Ludwig-Maximilians-Universität München

Max-Planck-Institut für Biochemie

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

Selektive Bindung synthetischer Kollagenmodellpeptide mit Adhäsionsmotiv und Integrin an funktionalisierten Oberflächen und artifiziellen Membransystemen

Leslie Christina BARTH (geb. HÖTZER)

aus

Tamsweg

2007

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 29.06.2007

Leslie Barth

Dissertation eingereicht am: 29.06.2007

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

Mündliche Prüfung am: 16.10.2007

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2003 bis Dezember 2006 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von **Dr. Eva-Kathrin Sinner** in den Arbeitskreisen von **Prof. Dr. Dieter Oesterhelt** und **Prof. Dr. Luis Moroder** angefertigt.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Dieter Oesterhelt** für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Für die unkomplizierte Betreuung und die Freiheit bei der Durchführung meiner Arbeit sei Ihm herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt meiner „Doktormutter", meiner Betreuerin **Dr. Eva-Kathrin Sinner** für dieses sehr vielfältige und abwechslungsreiche, da interdisziplinäres Thema. Für das in mich gesetzte Vertrauen, die Möglichkeit an viele Tagungen mit fast genauso vielen Poster- und Vortragspräsentationen teilzunehmen zu können und als „Vorbild", dass Kinder und Beruf vereinbar sind, möchte ich Ihr danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei **Prof. Dr. Luis Moroder** für die Aufnahme in seine Abteilung, den fruchtbaren Diskussionen über das Thema und dem fortwährenden Interesse am Fortgang und an den Ergebnissen der Arbeit bedanken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Wolfgang Knoll vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz danke ich für die Mitnahme zu wertvollen Seminaren und die zweimonatige finanzielle Unterstützung während des Zusammenschreibens der Doktorarbeit.

Meiner Arbeitsgruppe vom „*Molecular Recognition Lab*" sei gedankt:
Dr. Eva Lemker für ihren Ohrwurm-verursachenden Handyklingelton, die morgendlichen Kaffeepausen mit Leckerlis und für die unheimlich wichtigen, da zukunftsentscheidenden Frauengespräche („Lea")… **Dr. Simone Krupka** als „Gfreahenn"-Labor- und Bürokollegin, die mir zeigte, dass ich auch noch bei gefühlten 50°C im „Kabuff"-Büro vernünftig arbeiten und denken kann! **Florian Wimmer**, dem ersten männlichen Nachwuchs in unserer kleinen Gruppe, der im Labor mit anspruchsvollen Bastelarbeiten in Heimarbeit auftauchte. Meiner Landsmännin und „Bürokollegin in der Endphase" **Dr. Birgit Wiltschi** (PD in spe) für das Näher bringen von biochemischen Denkweisen mit den Worten einer Chemikerin! Ihre Protokolle sind unschlagbar und für ihre Hilfe bei der Proteinaufreinigung oder wenn mich

„rund um die Plasmonen“ wieder mal etwas „gfugst“ hat, war sie maßgeblich daran beteiligt, dass Marlon keine Frühgeburt wurde! … und natürlich unserer Laborfee **Judith Scholz** für die Einweisung in die Zellkultur und ihre abwechslungsreichen Bildschirmschoner, die unser („jetzt-Ex-“)Labor immer wieder mit neuen Highlights erfüllten.

Des Weiteren möchte ich danken:
Kosta Konstantinidis, Christoph Schwarz, Stefi Zorbas-Seifried und **Barbara Fischer** für die gemeinsamen Kletterabende. **Barbara Fischer** außerdem für die, leider viel zu seltenen Tennis“spiele“.
Dr. José Pfizer für die motivierende und fachliche Unterstützung (u.a. Einweisung und so manche Hilfestellung bei Geräten); dafür, dass er meine Schokosucht teilt und mir des Öfteren wahre Gaumenfreuden bereitete (ein Ceranfeld kann dabei schon mal brennen !!!)
Dr. Ulrike „le Ulli“ Kusebauch für die gemeinsame Fmoc-PO(tBu)G-OH Synthese und ihre amüsante allgegenwärtige Panik, ob ihre Ergebnisse jemals für die Promotion reichen… Unvergessen bleiben die gemeinsamen Stryer-Seminare – hierfür Danke auch an **Stefi Zorbas-Seifried**!
Dr. Markus „Mühle“ Müller, **Dr. Markus „Schütti“ Löweneck** für das amüsante Laborklima. **Silva Andric** für die Mineralwasserversorgung und die köstlichen Schmankerl. **Jürgen Musiol** sein chemisches Wissen und seine Literaturkenntnis sind phänomenal! **Elisabeth „Lissy“ Weyher-Stingl** für etliche Massenspektren und Einführung in die CD- und DSC-Spektroskopie. **PD Dr. Christian Renner** und **Dr. Sergio Cadamundo** für die Aufnahme der NMR-Spektren. **Dr. Stefan Uebel**, Core Facilities am MPI Biochemie, für die Einführung und Erlaubnis zur Nutzung des DLS-Gerätes.

Meinem fleißigen Praktikanten **Felix Nißen** danke ich für die enthusiastische Mithilfe bei der Proteinaufreinigung und seine Denkansätze, um die Rechenwege der Proteinkonzentrations-bestimmung zu verkürzen.

Der gesamten Arbeitsgruppen „Bioorganische Chemie“ und „Membranbiochemie“ für ihre freundliche Aufnahme und angenehme Arbeitsamtosphäre.
Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alexander Borst, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, für die Hilfe und den Tips bei Fluoreszenzbildern.
Für die finanzielle Unterstützung gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereiches SFB 563!

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken:

Meinen Eltern, dass Sie immer an mich geglaubt und unterstützt haben. Sie sind, waren und werden immer Vorbilder für mich sein.

Meinen Kindern Marlon und Zoe, die meinem Leben eine ganz neue Bedeutung gaben und das Zusammenschreiben abwechslungsreicher machten.

Meinem wundervollen Mann, Dirk, dafür, dass er mich für das Thema bestärkt hat, für seine Liebe und seinen Glauben an mich, seine allgegenwärtige Hilfe und sein Zuspruch in allen Lebenslagen…dafür, dass es Ihn in meinem Leben gibt !!!

TAGUNGSBEITRÄGE

Vorträge

2003	MPG workshop, *"Collagen functionalized lipid layers as matrix for cell interactions and lipid layer-cell interactions studies"*, 14.05.-16.05.2003, Schloß Ringberg, Deutschland Abteilung-workshop, *"Cell interaction on ECM mimetrics"*, 15.09.-17.09.2003, Schloß Ringberg, Deutschland
2004	SFB 563 workshop, "*Collagen functionalized lipid layers as matrix for cell interaction and lipid layer cell interactions studies*", 13.02.2004, Martinsried, Deutschland MPG workshop, *"Functionalized lipid layers as matrix for cell interaction studies",* 02.06.-04.06.2004, Schloß Ringberg, Deutschland Winterschool der Arbeitsgruppe von Prof. W. Knoll, *"Control of Cell Adhesion on functionalized surfaces"*, 06.09.-12.09.2004, Hirschegg, Österreich Abteilung workshop, *"Final spurt to attain the goal: synthetically functinalized collagen"*, 18.10.-20.10.2004, Frauenchiemsee, Deutschland Joint seminar with IPF Dresden: Biomaterials seminar, *"Synthesis of cell binding motif – control of cell adhesion"*, 08.11.-09.11.2004, Mainz, Deutschland
2005	40. Winter seminar: Biophysical Chemistry, Molecular Biology and Cybernetics of Cell Functions, *"Incorporation of lipid-modified collagen in membrane functionalized surfaces for characterization of cell adhesion processes"*, 15.01.-29.01.2005, Klosters, Schweiz SFB 563 workshop, *"Cell Adhesion Processes onto ECM Functionalized Surfaces"*, 27.02.-02.03.2005, Schloß Ringberg, Deutschland

Posterpräsentation

2003	L. Hötzer, S. Krupka, U. Reuning and E.-K. Sinner GBM / ELSO Tagung, *"Development of an experimental strategy of cell adhesion processes on artificial lipid membrane surfaces"*, 20.09.-24.09.2003, Dresden, Deutschland
2004	L. Hötzer, E.-K. Sinner EMBO Young Investigator Programme, "Chemistry meets Biology*",* *"Investigation of cell adhesion processes on artificial lipid membrane surfaces"*, 05.06.-06.06.2004, Heidelberg, Deutschland
2005	L. Hötzer, B. Wiltschi, D. Oesterhelt, L. Moroder, E.-K. Sinner 40. Winter seminar: Biophysical Chemistry, Molecular Biology and Cybernetics of Cell Functions, *"Incorporation of Lipid-Modified Collagen in Membrane Functionalized Surfaces for Characterization of Cell Adhesion Processes"*, 15.01.-29.01.2005, Klosters, Schweiz L. Hötzer, B. Wiltschi, D. Oesterhelt, C. Renner, L. Moroder and E.-K. Sinner Adhesion Meeting 2005, *"Synthetic Collagen Peptides for Characterization of Cell Adhesion Processes"*, 28.04.-30.04.2005, München, Deutschland L. Hötzer, B. Wiltschi, D. Oesterhelt, C. Renner, L. Moroder and E.-K. Sinner International Workshop on Functional Solid-Supported Bimolecular Lipid Membranes*,* *"Synthetic Collagen Peptides for Characterization of Cell Adhesion Processes"*, 18.09.-21.09.2005, Schloß Ringberg, Deutschland L. Hötzer, B. Wiltschi, D. Oesterhelt, C. Renner, L. Moroder and E.-K. Sinner Toscana Workshop 2005: Cells@Interfaces, *"Functionalized Synthetic Collagen Peptides for Investigation of Cell Adhesion Processes"*, 22.10.-28.10.2005, Firenze, Italy

