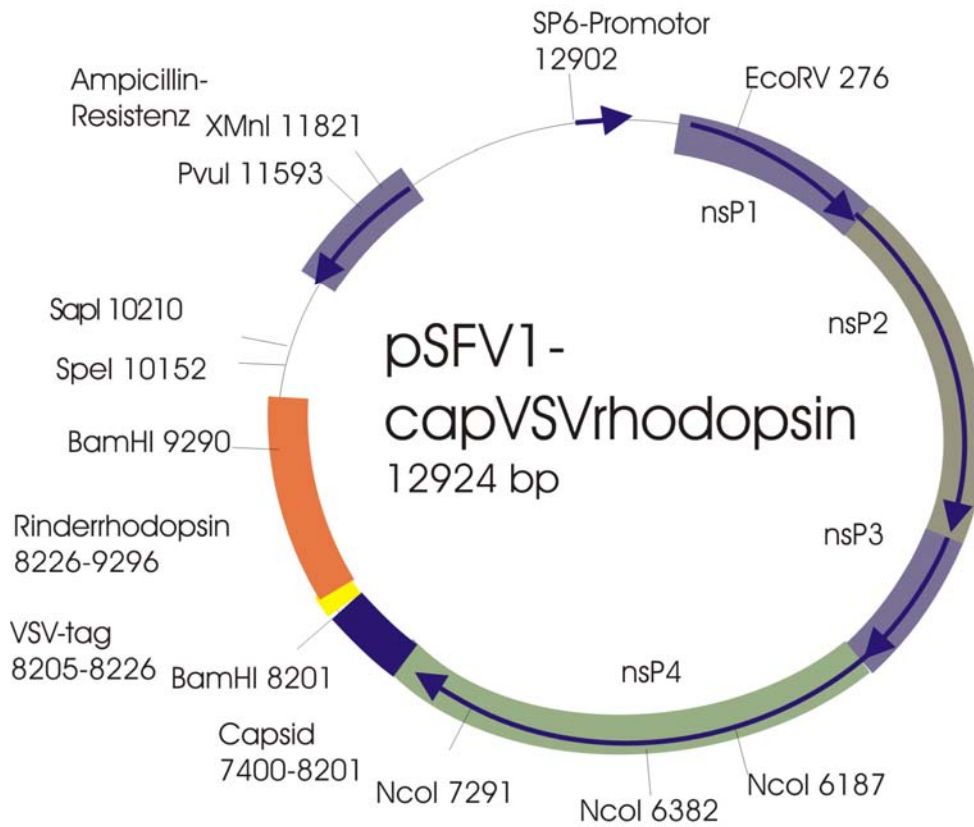
- Sinner EK, Knoll W (2001). Functional tethered membranes. *Curr Opin Chem Biol.* 5(6): 705-11.
- Sinner EK, Reuning U, Kok FN, Sacca B, Moroder L, Knoll W, Oesterhelt D (2004). Incorporation of integrins into artificial planar lipid membranes: characterization by plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. *Anal Biochem.* 333(2): 216-24.
- Sinner EK, Wiltschi B (2003). Erleuchtung für Membranproteine garantiert! *BIOspektrum* 2003/02, 275-7.
- Sjoberg EM, Suomalainen M, Garoff H (1994). A significantly improved Semliki Forest virus expression system based on translation enhancer segments from the viral capsid gene. *Biotechnology (N Y).* 12(11):1127-31.
- Smith AM, Gao X, Nie S (2004). Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging paragraph sign. *Photochem Photobiol.* 80(3): 377-85.
- So PTC, Dong CY, Masters BR, Berland KM (2000). Two-Photon excitation fluorescence microscopy. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2: 399-429.
- Sorribas HB, Leder L, Sonderegger P, Tiefenauer L (2001). Adhesion proteins for a tight neuron–electrode contact. *Journal of Neuroscience Methods* 104: 133–141.
- Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301–314.
- Springer TA, Wang JH (2004). The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Adv Protein Chem.* 68: 29-63.
- Steinberg-Yfrach G, Rigaud JL, Moore AL, Durantini EN, Gust D, Moore TA (1998). Light-driven production of ATP catalysed by F0F1-ATP synthase in an artificial photosynthetic membrane. *Nature* 392, 479 - 482.
- Stevens TJ, Arkin IT (2000). Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins.* 39(4):417-20.