1 EINLEITUNG 1

1.1 ZELLADHÄSION: BINDUNG VON INTEGRINEN AN KOLLAGEN 1

1.2 EXTRAZELLULÄRES MATRIXPROTEIN: KOLLAGEN 2

1.2.1 Struktur des Kollagens 2

1.2.2 Kollagen-Modellpeptide 4

1.3 ZELLADHÄSIONSVERMITTLER: INTEGRIN 6

1.3.1 Struktur der Integrine 7

1.3.2 Die Integrin-Untereinheiten 9

1.3.3 Kollagen-bindende Integrine 10

1.4 ARTIFIZIELLE MEMBRANSYSTEME ZUR UNTERSUCHUNG VON INTEGRIN-REZEPTOR INTERAKTIONEN 11

1.5 OBERFLÄCHENPLASMONENRESONANZSPEKTROSKOPIE 14

2 AUFGABENSTELLUNG 17

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 18

3.1 DESIGN HOMOTRIMERER KOLLAGENPEPTIDE MIT ZELLADHÄSIONSMOTIV 18

3.2 SYNTHESE DER KOLLAGENMODELLPEPTIDE 20

3.2.1 Synthese der Einzelketten 20

3.2.2 Synthese der Homotrimere mit natürlichem Kollagen Typ III Cystinknoten 22

3.2.3 Massenspetrometrische Charakterisierung der Kollagenpeptide 26

3.3 BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MONOMEREN UND TRIMEREN KOLLAGENPEPTIDE 27

3.3.1 CD Untersuchungen der synthetischen Kollagenpeptide 27

3.3.2 Thermische Entfaltung der Kollagenpeptide 31

3.3.3 NMR Untersuchungen 34

3.3.4 Kristallisationsexperimente 36

3.4 ALPHA1 I-DOMÄNE DES ALPHA1 BETA1-INTEGRINS 37

3.4.1 Expression der α1 I-Domäne als GST Fusionsprotein in E.Coli mit Expressionsvektor pGEX 37

3.4.2 Aufreinigung der α1 I- Domäne durch Affinitätschromatographie 38

3.4.3 Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen 39

3.4.4 Charakterisierung der α1 I-Domäne 40

3.5 BINDUNGSEXPERIMENTE DER ALPHA1 I-DOMÄNE AN DAS TRIMERE KOLLAGENPEPTID MITTELS SPR 40

3.5.1 Planung der Experimente 40

3.5.2 Bindungs- und Kinetikmessungen 43

3.6 OBERFLÄCHENPLASMONENFLUORESZENZSPEKTROSKOPIE AM EIGENBAU-SPFS-GERÄT 44

3.6.1 Details zum verwendeten Eigenbau-SPFS-Gerät 44

3.6.2 Planung der Versuchsanordnung 46

3.6.3 Aufbau von peptidunterstützten α1β1-Integrin funktionalisierten artifiziellen Membranen 50
3.6.4 Messungen an artifiziellen Membranen 53
3.6.5 Diskussion der Ergebnisse 55
3.7 GRUNDLAGEN-EXPERIMENTE FÜR BINDUNGSTUDIEN AN LEBENDEN ZELLEN MIT SYNTHETISCHEN KOLLAGENPEPTIDEN 55
3.7.1 Planung der Experimente 55
3.7.2 Oberflächen - Adhäsionsexperimente mit P19 Zellen an artifizielle Membrane 57
4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 62
5 EXPERIMENTELLER TEIL 64
5.1 MATERIAL 64
5.1.1 Chemikalien und Lösemittel 64
5.1.2 Bezugquellen 65
5.2 ALLGEMEINE METHODEN 67
5.2.1 Dünnschichtchromatographie 67
5.2.2 Gefriertrocknung 67
5.2.3 Präparative Säulenchromatographie 67
5.2.4 Analytische HPLC 68
5.2.5 Präparative HPLC 68
5.2.6 Mikrokalorimetrische Messungen 70
5.2.7 Massenspektrometrie 70
5.2.8 Markierung der Peptide mit den Carbocyaninfarbstoffen Cy™3 und Cy™5 71
5.2.9 Viskositätsmessung 72
5.2.10 Dynamische Lichtstreuung 73
5.2.11 Kristallisation 73
5.2.12 Herstellung von Mikrostempeln 73
5.3 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN 74
5.3.1 UV/VIS-Spektroskopie 74
5.3.2 CD-Spektroskopie 74
5.3.3 NMR Spektroskopie 75
5.4 METHODEN UND VORSCHRIFTEN ZUR PEPTIDSYNTHESE 76
5.4.1 Beladung von Rink –Amid- MBHA –Harzen 76
5.4.2 Bestimmung der Harzbeladung 76
5.4.3 Automatisierte Peptidsynthese 77
5.4.4 Manuelle Peptidsynthese 77
5.4.5 Abspaltung der S-tert-Butylthio-Schutzgruppe 80

5.4.6 Aufarbeitungsverfahren ... 81
5.4.7 Oxidation zum Cys-verknüpften Homotrimer ... 81
5.4.8 Zusammenfassende Übersicht der Synthesevorschriften ... 81
5.5 PROTEINCHEMISCHE METHODEN ... 84
5.5.1 Expression der α1 I-Domäne als GST Fusionsprotein vom E.Coli Expressionsvektor pGEX ... 84
5.5.2 Aufreinigung der α1- I Domäne mittels Affinitätschromatographie ... 86
5.5.3 Thrombinverdau von GST Fusionsproteinen ... 87
5.5.4 Entfernen der Thrombinprotease mittels Benzamidin Sepharose ... 88
5.5.5 Änderung von Pufferbedingungen und Aufkonzentrierung von Proteinlösungen ... 89
5.6 PROTEINANALYTISCHE METHODEN ... 89
5.6.1 Elektrophoretische Trennverfahren ... 89
5.6.2 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Coomassie Färbung ... 92
5.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford) ... 92
5.7 METHODEN FÜR OBERFLÄCHENPLASMONENSPEKTROSKOPIE (SPS) ... 93
5.7.1 Allgemeine Vorbereitungen ... 93
5.7.2 Vorgehensweise für Experimente am Biacore2000 Gerät ... 95
5.7.3 Vorgehensweise für Experimente am Eigenbau-SPRS-Gerät ... 96
5.8 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN ... 100
5.8.1 Medien für Säugerzellkultur ... 100
5.8.2 Kultivierung von P19-Zellen ... 101
5.8.3 Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer-Zählkammer ... 101
5.8.4 Zelladhäsion auf artifiziellen Membranoberflächen ... 102
5.8.5 Zelladhäsion auf mikrostrukturierten Oberflächen ... 102
5.8.6 Bindungsexperiment: Erkennen P19-Zellen Cy3-markiertes Kollagentrimer? ... 103
5.9 DATENANALYSE ... 103
6 LITERATURVERZEICHNIS ... 104
7 ANHANG ... 121
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 121
7.2 PLASMIDKARTE DES VERWENDETEN KONSTRUKTS DER ALPHA 1 I-DOMÄNE ... 127
7.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS ... 128
7.4 LEBENSLAUF : LESLIE CHRISTINA BARTH ... 130

1 Einleitung

Wichtige biochemische Prozesse wie die Signaltransduktion und der Energie- und Stofftransport sind vorwiegend an Zellmembranen lokalisiert[1], wie auch Prozesse der Zelladhäsion bei der Zelldifferenzierung, Wachstum, Wundheilung, Angiogenese und Metastasierung.[2] Detaillierte Untersuchungen dieser biologischen Vorgänge sind aufgrund des komplexen Aufbaus der natürlichen Membranen und der Vielzahl unterschiedlicher Wechselwirkungen ihrer Oberfläche mit dem umliegenden Gewebe sehr schwierig. Erst durch Modellsysteme mit als einheitlich charakterisierten Einzelverbindungen wird es möglich, bimolekulare Vorgänge zwischen spezifischen Liganden und Modellmembranen zu verstehen. Diese Modellmembransysteme ermöglichen Charakterisierungen membrangebundener und membranintegrierter Proteine, deren Struktur-Funktionsbeziehungen durch die Einbettung in die naturmimetische hydrophobe Umgebung erhalten bleiben.[3-7] Durch eine Reduktion des Systems auf die Bestandteile Modellmembran, Membranprotein und Ligand sollte eine effiziente Quantifizierung und Charakterisierung der intermolekularen Interaktionen möglich und eindeutig werden.

1.1 Zelladhäsion: Bindung von Integrinen an Kollagen

Grundlage für den Zusammenhalt von Zellen in allen mehrzelligen Tieren ist die Adhäsion von Zellen aneinander und an Oberflächen.[8] Durch diese Zelladhäsion werden Prozesse der Embryogenese und der Wundheilung, aber auch pathophysiologische Prozesse wie z.B. die Metastasierung möglich. Vor allem durch Integrine werden die dafür nötigen Wechselwirkungen zwischen einer Zelle mit einer anderen oder mit der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) vermittelt.[9-12] Die integrinvermittelte Zelladhäsion an Liganden der ECM, wie Kollagen, Fibronectin, Laminin oder Aktin, erfolgt in vier Schritten: Zellanhaftung, Zellspreitung, Organisation des Zytoskeletts und Ausbildung der fokalen Adhäsionskomplexe (*focal adhesion complex*, FA).[13] Hierbei handelt es sich bei den FA um eine spezielle Form der organisierten Zell-Matrixkontakte.[14,15]

Einige Kollagen-Adhäsionsmotive für Integrinrezeptoren sind beschrieben, wobei das „Arg-Gly-Asp“- Motiv („RGD“) zu den bekanntesten und zu den meist untersuchten Motiven zählt.[16-18]

1.2 Extrazelluläres Matrixprotein: Kollagen

Aufgabe der extrazellulären Matrix ist es, für die verschiedenen Organe und Gewebe mechanischen Halt zu bieten und sie voneinander abzugrenzen. Lockeres Bindegewebe, bestehend aus unterschiedlichen Kombinationen von fibrillären Kollagenen (Typ I-III), Gelatin, Fibronectin, Laminin und Elastin, befindet sich unterhalb der Basalmembran, an der über Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren Zellen des Gewebes fest verankert sind.[19] Die Formstabilität der Matrix wird zusätzlich durch Hyaluronsäure, Proteoglycane sowie Proteine erhöht, an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden können. Kollagen kommt aufgrund seiner speziellen Struktur in allen mechanisch sehr beanspruchten Gewebeteilen und Knochengeweben vor. So zählt das unlösliche Protein zu dem Hauptbaustoff für Bänder, Bindegewebe, Gefäßwände, Knorpel und Sehnen.

1.2.1 Struktur des Kollagens

Der einleitende Satz „*Collagen is the most abundant protein in vertebrates*“ vieler wissenschaftlicher Veröffentlichungen mit Kollagenproteinen als Untersuchungsgegenstand, veranschaulicht die Bedeutung von Kollagen als Hauptvertreter der extrazellulären Matrix mit 30 % an der Proteingesamtmasse eines Organismus.

Verantwortlich für die speziellen Eigenschaften der Kollagene ist die charakteristische Tripelhelix.[20] Sie besteht aus drei sich helikal umwindenden Proteinsträngen, den α-Ketten (siehe Abb. 1).

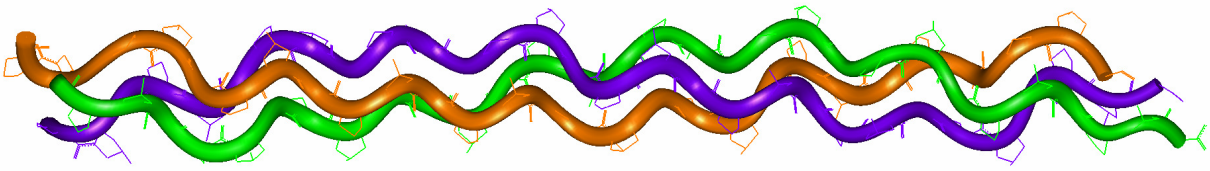


Abb. 1: Kollagen-Tripelhelix: drei linksgängige Polyprolin-II Einzelketten bilden eine rechtsgängige Tripelhelix aus.

Diese Ketten sind aus repetitiven Gly-Xaa-Yaa Sequenzmotiven aufgebaut, wobei die Positionen Xaa und Yaa von den meisten natürlichen Aminosäuren eingenommen werden können, jedoch am häufigsten von Pro in Position Xaa und (4*R*)-Hydroxyprolin (Hyp) in Position Yaa.[21-27] Glycin in jeder dritten Sequenzposition ist für die tripelhelikale, sehr kompakte Faltung essentiell. Das Peptidrückgrat der einzelnen Kollagenstränge bildet eine linksgängige Polyprolin-II-artige Helix aus, wobei die charakteristischen Torsionswinkel, der Φ-Winkel bei etwa -75° und ψ-Winkel bei +145 ° liegen[28] (siehe Abb. 2).

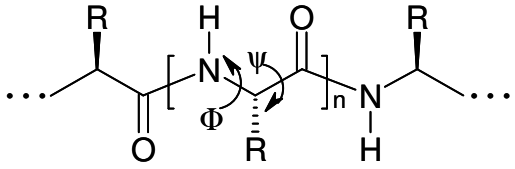


Abb. 2: Anordnung einer beliebigen Aminosäure Xaa in einer Peptidkette mit der entsprechenden Nomenklatur der charakteristischen Torsionswinkeln Φ = C(O)-N-C_α-C(O) und ψ = N-C_α-C(O)-N.

Diese Werte sind durch die gesamte Helix nahezu identisch, da die rigide Ringstruktur der Pro- und Hyp-Reste verschiedene Peptidrückgrad-Torsionswinkel einschränkt. Der Pyrrolidinring der Pro- und Hyp-Reste induziert die linksgängige Torsion des Peptidrückgrates in den Ketten und platziert Glycin jeweils in das Zentrum der Tripelhelix.[29] Damit das Glycin dort in allen drei Ketten Platz findet, sind die Sequenzen der einzelnen Ketten jeweils um einen Aminosäure-Rest zueinander verschoben. Die resultierende Tripelhelix besteht aus drei individuellen linksgängigen Polyprolin-II-artigen Helices, die sich zur rechtsgängigen Superhelix umeinanderwinden, welche äußerst eng gepackt ist (siehe Abb. 3).

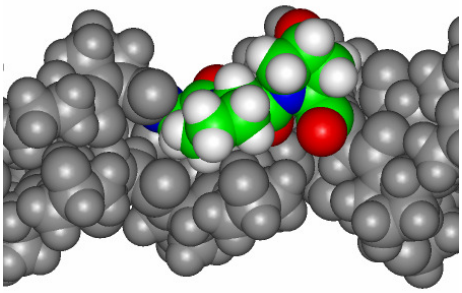


Abb. 3: Teilausschnitt der Kollagenstruktur mit Gly-Pro-Hyp Sequenzabfolge, der die Lage der Aminosäure-Reste veranschaulicht. Die Abbildung verdeutlicht, dass Gly im Inneren der Struktur liegt; während die Seitenketten der Xaa- und Yaa-Reste zum Lösemittel orientiert sind.

Je Sequenztriplett sorgen zwei interchenare Wasserstoffbrücken für Strukturstabilität. Diese befinden sich zwischen der Amidgruppe eines Glycins und dem Carbonyl des Xaa-Restes der benachbarten Kette.[30,31] Wassermoleküle bilden ein Netzwerk um die Seitenketten-Hydroxylfunktion der Hydroxyproline aus. Diese Wasserhülle wird als weitere Stabilisierung der Kollagenstruktur diskutiert.[32,33] Untersuchungen an synthetischen Modellpeptiden mit (4*R*)-Hydroxyprolin in Position Xaa und Prolin, (4*S*)-Hydroxyprolin oder (3*R*)-Hydroxyprolin als Yaa-Reste zeigten deutliche Destabilisierung der tripelhelikalen Struktur.[34,35] Ein Zusammenhang der Position der Hydroxyfunktion mit der Strukturstabilität und die Hintergründe sind nicht endgültig verstanden.[36-40]

Je nach Kollagentyp kann die Tripelhelix aus drei gleichen α-Ketten, zwei gleichen und einer unterschiedlichen α-Kette oder aus drei unterschiedlichen α-Ketten aufgebaut werden. Kollagen Typ I mit zwei identischen und einer unterschiedlichen α-Kette, ist der am weitesten verbreitete Kollagentyp. Er ist vor allem in Knochen, Sehnen und Haut zu finden und nicht zuletzt aufgrund seiner außerordentlichen biologischen Relevanz das am besten strukturbiologisch charakterisierte Kollagen.

1.2.2 Kollagen-Modellpeptide

Die eindeutige strukturelle und funktionelle Charakterisierung nativer Kollagene ist äußerst schwierig. Interpretationen empirischer Daten sind zum einen aufgrund der Vielzahl beteiligter Aminosäuren mit unterschiedlichsten Seitenkettenfunktionen in ähnlichen chemischen Umgebungen und einer Vielzahl ähnlicher Teildomänen nur sehr eingeschränkt möglich. Zum anderen zwingt die Unlöslichkeit der Kollagen-Fibrillen gegenüber einer Erhaltung der strukturellen Einheit zu Kompromissen in den Versuchsbedingungen, die eindeutige und detaillierte Auswertungen der Experimente erschweren. Experimentelle Möglichkeiten zur Erhöhung der Löslichkeit bieten Enzymverdau oder Cyanbromidspaltungen nativer Kollagene.[41-45] Resultierende Instabilität, Inhomogenität der Fragmente und die erschwerte Renaturierung in die tripelhelikale Struktur machen präzise Aussagen über intermolekulare Interaktionen unmöglich. Einheitliche, stabile und strukturierte Proteinfragmente sind hingegen durch chemische Synthese zugänglich. Synthetische Kollagenmodellpeptide

ermöglichen, das bei der Adhäsion beteiligte Sequenzmotiv in nativ gefalteter Form als lösliche niedermolekularen Liganden anzubieten.

Bis heute wurde eine Vielzahl von Ansätzen verfolgt, um Kollagene durch Modellpeptide zu imitieren und daraus Informationen über strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Kollagens zu erlangen.[46-56] Polymerisationen von (Gly-Pro-Hyp) Tripeptiden zu Polypeptiden scheiterten an der Heterogenität der entstandenen Kollagenpolypeptid-Ketten.[46] Als Durchbruch zählen die Arbeiten von Sakakibara und seinen Mitarbeitern Ende der 60er Jahre, als es ihnen gelang, $(Gly\text{-}Pro\text{-}Hyp)_n$- und $(Gly\text{-}Pro\text{-}Pro)_n$-Peptide definierter Länge und Zusammensetzung zu synthetisieren.[57,58] Anhand dieser Arbeiten wurde die Wichtigkeit des Hydroxyprolins in der Peptidsequenz erkannt. Der Einfluss der unterschiedlichen Aminosäuren und der Kettenlänge auf Faltung und Stabilität der Tripelhelix wurde mit verschiedenen Ansätzen ebenso untersucht, wie Sequenzabschnitte natürlicher Kollagene auf deren biologische Aktivität und Struktur erforscht wurden.[59]

Kollagene, die nicht mittels Cystinknoten interchenar vernetzt sind, lassen sich nach Hitze Denaturation nur sehr langsam und unvollständig zurückfalten, wobei das korrekte Raster weitgehend verloren geht und Tripelhelices unterschiedlicher Länge und Stabilität entstehen.[60] Untersuchungen an Kollagen Typ III mit seinem C-terminalen Cystinknoten oder an entsprechenden Disulfid-vernetzten Fragmenten zeigten hingegen ganz deutlich den entscheidenden Einfluss des Cystinknotens auf die Rückfaltung. Diese erfolgt durch induzierte Nukleation und Progagation der Tripelhelix vom C- zum N-Terminus in sehr effizienter Weise mit hoher Rate.[61-63] Aufgrund dieser Ergebnisse wurden verschiedene Strategien entwickelt, um drei synthetische Kollagenpeptidketten kovalent zu verknüpfen und dadurch die Faltung der Tripelhelix zu erleichtern und ihre Stabilität zu erhöhen (siehe Abb. 4). Die synthetischen Template wurden entweder am C- oder N-Terminus eingebaut, wobei möglichst flexible Linker ein Einrasten der Peptidkette erleichtern sollten. Alternativ zu diesen synthetischen, unnatürlichen, homotrifunktionellen Templaten wurde von Ottl et al. ein künstlicher Cystinknoten vorgestellt, der laut Modelling und experimentellen Ergebnissen zu keinen sterischen Nebeneffekten auf die Tripelhelix führt. Abgesehen vom erheblichen synthetischen Aufwand erlauben solche künstlichen Cystinknoten auch eine Assemblierung

von heterotrimeren Kollagenpeptiden, während die synthetischen Template nur zu homotrimeren Modellpeptiden führen.

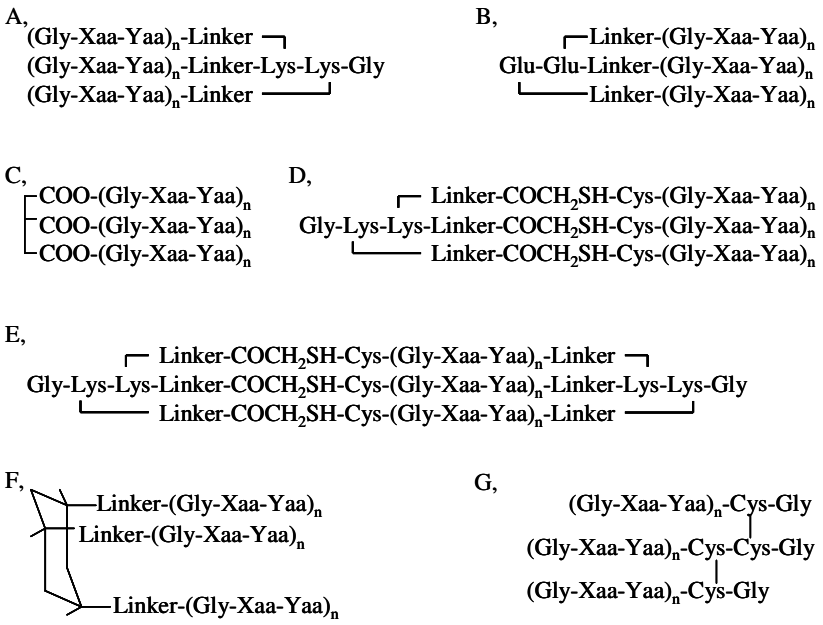


Abb. 4: Auswahl templatverknüpfter Kollagen-Modellpeptide. A: Roth[47], Fields[64,65]; B: Hojo[66]; C: Roth[47]; D: Tanaka[67]; E: Tanaka[68]; F: Goodman[69], Melacini[70]; G: Ottl.[71]

Andere Ansätze verfolgen die rekombinante Darstellung von kleinen Kollagenmodellpeptiden.[72] Größter Nachteil an diesem Weg ist, dass der Einbau von Hydroxyprolin an Yaa-Position nicht gesteuert werden kann. Während der Translation kann Hydroxyprolin nicht direkt an der gewünschten Sequenzposition eingebaut werden, sondern muss aus Prolin durch eine posttranslationale enzymatische Hydroxylierung erfolgen. Dies ist *in vitro* mit Hilfe der (4*R*)-Prolin-Hydroxylase gelungen, doch erfolgte diese Modifikation bislang nur unspezifisch. Zusammenfassend wird deutlich, dass einheitliche Kollagenmodellpeptide mit exakt definierter Sequenzabfolge und Gly-Pro-Hyp Tripletts nur synthetisch zugänglich sind.

1.3 Zelladhäsionsvermittler: Integrin

Zelladhäsionsrezeptoren werden in mehrere Klassen eingeteilt: Integrine, Cadherine, Immunoglobulin-Superfamilie, Selectine und sonstige.[73] Integrine sind Zelladhäsionsvermittler, die den Kontakt mit anderen Zellen und der Verankerung von Zellen in der sie umgeben-

den ECM bewirken.[9,74] Sie zählen dabei zu den wichtigsten Rezeptoren für die physikalischen Verankerung der Zelle.[75] Durch die Zellmembran hindurch „integrieren“ sie in fokalen Adhäsionskomplexen das Cytoskelett der Zelle in das Gerüst der ECM.[10,76] Integrine greifen in zahlreiche Abläufe auf zellulärer Ebene wie Zellwanderung (Migration), Differenzierung, Proliferation und Genexpression ein. Weiterhin sind sie in die Weitergabe von intrazellulären Signalen involviert und sind maßgeblich an verschiedenen biologischen Prozessen wie der Apoptose, der Wundheilung, der Blutgerinnung und der Immunantwort beteiligt.[77-79]

1.3.1 Struktur der Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die aus jeweils einer nicht kovalent miteinander verknüpften α- und β-Untereinheiten aufgebaut sind. Jede Untereinheit besteht aus einer hydrophoben transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne sowie einer glykosylierten extrazellulären Domäne, die zugleich den größten Teil der α- und β-Untereinheit darstellt [80] (siehe Abb. 5).

Es sind 18 α- und 8 β-Untereinheiten bekannt,[11,75] die mehrfach *N*-glykosyliert sind. Die unterschiedliche Ligandenspezifität der Integrine wird durch die Kombination unterschiedlicher α- und β-Untereinheiten bestimmt. Bis heute sind insgesamt 24 verschiedene Kombinationen der humanen Integrine bekannt.