- Stout AL, Axelrod D (1989). Evanescent field excitation of fluorescence by epillumination microscopy. *Applied Optics*, 28(24), 5237-42.
- Stryer, L (1995). *Biochemie*, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Sullivan KF, Shelby R (1999). Using time-lapse confocal microscopy for analysis of centromere dynamics in human cells. *Methods Cell Biol.* 58:183-202.
- Takagi J (2004). Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochem Soc Trans.*32: 403-6.
- Takahashi M, Ogino T, Baba K (1969). Estimation of relative molecular length of DNA by electrophoresis in agarose gel. *Biochim Biophys Acta.* 21;174(1):183-7.
- Torres J, Stevens TJ, Samsó M (2003). Membrane proteins: the ‘Wild West’ of structural biology. *Trends in Biochemical Sciences* 28 (3), 137-144.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24: 145-9.
- Tyrrell RM, Keyse S (1990). New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells. *J Photochem Photobiol B.* 4(4):349-61.
- Underwood PA, Bennett F (1993). The effect of extracellular matrix molecules on the in vitro behavior of bovine endothelial cells. *Exp Cell Res.* 205(2):311-9.
- Ushioda S, Sasaki Y (1983). Raman scattering mediated by surface-plasmon polariton resonance. *Phys. Rev. B* 27, 1401–1404.
- Verma DP, Hong Z (2005). The ins and outs in membrane dynamics: tubulation and vesiculation. *Trends Plant Sci.*10(4):159-65.
- Vos P, Verver J, van Wezenbeek P, van Kammen A, Goldbach R (1984). Study of the genetic organisation of a plant viral RNA genome by in vitro expression of a full-length DNA copy. *EMBO J* 3(13):3049-53.

- Voytik-Harbin SL, Rajwa B, Robinson JP (2001). Three-dimensional imaging of extracellular matrix and extracellular matrix-cell interactions. *Methods Cell Biol* 63: 583-97.
- Wagner ML, Tamm LK (2000). Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophysical Journal* 79(3): 1400-1414.
- Wahlberg JM, Bron R, Wilschut J, Garoff H (1992). Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. *J Virol.* 66(12):7309-18.
- Wald G (1958). Photochemical aspects of visual excitation. *Exp Cell Res.* 14 (Suppl 5): 389-410.
- Wallin E, von Heijne G (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7, 1029–1038.
- White D (1973). The phospholipid composition of mammalian tissues. Ansell G, Hawthorne J, Dawson R. *Form and Function of Phospholipids.* Elsevier, New York, 44182.
- White SH, Ladokhin AS, Jayasinghe S, Hristova K (2001). How Membranes Shape Protein Structure. *J. Biol. Chem.* 276 (35): 32395-32398.
- Wicks R (1986). RNA molecular weight determination by agarose gel electrophoresis using formaldehyde as denaturant: comparison of RNA and DNA molecular weight markers. *Int J Biochem.* 18(3): 277-8.
- Wiedemann I, Benz R, Sahl HG (2004). Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *J Bacteriol.* 186(10): 3259-61.
- Willner I, Rubin S (1996) Control of the structure and functions of biomaterials by light. Control of the structure and functions of biomaterials by light. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 35, 367-385.
- Willner I, Rubin S, Zor T (1991). Photoregulation of chymotrypsin by its immobilization in a photochromic azobenzene copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4013-4014.

- Winterhalter M (2000). Black lipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5 (3-4), 250-255.
- Wondrak GT, Jacobson EL, Jacobson MK (2002). Photosensitization of DNA damage by glycosylated proteins. *Photochem Photobiol Sci.*1(5):355-63.
- Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaV beta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296(5565):151-5.
- Yu F, Yao D, Knoll W (2003). Surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy studies of the interaction between an antibody and its surface-coupled antigen. *Anal Chem.* 75(11):2610-7.
- Zamir E, Katz B, Aota S, Yamada KM, Geiger B, Kam Z (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 112:1655-69.
- Zhang T, Morgan H, Curtis ASG, Riehle M (2001). Measuring particle-substrate distance with surface plasmon resonance microscopy. *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 3 (2001): 333-337.

7.4 Verwendetes Rinderrhodopsinkonstrukt



7.5 Lebenslauf

Simone S. Krupka

Geburtsdatum, -ort
Familienstand
Staatsangehörigkeit

12.02.1977, Immenstadt im Allgäu
ledig
deutsch

Ausbildung

1996
1996 - 2000
2000 - 2001

Abitur am Mariengymnasium Kaufbeuren
Studium der Biologie an der Ludwigs-Maximilians-
Universität München (LMU)
Diplomarbeit bei Roche Diagnostics GmbH, Werk
Penzberg, Abteilung Biochemicals, Dr. Cordula
Nemetz, Prof. Dr. Thomas Cremer

*Thema: Untersuchung des Einflusses N-terminaler
Proteine auf die Löslichkeit und Abspaltbarkeit
von Erythropoetin und Thrombopoetin nach
Expression im zellfreien in-vitro System*

11/2001, 12/2001

Gastwissenschaftler am Lawrence Livermore National
Laboratory (University of California), Livermore,
USA

01/2002 - 07/2005

Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie
(Martinsried), Abteilung Membranbiochemie,
Dr. Eva-Kathrin Sinner,
Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

*Thema: Detektion molekularer Interaktionen an
biofunktionalisierten Grenzflächen*

7.6. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis Juli 2005 in der Abteilung für Membranbiochemie im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Leitung von Prof. Dr. D. Oesterhelt und betreut von Dr. E.-K. Sinner durchgeführt. Ich möchte allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung, die mir gewährte Forschungsfreiheit und das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Luis Moroder danke ich für das Anfertigen des zweiten Gutachtens dieser Dissertation sowie dafür, daß er immer für Fragen und Diskussionen offen ist.

Dr. Eva Sinner danke ich für die Themenstellung, fortwährende freundliche Unterstützung und Interesse an meiner Arbeit und der Betreuung trotz, oder auch gerade mit Lisa. Ebenso danke ich Dr. Birgit Wiltschi, die sich zu jeder Fragestellung um eine Antwort bemüht hat und nicht nur mit ihrem chemischen Wissen beeindruckt.

Meinen Büro- und Laborkolleginnen Dr. Anna Cattani-Scholz, Eva Lemker, Leslie Hötzer, Judith Scholz und Dr. Fatma Nese Kök danke ich für (nicht nur) wissenschaftliche Diskussionen, Kaffeepausen und die angenehme Forschungsatmosphäre.

Meinen fleissigen Praktikanten Sebastian Deindl und Maria Böhm danke ich für die enthusiastische Mithilfe bei Plasmonenmessungen und der Proteinaufreinigung.

Aus der Abteilung für Bioorganische Chemie möchte ich mich besonders bei Dr. Christian Renner, Dr. Markus Löweneck und Dr. Alex Milbradt für die erfolgreiche Synthese der RGD-Peptide und die daraus gemodelten Strukturmodellen bedanken, außerdem für Diskussionen und Anregungen.

Aus der Abteilung für Neurophysik danke ich Dr. Armin Lambacher für das geduldige Beantworten jeglicher Fragen. Dr. Raimund Gleixner vielen herzlichen Dank für die Einführung in FLIC-Messungen, literweise Kaffee, biophysikalische Diskussionen sowie das Nutzungsangebot der Bibliothek seiner Abteilung.

Dr. Ute Reuning aus dem Klinikum rechts der Isar danke ich für Aufnahmen mit dem Konfokalen Mikroskop. Ebenso danke ich Dr. Stefan Uebel, Core Facilities im Max-Planck-Institut für Biochemie, für die erfolgreiche Einführung in das Arbeiten mit dem CLSM.

Dr. Max Kreiter im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz besten Dank für das Beantworten schwieriger physikalischer Fragen.

Frau Eleonore Haack danke ich für ihre Freundlichkeit und stete kompetente Hilfsbereitschaft in allem Organisatorischem.

Katrin Krzak, der ich neben der Forscherkarriere ein zweites Standbein als Comiczeichnerin wünsche, danke ich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich Dr. Rainer Hillenbrand, Forschungsgruppe Nano-Photonics, für Korrekturlesen, Kaffee, Diskussionen über Physik und Bioschlonz zu jeder Tages- und Nachtzeit und für Verständnis und Beistand in guten und schlechten Tagen. Ebenso danke ich meiner Familie für immerwährende Unterstützung und Beistand.

Für die teilweise finanzielle Unterstützung gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 563 und SFB 533).