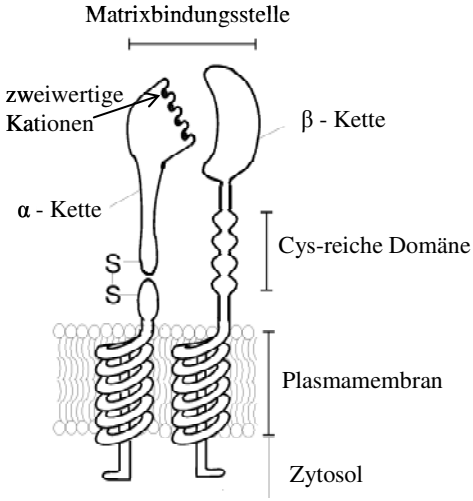


Abb. 5: Struktureigenschaften von Integrinen mit α- und β-Untereinheiten,[81] abgeleitet aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Integrine zeigen in ihrer Ligandenbindung erhebliche Unterschiede. Während verschiedene Integrine mit hoher Selektivität nur einen Liganden binden, sind andere Integrine durch ein breites Spektrum an bindungsfähigen Liganden charakterisiert.[17] Die Ligandenbindungsstellen werden von der α- und β-Kette kationenabhängig gebildet[82] und können konformationsabhängig offen (aktiv) oder verdeckt (inaktiv) vorliegen.[83-85]

Häufig modulieren Bindungen von Kationen an einer lokalisierten Bindungsstelle die Affinität einer weiteren Kationenbindungsstelle. So versetzen Ca^{2+} Ionen nach dem Konformationsmodell von Humphries[86] Integrine in einen inaktiven Zustand, während Mn^{2+} und Mg^{2+} durch Induktion der aktiven Integrinkonformation die Bindung an das Adhäsionsepitop ermöglichen. Die α-Untereinheit reguliert dabei die Ligandenspezifität.[87,88]

Die an Integrine bindenden Peptidsequenzen sind unterschiedlich, aber trotz ihrer großen Variationsbreite an Erkennungssequenzen und Epitopstrukturen beinhalten sie häufig die Reste Glu oder Asp, welche für die Rezeptorbindung wichtig sind.[75,80] In Tabelle 1 sind einige Integrine der Zelloberfläche mit ihren natürlichen Liganden der ECM aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht ausgewählter Integrine mit ihren natürlichen Liganden aus ECM und Zelloberflächen sowie bekannten Adhäsionssequenzen

Integrin	Ligand	Adhäsionssequenz (Herkunft)
α1β1	Kollagen, Laminin	GFOGER (Kollagen)
α2β1	Kollagen, Laminin	DGEA, FYFDLR, GFOGER (Kollagen) YYGDALR, IAFQRN (Laminin)
α3β1	Kollagen, Laminin, Fibronectin	RGD (Fibronectin) KQNCLSSRASFRGCVRNLRLSR (Laminin)
α10β1	Kollagen	?
α11β1	Kollagen	?
αvβ1	Vitronectin, Fibronectin, Osteopontin, Fibrinogen	RGD (Fibronectin, Vitronectin)
αIIbβ3	Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand Faktor, Thrombospondin	KQAGDV, RGD (Fibrinogen) RGD (Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand Faktor)
αvβ3	Fibrinogen, Laminin,	RGD (Fibronectin, Vitronectin, von

Integrin	Ligand	Adhäsionssequenz (Herkunft)
	Vitronectin, von W. Faktor, Thrombospondin, Tenascin, Osteopontin, Fibulin, Fibrillin	Willebrand Faktor, Osteopontin, Fibrinogen, Fibrillin) SNS (Kollagen) KRLDGS (Fibrinogen)
αvβ5	Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin, von Willebrand Faktor, Osteopontin	RGD (Vitronectin) RKKRRQRRR (HIV-Tat-Protein)
αvβ6	Fibronectin, Fibrinogen, Tenascin	RGD (Fibronectin) DLXXL (Tenascin)

Etwa 100 000 Integrinmoleküle befinden sich typischerweise auf der Zelloberfläche und zwar bevorzugt in cholesterin- und glykosphingolipidreichen Bereichen.[89-91]

1.3.2 Die Integrin-Untereinheiten

Die α-Untereinheit ist mit etwa 1100 Aminosäuren (etwa 120-190 kDa) die größere der beiden Untereinheiten (siehe Abb. 6). Sie ist aus zwei verschieden langen Aminosäurenketten aufgebaut, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Den N-terminalen Bereich kennzeichnen mehrere Mg^{2+}- und Ca^{2+}-bindende Abschnitte.[74,92] Die Kopfgruppe aller 18 α-Untereinheiten besteht aus einer siebenblättrigen Propellerstruktur. Diese weist sieben homologe Domänen auf (I-VII), wobei die Domänen V-VII zur Kationenbindung beitragen (zwischen dem zweiten und dritten Faltblatt der Propellerdomäne).[93] Die neun Integrin-α-Untereinheiten α1, α2, α10, αD, αE, αL, αM und αX besitzen extrazellulär zusätzlich eine insertierte αI-Domäne (*inserted domain*, manchmal auch: A-Domäne) von ungefähr 200 Aminosäuren.[94-96] Die Liganden-Bindungsstelle dieser Integrine ist auf der αI-Domäne lokalisiert,[94,96-99] und spielt für die Ligandenbindungsaktivität eine Schlüsselrolle, wie in vielen Untersuchungen mit rekombinanten I-Domänen belegt werden konnte. Dabei handelt es sich um eine Nukleotidbindungs- bzw. Koordinierungsstelle für Mg^{2+}, Mn^{2+} und Liganden, die vermutlich die Integrinaffinität regulieren.[9] Die Bindungsstelle für divalente Kationen wird auch als MIDAS-Region (*metal ion dependent adhesion site*) bezeichnet.[100-102]

Die β-Untereinheit[103] besteht meist aus ca. 800 Aminosäuren (etwa 95-120 kDa) und enthält vier hochkonservierte cysteinreiche Segmente nahe der transmembranen Region (siehe Abb. 6). Der N-Terminus ist mit internen Disulfidschleifen Teil der Ligandenbindungsdomäne. Jede Untereinheit enthält eine bivalente Kationenbindungsstelle, die sich etwa 100 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt befindet. Die beiden transmembranen Domänen weisen eine α-helikale Konfiguration auf.[17,104]

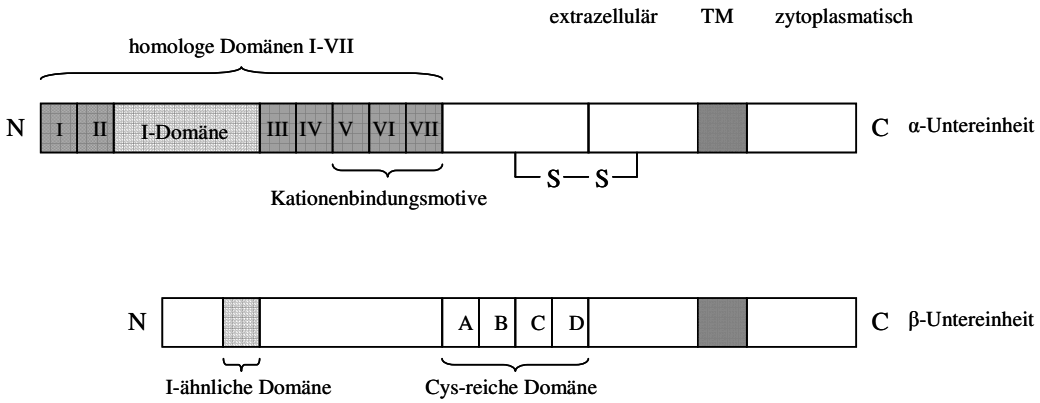


Abb. 6: Schematische Darstellung zum Aufbau der α- und β- Untereinheiten der Integrinrezeptoren.

1.3.3 Kollagen-bindende Integrine

Von den 24 verschiedenen, bisher bekannten Integrinrezeptorspezies wurden fünf als Kollagen-bindende charakterisiert.[105] Diese Kollagenrezeptoren bestehen aus einer β1-Untereinheit und einer α1, α2, α3, α10 oder α11- Untereinheit. Die α1β1- und α2β1-Integrine sind die bedeutendsten Kollagen-bindende Rezeptoren.[106,107] Beide Spezies erkennen eine Vielzahl von Kollagenen, unter anderem das am weitesten verbreitete und bestuntersuchteste Kollagen Typ I. Die in Abschnitt 1.3.2 beschriebenen I-Domänen sind für die Bindungseigenschaften entscheidend.[108,109] Ihre molekulare Struktur wurde in röntgenkristallographischen Untersuchungen gelöst.[110-112] Obwohl die Strukturen beider Integrine nur geringe Unterschiede zeigen, besitzen sie unterschiedliche Bindungsspezifitäten und -Affinitäten für Liganden. Integrin α1β1 zeigt deutlich höhere Bindungen an Netzwerk-bildende Kollagene, wie Typ IV und Laminin, während das α2β1-Integrin für fibrilläre Kollagene wie Typ I eine höhere Affinität aufweist.[113]

Zu den bekannten Adhäsionssequenzen des α1β1-Integrins gehört Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg von Kollagen Typ I und für das α2β1-Integrin ebenfalls Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg (Kollagen Typ I), aber auch Asp-Gly-Glu-Ala (Kollagen Typ I), Arg-Lys-Lys-His (Disintegrine), Tyr-Tyr-Gly-Asp-Ala-Leu-Arg (Laminin), Ile-Ala-Phe-Gln-Arg-Asn (Laminin), und Phe-Tyr-Phe-Asp-Leu-Arg (Kollagen Typ IV).
Die erst kürzlich identifizierten α10β1- und α11β1-Integrine sind bislang noch wenig untersucht. Das Integrin α10β1 wurde als Kollagenrezeptor charakterisiert und in Chondrozyten (Knorpelzellen) lokalisiert.[114] Das Integrin α11β1 wurde in fötalen Muskeln entdeckt.[115] α3β1-Integrin kann einige Kollagene binden, allerdings handelt es sich hierbei mehr um einen Co-Kollagenrezeptor als um einen primären Rezeptor.[116] Zum jetzigen Zeitpunkt sind die meisten Integrine in ihrer Rolle in embryonaler und postembryonaler Entwicklung weitgehend charakterisiert. Diese Charakterisierung basiert auf phenotypischen Abweichungen, welche sich als Folge spezifischer Mutationen entsprechender Gene zeigen.
Auch nach *knock out* des α1 kodierenden Genabschnitts, infolge dessen das α1β1-Integrin nicht ausgebildt wird, bleibt die Lebens- und Fortpflanzungsfähigkeit erhalten.[117] Wenn allerdings das α2 kodierende Gen ausgeschaltet wurde und damit das korrespondierende, Kollagen-bindende Integrin α2β1 fehlt, führt dies bei Implantation zum Tod.[118]

1.4 Artifizielle Membransysteme zur Untersuchung von Integrin-Rezeptor Interaktionen

Biologische Systeme sind sehr komplex und weisen außergewöhnliche physikalische und chemische Eigenschaften auf. Zellmembrane sind aus molekularen Doppelschichten (*bi-molecular lipid membrane*, BLM) wasserunlöslicher Lipide, Cholesterin und Membran-proteinen aufgebaut. Sie übernehmen unter anderem die Aufgabe einer chemischen und physikalischen Barriere zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten. Konventionelle Untersuchungen umfassender Membransysteme mit einer Vielzahl funktioneller und regulatorischer Interaktionen mit umliegenden Organellen bzw. Kompartimenten sind zu komplex und machen künstliche Modellsysteme nötig, die die natürliche Umgebung möglichst genau nachahmen. Für die Untersuchung der Interaktion von Zelladhäsions-

molekülen mit ihren Rezeptoren werden geeignete artifizielle Membransysteme benötigt, die die natürliche Umgebung der rekonstruierten Membranproteine imitieren und dadurch deren Funktionalität aufrechterhalten. Für das Verständnis komplexer biologischer Prozesse ist die native Konformation des jeweiligen Membranproteins und seines Liganden entscheidend. Die künstlichen Membranen sollten daher so einfach wie möglich und komplett wie nötig aufgebaut sein, um optimalen Nutzen und Einblick in die detaillierten Vorgänge zu erlangen und Aussagen über die ablaufenden Prozesse ableiten zu können. Zugleich sollte es sich um effiziente und reproduzierbare *in vitro* Systeme handeln, um spezifische Bindungsereignisse zwischen dem Ligand und dem Rezeptor getrennt von weiteren Interaktionen des Rezeptors untersuchen zu können.

Singer und Nicolson[119] entwickelten 1972 das „Flüssig-Mosaik-Modell“ (*fluid mosaic model)*, das die aus Glyko– und Phospholipiden gebildete Lipiddoppelschicht als Matrix für integrale und an der Oberfläche gelegene Proteine beschreibt, die in lateraler Richtung frei diffundieren können. In der Membran besteht ein hohes Maß an molekularer Beweglichkeit. So können Moleküle beispielsweise von einer Seite der Matrix zur anderen wechseln (flip-flop).[120] Detaillierte Untersuchungen der Mechanismen und Kinetiken stellen auch heutzutage noch eine große Herausforderung dar, da erst biomimetische Systeme für diesen speziellen Zweck entwickelt werden müssen. Lipiddoppelschichten wie Vesikel, Mizellen und zylindrische Mesophasen werden oft als einfache Modellsysteme genutzt, um Effekte in biologischen Membranen zu studieren. Als weiterentwickelte artifizielle Membransyssteme werden Modelle wie Langmuir Monolipidschichten,[121] Liposomen[122] oder so genannte schwarze Lipidmembranen[123] benutzt.

Vielversprechende Modellsysteme sind die in Abb. 7 gezeigten, festkörperunterstützten peptidgebundenen Lipiddoppelschichten (*tethered bimolecular lipid membrane,* tBLM).[124] Hierbei werden Peptidlinker, die eine hydrophile Umgebung des Zytosols nachahmen, durch Selbstassoziation aufgebaut. Nach chemischer Aktivierung der Peptidlinker wird Dimyristoyl-phosphatidyl-ethanolamin (DMPE) gebunden und die Lipidschicht durch Fusion mit unilamelaren Vesikeln oder Proteoliposomen aufgebaut. Die Lipiddoppelschicht kann durch Einbettung von Membranproteine funktionalisiert werden und ist daher für Studien von Membranproteinen in künstlichen, aber quasi-natürlichen Umgebungen wertvoll.[125]

Es wurde gezeigt, dass Proteine in ihrer funktional aktiven Form in tBLM inkorporiert werden können.[3-6,126] Die Ausbildung dieser tBLM sowie der Einbau und die Funktionalität der inkorporierten Proteine kann durch oberflächenanalytische Methoden verfolgt werden (z.B. mittels SPR, SPFS, QCM[127]).

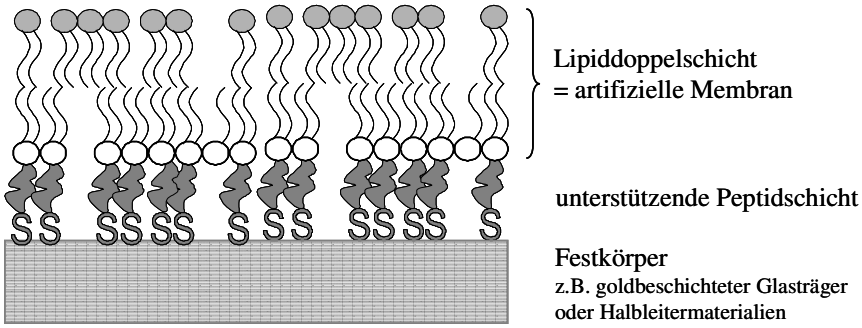


Abb. 7: Schematische Darstellung einer denkbaren und realisierten Modellmembranarchitektur einer tBLM[128].

Diese künstlichen Membranmodelle eignen sich als Matrix für Membranproteine, sozusagen als biomimetische Plattform für Untersuchungen von Membranproteinen mit einer relevanten biologischen Funktion, z.B. Zelladhäsionsrezeptoren.

Das Interessen an biologischen Abläufen wächst über die universitäre Grundlagenforschung hinaus und erste applikative Konzepte erscheinen realisierbar.[129] Es gibt viele Anwendungsbereiche, bei denen man biologische Systeme mit künstlichen oder nicht biologischen Materialien vereinen möchte (Biomimese). Daher gibt es intensive Bemühungen, bioinerte Materialen durch Oberflächenmodifikationen in biokompatible und bioaktive Materialien umzuwandeln.[130] Die Funktionalisierung der Oberfläche mit bioaktiven Molekülen nutzt diese Erkenntnisse der biochemischen Forschung, um mit einer Biomaterialoberfläche eine zell – und gewebespezifische Reaktion zu erzielen. Durch eine Beschichtung der Oberfläche mit zelladhäsiven Proteinen und Peptiden kann z.B. ein direkter funktionaler Material-Gewebekontakt hergestellt werden.[131,132] Dabei bildet Gold eine Modelloberfläche, die sich leicht strukturieren und mit Biomolekülen funktionalisieren lässt.[133]

Optische Methoden wie die Plasmonenresonanzspektroskopie oder Mikroskopie sind optimale Methoden für die *in vitro* Charakterisierung von Oberflächenprozessen. Die Bindung von Peptiden mit Zelladhäsionsmotiven und Integrinen ist relativ schwach. Mit der äußerst

empfindlichen fluoreszenzverstärkten Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie kann diese Bindung jedoch quantitativ ermittelt werden.[4,5,134] Zelladhäsion, -differentation, -migration und -wachstum auf biomimetischen Matrices konnten durch mikroskopische Methoden detektiert werden. Insbesondere konnten somit Biokompatibilität, Funktionalität und Antwort auf biologisch modifizierten Materialien charakterisiert werden. Diese Methoden ermöglichen es, Implantate und Prothesen aus körperfremden Materialien mechanisch zu verstärken oder zu ersetzen.[135] Die Materialien können künstlichen oder natürlichen Ursprungs sein und werden allgemein als Biomaterialien bezeichnet. Dabei sollten sie möglichst inert sein, keine toxischen Inhaltsstoffe freisetzen[136] und an der Grenzfläche zum natürlichen Gewebe keine Fremdkörperreaktion hervorrufen, sondern einen möglichst engen Kontakt zum Gewebe herstellen.

Zusammenfassend bieten tBLMs eine ideale Voraussetzung für das Studium der Interaktionen von Membranproteinen (Integrin) mit ihren ECM-Liganden (Kollagen) und stellen somit optimale Ausgangsposition dar, um als Zielsetzung mit optischen Grenzflächenstudien biokompartible Beschichtungen zu finden und zu optimieren.

1.5 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPS) ist eine senitive und ausgenommen bei photosensitiven Molekülen nichtinvasive Detektionsmethode. Sie ermöglicht den Nachweis von Bindungseffekten zwischen zwei oder mehreren Molekülen in Echtzeit.[4,126,137-139] Oberflächenplasmonen entstehen durch die Kopplung von Elektronen und Photonen, welche sich entlang einer Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrikum ausbreiten. Diese Quasi-Teilchen können durch das Einstrahlen von Photonen in einer Elektronengaswolke angeregt werden, wenn diese vektoriell in Energie und Impuls übereinstimmen.[140] Die Einkopplung des Photons in die Goldoberfläche ist durch die totale interne Reflexion an der Grenzfläche Glas/Metall möglich, was in der so genannten Kretschmann-Konfiguration realisiert wird (siehe Abb. 8).[141,142] In dieser Anordnung wird mit Hilfe eines Prismas p-polarisiertes Licht in eine dünne, typischerweise 45-50 nm dicke Goldschicht, die auf einen Glasträger im Vakuum aufgedampft wurde, eingekoppelt. Einfallendes Licht wird unter

Bedingungen der Totalreflektion gegen die Gold-Luft Grenzfläche gelenkt. Eine elektromagnetische Feldkomponente dringt über einen geringen Bereich in das Medium des kleineren Refraktionsindex mit exponentiell abfallender Intensität ein.

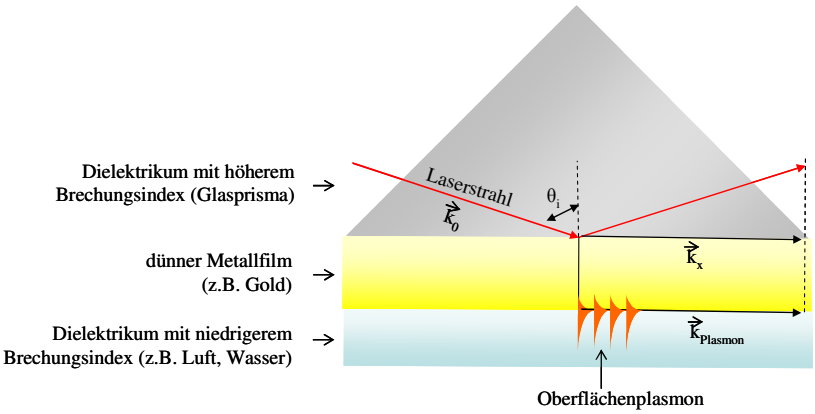


Abb. 8: Schematische Darstellung der Anregung von Oberflächenplasmonen in der Kretschmann-Konfiguration. In dieser Anordnung besteht die Möglichkeit, Licht in ein Oberflächenplasmon zu koppeln: Verstärkung des Wellenvektors der einfallenden Strahlung k_0 durch Verwendung eines hochbrechenden Mediums, wodurch die k_x Komponente des Wellenvektors des Lichts in ihren Eigenschaften an $k_{Plasmon}$ angeglichen wird.

Oberflächenplasmonen sind oszillierende Wellen und induzieren ein evaneszentes Feld, dessen Intensität senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abfällt. Am Ort der Grenzfläche sind ihre Intensitäten gegenüber der einfallenden Lichtintensitäten um Vielfache größer. Der resultierende Verstärkungsfaktor ist dabei vom jeweiligen Metall abhängig. Für eine Gold/Wasser Grenzfläche beträgt diese Verstärkung bei der Anregungswellenlänge $\lambda = 633$ nm einen Faktor von ca. 16.[126,137,138]

Resonanz begründet einen Energieverlust des reflektierten Licht, das in Form eines scharfen Minimums in der winkelabhängigen Reflektion zu detektieren ist. Die Energiekopplung in das Plasmon kann als Minimum in der Reflektivität des p-polarisierten Lichts gemessen werden. Der Resonanzwinkel ist stark abhängig vom Brechungsindexprofil der Probe in dem evaneszenten Feld der Sensoroberfläche. Absorption und Desorption von Makromolekülen auf der Sensoroberfläche ändern den örtlichen Brechungsindex und erzeugen eine Verschiebung im Resonanzwinkel, der in guter Annäherung proportional zur Masse ist, die an die Sensoroberfläche gebunden ist. Die Detektion beruht auf der Änderung der Schichtdicke resultierend aus der Massenänderung der ad- und desorbierenden Moleküle an der Oberfläche

(siehe Abb. 9). Daher ermöglicht die SPS eine massensensitive Detektion. Ist der Brechungsindex bekannt, kann mit Hilfe der Fresnelgleichungen[143] die physikalische Schichtdicke berechnet werden.

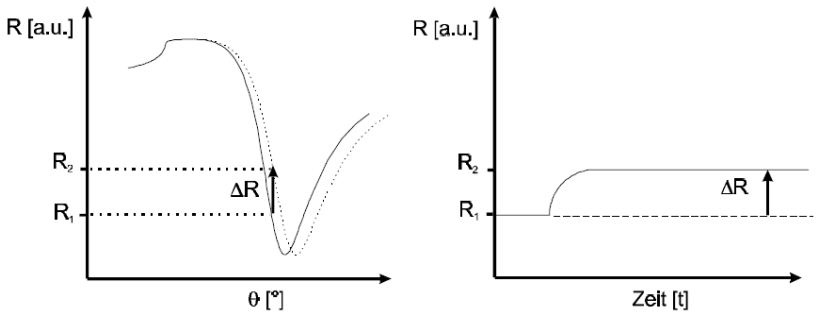


Abb. 9: Schematische Darstellung plasmonenspektroskopischer Messungen. links: Reflexionsspektrum vor und nach der Adsorption einer Monoschicht; die Verschiebung des Resonanzwinkels θ wird durch eine zusätzliche Schicht verursacht; rechts: Kinetikmessung der Adsorption bei konstantem Winkel θ_i.

Ein wichtiges Charakteristikum der Oberflächenplasmonen ist ihre elektromagnetische Feldverstärkung auf der Grenzfläche verglichen mit dem eingestrahlten Licht. Diese Eigenschaft kann weiterführend dazu genützt werden, um die Fluoreszenzemission der Oberfläche gebundenen Markermolekülen, z.B. die sehr empfindlichen Carbocyanin-Fluorophore zu erhöhen und dadurch die Empfindlichkeit der Methode erheblich zu steigern (Faktor von ca. 10).[137,144]

Der Einsatz der SPS in Verbindung mit weiteren oberflächenspektroskopischen Methoden wie die Raman- oder Fluoreszenzspektroskopie erhöht die Sensitivität und Spezifität von Bindungsstudien.

2 Aufgabenstellung

Zielsetzung dieser Arbeit war eine detaillierte Untersuchung von Zell-Oberflächen-Interaktionsprozessen in einem geeigneten Modellsystem bestehend aus Adhäsionsproteinen der Membran und entsprechenden Komponenten der extrazellulären Matrix. Dadurch waren verbesserte Kenntnisse der molekularen Wechselwirkungen zwischen Zellen und deren Umgebung erwartet.

Ein erster Schwerpunkt war das Design und die Synthese geeigneter Kollagenmodellpeptide aus der extrazellulären Matrix, die als funktionelle Erkennungsepitope für Zell-Membran-rezeptoren dienen würden. Dazu war eine Faltung der kollagenartigen Peptide in tripelhelikale Strukturen eine wichtige Voraussetzung. Zur Induktion und Stabilisierung der tripelhelikalen Faltung wurde der natürliche Cystinknoten des Kollagens Typ III gewählt. Diese interchenare Vernetzung führt auch zu einer konzentrationsunabhängigen Faltung, wodurch bio-physikalische und biochemische Experimente auch in den notwendigen niedrigen Konzentrationen an Liganden möglich werden. Eine eindeutige Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften dieser synthetischen homotrimeren Kollagenpeptide mit ein-gebauten Integrin-Erkennungsepitop sollte durch spektroskopische Methoden wie Circular Dichroismus und NMR erfolgen, aber auch durch mikrokalorimetrische Methoden wie DSC.

Tripelhelikale Kollagenpeptide sollten dann anschließend als Liganden für das α1β1-Integrin und dessen α1 I-Domäne untersucht werden. Dazu sollten mit den Kollagenpeptiden bio-funktionalisierte Grenzflächen erstellt werden, um die natürliche Umgebung der Zellmembran nachzuahmen und damit die Funktionalität der Integrine aufrechtzuerhalten. Zur experimentellen Untersuchung dieser dynamischen Interaktionsprozesse sollten zeitaufgelöste oberflächenanalytische Methoden wie die sensitive Oberflächenplasmonenresonanz-spektroskopie (SPS) und die weiterentwickelte Oberflächenplasmonenfluoreszenz-spektroskopie (SPFS) eingesetzt werden. Eine Übertragung der gewonnen Kenntnisse über diese bimolekularen Vorgänge auf lebende Zellen sollte als Abschluss dieser Arbeit dienen. Dabei war die Entwicklung biomimetischer Oberflächenderivatisierungen eine entscheidende Fragestellung, um eine gezielte Adhäsion von Zellen auf Oberflächen zu fördern. Es war zu erwarten, dass diese Arbeit auch zu neuen Erkenntnissen für applikative Aspekte in der Grundlagenforschung wie auch in der Transplantationsmedizin führen könnte.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Design homotrimerer Kollagenpeptide mit Zelladhäsionsmotiv

Basierend auf den Erfahrungen[145-148] der Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie entstand das Konzept der C-terminal Cystin-verknüpften homotrimeren Kollagenmodellpeptide mit eingebettetem Zelladhäsionsmotiv des Kollagens Typ I zur funktionellen Untersuchung von Integrin/Kollagen und Zell/Kollagen Interaktionen.

Eine Anwendung des C-terminalen Cystinknotens von Kollagen Typ I zur kovalenten Verknüpfung synthetischer Modellpeptide zu Homotrimeren wurde erstmals von Bächinger und Mitarbeitern erprobt[149,150] und anschließend in Stabilisierungseffekt auf die Tripelhelix anhand von $(Gly\text{-}Pro\text{-}Pro)_n$ Kollagenpeptiden von Engel und Mitarbeitern charakterisiert.[72,151,152] Aus diesen Arbeiten war nicht bekannt, ob die monomeren Kollagenpeptide zunächst unter Ausbildung der Tripelhelix zu Homotrimeren sich selbstassoziieren müssen, um die oxidative Bildung des Cystinknotens zu ermöglichen. Diese Fragestellung konnte im Arbeitskreis Moroder mit einfachen $(Gly\text{-}Pro\text{-}Hyp)_n$ Peptiden, die C-terminal mit der bis-Cysteinyl-Sequenz Cys-Cys-Gly-Gly-Gly verlängert wurden, geklärt werden. Nur nach Selbstassoziation und Faltung in die Tripelhelix führte eine Oxidation mit Luftsauerstoff oder GSSG/GSH in hohen Ausbeuten (70 %) zu den gewünschten Disulfid-vernetzten homotrimeren Kollagenpeptiden mit signifikanter Stabilisierung der Struktur gegenüber thermischer Entfaltung.[148,153,154]

Da eine stabile Tripelhelix und die daraus resultierende native Konformation des Bindungsmotivs die Grundvoraussetzung für die Erkennung der Adhäsionsepitope für Integrine darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit das Zelladhäsionsmotiv für α1β1- und α2β1-Integrine aus dem Kollagen Typ I [155,156] N- und C-terminal von zwei bzw. drei (Gly-Pro-Hyp) Tripletts flankiert. Von diesem Tripeptid als repetitive Einheit von Kollagensequenzen ist bekannt, dass es die idealste Sequenzabfolge für die Faltung und Stabilität der Tripelhelix darstellt.[24,157] Selbstassoziierte tripelhelikale Kollagenpeptide sind bekanntermaßen nur bei höheren Konzentrationen stabil (> 1 mmolar), wodurch bei niedrigen Konzentrationen, wie sie für viele biochemische Experimente notwendig sind, eine Entfaltung eintritt. Um sowohl diese konzentrationsabhängige wie auch die thermische Stabilität dieser Kollagenpeptide mit

eingebauter Adhäsionssequenz zu erhöhen, wurde eine Disulfidvernetzung mit dem natürlichen Cystinknoten des Kollagens Typ III vorgesehen. Eine hohe thermische Stabilität auch bei niedrigen Konzentrationen war eine Grundvoraussetzung für die geplanten Untersuchungen mit lebenden Zellen bei 37 °C.

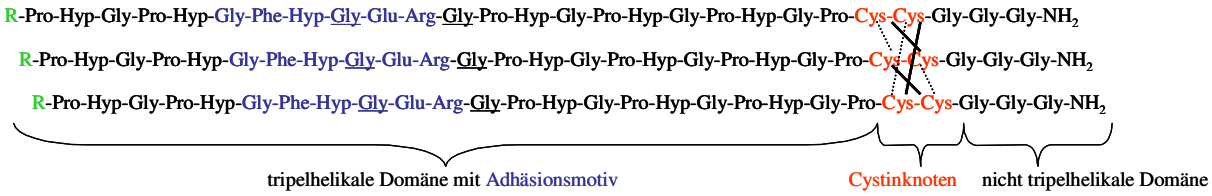
Basierend auf diesen Überlegungen wurde die Synthese folgender Peptide geplant, wobei für eine effiziente Einbettung dieser Kollagen-Modellpeptide in Membranen auch die Erstellung von N-teminal Lipo-derivatisierten Peptiden angestrebt wurde (siehe Abb. 10):

A: Kollagen-Einzelketten:

R-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-Gly-Gly-Gly-NH_2

EK1 mit R = Fmoc-Ser-
EK2 mit R = H_2N-Ser-Gly-
EK2* mit R = H_2N-Ser-^{15}N-Gly und unterstrichene Gly sind ^{15}N-Gly markiert
EK3 mit R = H_3C-$(CH_2)_8$-CO-Ser-

B: Kollagen-Homotrimere:



T1 mit R = H_2N-Ser-
T1* mit R = H_2N-Ser-^{15}N-Gly- und unterstrichene Gly sind ^{15}N-Gly markiert
T2 mit R = H_3C-$(CH_2)_8$-CO-Ser-

Abb. 10: Synthetische Kollagenmodellpeptide als Einzelketten (A) und Homotrimere (B) mit Angabe der unterschiedlichen N-Termini; dem Adhäsionsmotiv, der Cysteine bzw. der Cystinknoten. Bislang ist die genaue Zuordnung der Disulfid-Verknüfungen des Cystinknotens von Kollagen Typ III nicht bekannt; auch Arbeiten an einfachen Modellpeptiden erlaubten es nicht, diese Fragestellung definitiv zu lösen.[148]

C-terminal zur bis-Cysteinylsequenz wurden die drei Glycin-Reste der Kollagen Typ III Sequenz beibehalten, weil dadurch auch syntehtische Vorteile entstehen. Eine direkte Kupplung von Cystein-Resten an das Harz führt bekannterweise leicht zu Nebenreaktion.[158]

Außerdem verhindern diese zusätzlichen Glycin-Reste am C-Terminus eine elektrostatische Abstoßung und erleichtern dadurch die Selbstassoziation von drei Peptidketten und Faltung in die Tripelhelix vor der oxidativen Ausbildung des Cystinknotens.[148] Die geplanten synthetisierten Kollagenpeptide unterscheiden sich an ihrem N-Terminus. Um auch an dieser Stelle elektrostatische Abstoßung mit entsprechenden destabilisierenden Effekten auf die Tripelhelix zu vermeiden, wurden die Peptide mit Ser bzw. Ser-Gly verlängert. Die freie Aminogruppe, die für die Ankopplung der Peptide an festen Oberflächen für biophysikalische Experimente notwendig ist, wird dadurch von der eigentlichen Tripelhelix entfernt. Ebenso wurde der für die Synthese notwendige Fmoc-Rest teilweise beibehalten, um eine hydrophobe Interaktion der N-Termini zu ermöglichen und dadurch einer eventuellen Destabilisierung der Tripelhelix durch die Adhäsionssequenz entgegenzuwirken. Wie oben bereits erwähnt, war auch eine Lipoderivatisierung der N-Termini geplant, die eine Anhaftung des Kollanepeptids an Membranen erleichtern sollte. Zusätzliche synthetische Ketten mit jeweils drei ^{15}N-markierten Glycinen sollten strukturelle Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie ermöglichen.

3.2 Synthese der Kollagenmodellpeptide

3.2.1 Synthese der Einzelketten

Die Kollageneinzelketten wurden in fester Phase mit Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie[159] synthetisiert. Hierbei erfordert die Herstellung der Polypeptid-Einzelketten große Sorgfalt, um Fehlsequenzen und andere Nebenreaktionen zu vermeiden, da sich die Aufreinigung der Rohprodukte wegen ihrer Sequenzähnlichkeit als schwierig gestaltet. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass eine automatisierte Festphasensynthese im *Batch*-Verfahren von Kollagenpeptiden mit langen (Gly-Pro-Hyp) Bereichen durch die Ankupplungen der Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin in Sequenzabfolge nicht vollständig, sondern begleitet von verschiedenen Nebenreaktionen abläuft.[145] Deshalb wurde das, in der Arbeitsgruppe optimierte und publizierte geschützte Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH Tripeptid-Synthon in Lösung synthetisiert.[160] Durch Einsatz dieses Synthons lässt sich in der manuellen Festphasensynthese die unerwünschte Diketopiperazin Bildung während der basenkatalysierten

Fmoc-Abspaltung unterdrücken. Gleichzeitig wird auch eine O-Acylierung und dementsprechend die O→N Umacylierung, die durch N-terminal positionierte ungeschützte Hydroxyprolin-Reste stattfindet, vermieden. Die basenkatalysierte Diketopiperazin-Bildung bei speziellen Sequenzen wie dieser wurde schon sehr früh als synthetisches Problem erkannt.[161-163] Einen weiteren Vorteil dieses geschützten Tripeptids stellt die deutlich gesenkte Zahl der Einzelkupplungschritte an der Festphase dar. Des Weiteren wird die Ausbildung tripelhelikaler Strukturen am Harz, die eine schwierigere Zugänglichkeit der entstehenden Kette für die nachfolgenden Agenzien nach sich zieht, durch die Verwendung geschützter Hydroxylgruppen und mit ca. 0,4 mmol/g einer relativ niedrigen Beladung des Harzes unterdrückt.

Das Adhäsionsmotiv wurde zunächst als geschütztes Hexapeptid Fmoc-Phe-Hyp(*t*Bu)-Gly-Glu(*t*Bu)-Arg(Pbf)-Gly-OH mit Hilfe automatisierter Festphasensynthese hergestellt. Allerdings lief die folgende Fragmentkupplung des Epitops an das Harz-gebundene C-terminale Fragment des Peptides nicht vollständig ab. Deshalb wurden sämtliche Kollagenpeptide unter Verwendung des Tripeptidbausteins der einzelnen geschützten Aminosäuren für die Adhäsionssequenz an kommerziell erworbenen Rink-Amid-Harzen durch manuelle Festphasensynthese hergestellt.

Zur Verhinderung der basenkatalysierten Diketopiperazin-Bildung wurde die Fmoc-Schutzgruppe während der Festphasensynthese zunächst mit eisgekühlter 20 % Piperidin-Lösung (15 min + 20 min) abgespalten. Bei wachsenden Ketten wurde dieses Abspaltreagenz durch eisgekühlte 2 Vol.-% DBU und 2 Vol.-% Piperidin in DMF-Lösung ersetzt, um die Reaktionszeiten weiter zu verkürzen. Hierdurch konnte die Diketopiperazin Bildung weitgehend unterdrückt werden.

Die in älteren Arbeiten verwendeten Standardkupplungsreagenzien HBTU/TBTU in Kombination mit dem Adjuvanz HOBt erfordern mehrere Äquivalente geschützter Aminosäure-Derivate in Doppelkupplungen.[164] Der Nachteil des hohen Bedarfs an aufwendig in Lösung synthetisierten Tripeptidbausteins wird durch Verwendung des Kupplungsreagenz TFFH[165] umgangen, da durch die möglichen Doppelkupplungen mit 1,8 bzw. 0,8 Äquivalenten der theoretischen Verlust um etwa 2/3 gesenkt werden kann.[148] TFFH hat durch

die schnell verlaufende Kupplung des endständigen Prolins außerdem den Vorteil, die Zeit zur Diketopiperazin-Bildung zu verringern.

Der Arginin-Rest wurde während der Evaluierungsphase zunächst mit der Standard Pbf Schutzgruppe eingesetzt. In der Praxis führte die Abspaltung dieser Schutzgruppe zu Nebenreaktionen. Aus diesem Grund wurde Arginin als (ω,ω')-bis-Boc-Derivat eingesetzt. Die Cystein-Reste wurden als S-*tert*-Butylthio-Derivate eingesetzt, wobei durch deutlich verringerte Basenmengen eine leicht eintretende Racemisierung dieser Reste verhindert werden kann.[166,167] Durch die S-*tert*-Butylthio-Schutzgruppe kann die Peptidkette nach dem vollständigen Aufbau durch acidolytische Abspaltung vom Harz in der S-geschützten Form gewonnen werden, wodurch die notwendigen chromatographischen Reinigungsschritte ohne speziellen Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt werden können. Für die N-terminale Lipo-Derivatisierung wurden Fettsäuren nach der letzten Fmoc-Abspaltung an die freie Aminogruppe gekuppelt. Nach acidolytischer Abspaltung der Lipo-Peptide vom Harz mit gleichzeitiger Entfernung des Seitenkettenschutzes auf *tert*-Butyl-Basis war die Aufreinigung mittels HPLC aufgrund der resultierenden hydrophoben Eigenschaften erheblich schwieriger als im Falle der anderen Kollagenpeptide.

Mittels dieser Strategie konnten die Peptide **EK2**, **EK2*** und **EK3** mit geschützten Cystein-Resten, trotz nicht trivialer Synthese und Aufreinigung, die über den Bereich der normalen Standard Peptidsynthese weit hinausreichen, erfolgreich in vergleichbar guten und reproduzierbaren Ausbeuten synthetisiert werden (für analytische Daten der Einzelkette siehe Tabelle 2). Für **EK1** erwies sich sich die HPLC-Reinigung wegen der N-terminalen hydrophoben Reste als sehr schwierig und ein einheitliches Material konnte nicht gewonnen werden.

3.2.2 Synthese der Homotrimere mit natürlichem Kollagen Typ III Cystinknoten

Für die Assemblierung der Einzelketten zu den Homotrimeren war eine vorangehende effiziente Festphasensynthese und Aufreinigung der Einzelketten essentiell. Eine anschließende chromatographische Abtrennung von Dimeren oder Trimeren mit Fehlsequenzen wäre kaum möglich und zusätzlich mit sehr großem Materialverlust verbunden.

Die Abspaltung der S-*tert*-Butylthio-Schutzgruppe der Cysteine der gereinigten Einzelketten erfolgte durch Reduktion mit Tributylphosphin in einer TFE/H_2O Lösung unter Ausschluß von Luftsauerstoff. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt (siehe Abb. 11) und die reduktive Freisetzung der Cystein-Thiole war nahezu spontan. Die Aufarbeitung des Ansatzes wurde unter Argon durchgeführt, um eine vorzeitige Oxidation der Thiolo zu Disulfiden zu verhindern. Im Anschluss an die reduktive Entfernung der Schutzgruppe wurde der natürliche Cystinknoten des zuvor gefalteten Trimers ausgebildet.

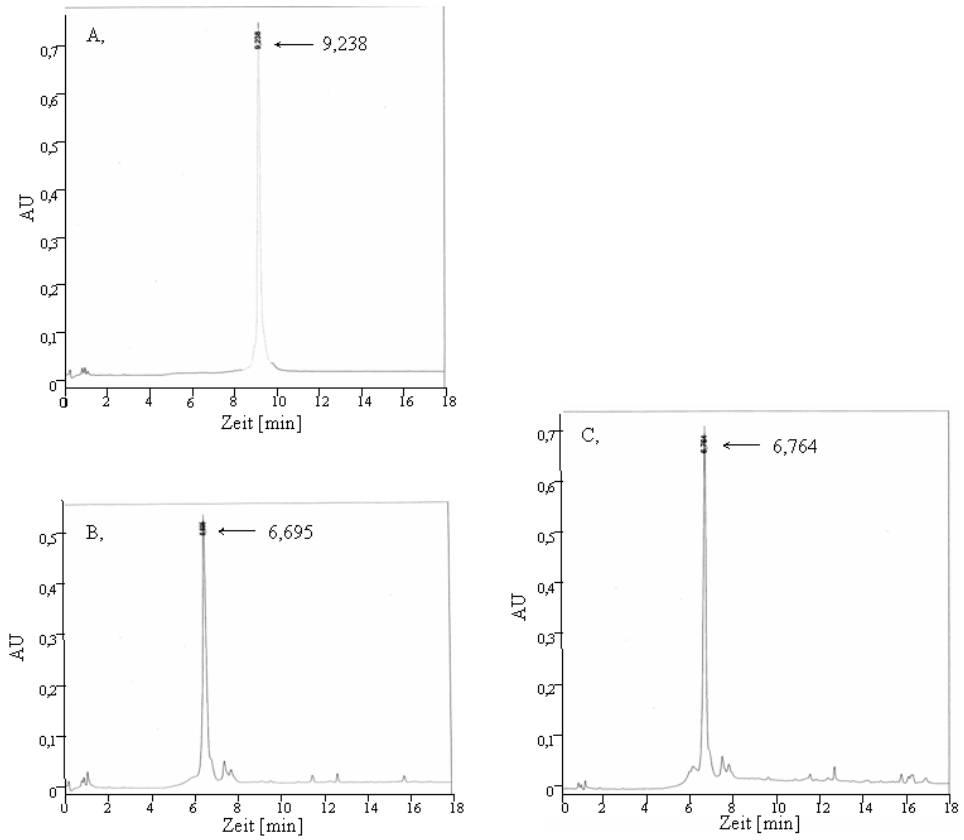


Abb. 11: HPLC Chromatogramme des Reduktionsansatzes für das Peptid **EK2*** mit P(C_4H_9). A: vor Zugabe des Phosphins; B: unmittelbar nach Phosphin-Zugabe; C: 5 h nach Reaktionszeit.

Die freien Peptide wurden nach Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen bis zur Weiterverwendung unter Vakuumbedingung aufbewahrt, um ein vorzeitiges Aufoxidieren der Cystein-Reste zu vermeiden.

*3.2.2.1 Oxidation der Einzelketten **EK2** und **EK2*** zu den Homotrimeren **T1** und **T1****

Zur oxidativen Bildung des Cystinknotens der Kollagenpeptide **EK2** bzw. **EK2*** mit freiem N-Terminus wurden die Monomere zunächst 5 h bei 7 °C in frisch hergestellter und entgaster 25 mM NH_4Ac-Lösung bei einer Konzentration von 10^{-3}-10^{-4} M unter Argon-Atmosphäre aufbewahrt, um eine Selbstassoziation und Faltung in die Tripelhelix zu garantieren. Die Ausbildung der Tripelhelix wurde mittels CD nachgewiesen (siehe Kapitel 3.3.1). Unter konstanter Kühlung wurde anschließend durch Luftsauerstoffzufuhr die oxidative Ausbildung des Cystinknotens ermöglicht. Von einer Zugabe von GSH/GSSG als Oxidationsmittel wurde abgesehen, da in vorangehenden Arbeiten mit diesem Redox-Puffer keine Vorteile bezüglich der Ausbeute erzielt wurden.[154] Der Reaktionsfortgang wurde mittels Ellmanns Reagenz auf DC-Platten überprüft. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Oxidation sehr langsam im Gegensatz zu früheren Beobachtungen [154] und war erst mit 30 Tagen abgeschlossen.

Die erfolgte Oxidation von **EK2** und **EK2*** zu den Homotrimeren **T1** und **T1*** konnte durch hochaufgelöste Massenspektrometrie voll bestätigt werden; so z.B. entspricht die dekonvolierte Masse von 7897,2 dem Trimer mit der Summenformel $C_{333}H_{482}N_{99}O_{114}S_6$ (M_R = 7897,5).

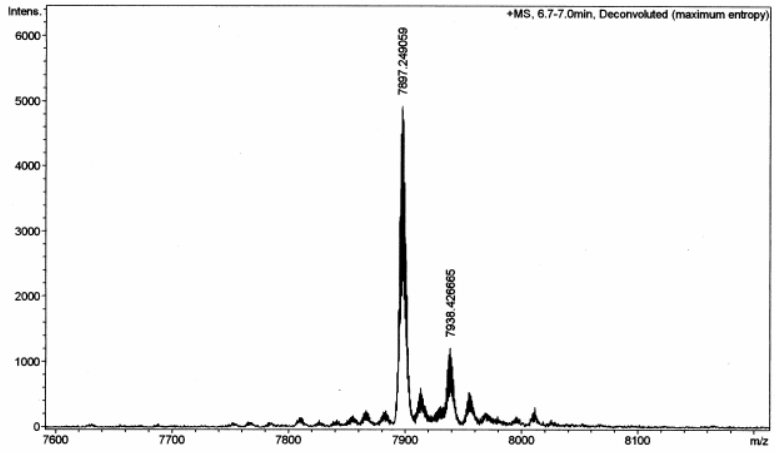


Abb. 12: Massenspektrum des Kollagentrimers **T1***. Die LC-MS-Messung wurde mit einem microTOF-MS Spektrometer durchgeführt.

Nach Oxidation zu den Homotrimeren konnten oxidierte monomere und dimere Peptidketten nicht nachgewiesen werden, während in früheren Experimenten mit $(Gly\text{-}Pro\text{-}Hyp)_n$-Cys-Cys-$Gly_3$ Peptiden (n = 5,7) die trimere Verbindungen in Ausbeuten von

ca. 70 % entstanden und hauptsächlich oxidierte Monomere und Dimere als Nebenprodukte identifiziert werden konnten. Diese praktisch quantitative Oxidation zum Homotrimer kann möglicherweise auf interchenare elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Glu- und Arg-Resten zurückzuführen sein, die im existierenden Gleichgewicht der verschiedenen Spezies selbstassoziierter Homotrimere, die Komponente mit dem richtigen Raster favorisieren könnte und deshalb eine weitgehende korrekte Oxidation herbeiführt. Wegen dieser praktisch qantitativen Ausbildung des Cystinknotens blieb ein zusätzlicher Reinigungsschritt für **T1** und **T1*** erspart und der damit verbundene Marterialverlustr konnte verhindert werden.

*3.2.2.2 Oxidation der Einzelkette **EK3** zum lipoderivatisierten Homotrimers **T2***

Die Oxidation des **EK3** Peptids war *a priori* problematisch, da dieses Peptid wegen des hydrophoben N-Terminus des Fettsäureacyl-Restes nicht in wässrigen Lösungen löslich ist. Dennoch wurde es der Oxidation zugeführt, wobei die Reaktion in Propylenglykol durchgeführt wurde. Dieses Lösemittel stabilisiert bekannterwiese die Tripelhelix und wurde bereits für solche Oxidationsexperimente erfolgreich eingesetzt.[150] Die Vorversuche mit **EK3** zeigten eindeutig die Bildung des trimeren Produktes laut massenspektrometrischer Analyse des Reaktionsgemisches. Die trimeren Verbindungen konnte aber nur in niedrigen Ausbeuten erhalten werden, weshalb es nur für Vorversuche in Integrin-Bindungsexperimenten eingesetzt werden konnte. Exakte Pufferung und Optimierung der Lösung könnte möglicherweise zu einer Verbesserung der Ergebnisse führen und eine zusätzliche Reinigung und der damit verbundene Arbeitsaufwand und Materialverlust unterbunden werden.

3.2.3 Massenspetrometrische Charakterisierung der Kollagenpeptide

Sämtliche Kollageneinzelketten und –trimer wurden mit Hilfe von ESI-LC-MS oder *micro-TOF-LC*-MS charakterisiert. In Tabelle 2 sind die Daten tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht der chromatographischen, massenspektrometrischen und theoretisch berechneter Daten der synthetisierten Kollagenmodellpeptide

Kollagen-peptid	RP-HPLC t_R [min]	ESI-MS bzw. mTOF-LC-MS *m/z*	M_r = theor. berechnet für
EK1	10,8	992,2 $[M+3H]^{3+}$	2973,4 g/mol
		1487,8 $[M+2H]^{2+}$	$C_{132}H_{186}N_{32}O_{39}S_4$
		und weitere	
EK2	9,5	937,1 $[M+3H]^{3+}$	2808,2 g/mol
		1405,1 $[M+2H]^{2+}$	$C_{119}H_{179}N_{33}O_{38}S_4$
EK2*	9,4	938,0 $[M+3H]^{3+}$	2811,2 g/mol
		1406,6 $[M+2H]^{2+}$	$C_{119}H_{179}N_{33}O_{38}S_4$
EK3	11,1	969,2 $[M+3H]^{3+}$	2905,4 g/mol
		1453,4 $[M+2H]^{2+}$	$C_{127}H_{194}N_{32}O_{38}S_4$
T1	7,3	1316,4 $[M+6H]^{6+}$	7889,5 g/mol
			$C_{333}H_{483}N_{99}O_{114}S_6$
T1*	7,3	7897,4 $[M+H]^{+}$	7898,4 g/mol
			$C_{333}H_{483}N_{99}O_{114}S_6$
T2	nicht bestimmt	1364,4 $[M+6H]^{6+}$	8181,15 g/mol
		8185,6 $[M+H]^{+}$	$C_{357}H_{528}N_{96}O_{114}S_6$
		und weitere	

* 15N-Gly markiert

3.3 Biophysikalische Charakterisierung der monomeren und trimeren Kollagenpeptide

Die konformationellen Eigenschaften synthetischer Kollagenmodellpeptide, natürlicher Kollagene sowie deren Fragmente können mit Hilfe verschiedener spektroskopischer Methoden charakterisiert werden. Mittels IR-Spektroskopie[168] wird Lage und Stärke der Amid-I-Bande und somit der jeweilige, allgemeine Faltungszustand bestimmt. Rasche und temperaturabhängige Rückschlüsse über die Faltung in Polyprolin-II-, tripelhelikalen oder *random coil*-Strukturen von kollagenartigen Peptiden ergeben sich aus circulardichroische (CD) Spektren. UV/Vis-spektroskopische Analysen erlauben durch Verschiebung der charakteristischen Absorption bei 223 nm für die Tripelhelix, Einblicke in die Entfaltung der Superhelix durch eine Signaländerung wegen der Peptid-Solvatisierung.[169-171]
Mittels NMR Untersuchungen können Aussagen über lokale Strukturen in Lösung getroffen werden.[172-174] In der vorliegenden Arbeit sollten NMR-Analysen strukturelle Details des Adhäsionsmotivs im Kollagen-Homotrimer sowie nach Bindung an die α1 I-Integrin-Domäne liefern.
Strukturelle Details zur Bindung des Adhäsionsmotivs an Integrine wurden aus Röntgenstrukturanalysen von Kristallen des Komplexes aus Homotrimer **T1** und α1 I-Domäne erwartet. Zudem könnte auf diesem Wege auch noch die noch unbekannte Struktur des Cystinknotens des Kollagen Typ III aufgeklärt werden.

3.3.1 CD Untersuchungen der synthetischen Kollagenpeptide

CD Spektren liefern die einfachste und schnellste spektroskopische Methode zur Konformationsanalyse von Peptiden und Proteinen; diese erlaubt ein einfaches Aufzeichnen von Faltungs- und Entfaltungsprozessen.[47,175] Für solche Konformationsanalysen werden CD-Spektren von Peptiden und Proteinen in Lösung im aussagekräftigen Bereich zwischen 190 und 260 nm aufgezeichnet. Ergebnisse liefern Hinweise über Anteile von α-Helix, β-Faltblatt, *random coil* oder anderen Konformationen. Die tripelhelikale Konformation kollagenartiger Peptide zeigt im CD-Spektren ein relativ schwaches Maximum bei 220-225 nm ($[\Theta]_{max}$ von 2 000 bis 6 000 deg cm^2dmol^{-1}) und ein intensives Minimum bei 196-200 nm ($[\Theta]_{max}$ von

-30 000 bis -55 000 deg cm^2dmol^{-1}). Ein sehr ähnliches CD-Spektrum liefert aber auch die Polyprolin-II-Helix; das entsprechende Spektrum unterscheidet sich von der Tripelhelix durch ein leicht rotverschobenes Maximum bei 224-226 nm ($[\Theta]_{max}$ von 500 bis 6 000 deg cm^2dmol^{-1}) und ein weniger intensives Minimum bei 198-205 ($[\Theta]_{max}$ von -10 000 bis -30 000 deg cm^2dmol^{-1}).[176] Diese zwei ähnlichen Spektren der unterschiedlichen Konformationen können durch den Rpn-Wert (Rpn = *ratio of positive peak intensity over negative peak intensity*) zusätzlich charakterisiert werden. Dieser Quotient wurde durch einen Vergleich von CD- und NMR-Konformationsstudien von $(Gly\text{-}Pro\text{-}Hyp)_n$ Peptiden verknüpft am N-Terminus mit der Kemp'schen Trisäure validiert.[54,177] Der Rpn-Wert liegt bei der Polyprolin-II-Struktur in wässrigen Medien bei ca. 0,06; für Kollagen Typ I wurde ein Wert von 0,13 ermittelt.[178] Dennoch sind zusätzliche Konformationsanalysen zur eindeutigen Charakterisierung tripelhelikaler Peptide notwendig.

So z.B. liefern thermische Entfaltungsexperimente weitere Unterscheidungsmöglichkeiten. Die Entfaltung tripelhelikalen Strukturen ist ein kooperativer Prozess, der in schmalen Temperaturbereichen abläuft. Man spricht deshalb von einem Zwei-Zustandeübergang (Alles-oder-Nichts), bei dem die Entfaltung der Tripelhelix in den ungefalteten Zustand ohne wesentliche intermediäre Zwischenstufen abläuft.[179] Während die Tripelhelix wesentlich durch repetitive Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, wird eine Polyprolin-II-Helix ausschließlich durch hydrophobe Wechselwirkungen induziert. Die thermische Stabilität hängt deshalb vor allem von sterischen Ansprüchen der Aminosäure-Reste und von der Aktivierungsenergie der *cis-/trans*-Isomerisierung der Xaa-Pro Peptidbindungen ab, so dass in einer Temperaturexkursion kein scharfer, d. h. kooperativer Übergang beobachtet werden kann.

Für die Konformationsanalysen der monomeren Kollagenpeptide wurden 1 mM Lösungen eingesetzt, um die Konzentrationsabhängigkeit der Tripelhelix-Struktur zu minimieren.[151] Diese Lösungen wurden vor der Aufnahme von CD-Spektren für mindestens 6 h bei definierten Temperaturen äquilibriert, um die entropisch nicht favorisierte Selbstassoziation zu ermöglichen. Disulfid-verknüpfte homotrimere Kollagenpeptide wurden in 0,03 mM Lösungen analog der Einzelketten vermessen.

Die Umwandlung der CD-Spektren in molare Elliptizität Θ_R [deg·cm^2·dmol^{-1}] bezogen auf die Anzahl der Peptidbindungen (nach Gleichung 1) ermöglicht den direkten Vergleich der Spektren untereinander.

Gleichung 1: $[\Theta]_R = \Theta/(100 \cdot c \cdot n_R \cdot l)$

Θ = Elliptizität [mdeg]; c = eingesetzte Konzentration der Lösung [mol/L]; n_R = Anzahl der Peptidbindungen; l = Pfadlänge der Zelle [cm].

Die nicht geglätteten Spektren sind als molare Elliptizität/Peptidbindung gegen die Wellenlänge dargestellt. In Tabelle 3 sind die wichtigsten CD Parameter der synthetischen Peptide aufgelistet. Die verhältnismäßig niedrigeren Rpn-Werte sind durch die Tatsache bedingt, dass die Tripelhelix im Adhäsionsmotiv und an den Termini aufgeweicht ist, was auch durch NMR-Messungen bestätigt werden konnte (siehe Abb. 17).

Tabelle 3: CD-Daten kollagenartiger Peptide mit Adhäsionsmotiv bei unterschiedlichen Bedingungen; die CD-Spektren der selbstassoziierte Einzelketten wurden in H_2O, MeOH, PG oder Puffer aufgenommen; Trimere in H_2O, PG oder Puffer; Proben wurden mindestens 6 h bei gleich bleibender Temperatur äquilibriert. Die Werte für **EK1** und **T2** sind nur indikativ, da diese Peptide nicht in homogener Form erhalten wurde.

Peptid	Bedingung	λ_{max} [nm]	Θ_{max} [deg·cm^2·dmol^{-1}]	λ_{min} [nm]	Θ_{min} [deg·cm^2·dmol^{-1}]	Rpn
EK1	4 °C; 0,15 mM#; PG	224,2	2982	200,5	-17355	0,172
	4 °C; 0,1 mM#; MeOH;	223,7	5152	199,3	-30446	0,169
EK2	4 °C; 1 mM; H_2O;	225,1	1320	199,1	-19634	0,067
	4 °C; 1 mM; PBS;	225,5	1129	200,4	-12796	0,088
EK2*	4 °C; 1mM; H_2O/D_2O;	224,9	2647	199,7	-21105	0,125
	25 °C; 1 mM; H_2O/D_2O;	232,8	367	209,0	-14614	0,025
EK3	4 °C; 1 mM; MeOH;	226,5	§	199,0	-609	
T1	4 °C; 0,03 mM; H_2O;	223,8	1891	199,0	-17747	0,107
T1*	4 °C; 0,03 mM; H_2O;	222,7	2247	198,9	-16466	0,136
	25 °C; 0,03 mM; H_2O;	224,1	2166	198,9	-15932	0,136
	4 °C; 0,03 mM; IBP;	223,8	2368	200,8	-17653	0,134
T2	4 °C; 1 mM; PBS;	224,0	1867	208,1	-17391	0,107

Proben wurden zunächst in 1 mM Konzentration hergestellt und direkt vor Messung auf die angegebene Konzentration verdünnt.

§ Minimum kann nicht angegeben werden

LM = Lösemittel; PG = Propylenglykol; IBP = Integrin-Bindungspuffer; Rpn = Quotient der Elliptizität der negativen und der positiven Bande

Die CD-Spektren der Trimere **T1** und **T1*** unterscheiden sich aufgrund ihrer identischen Zusammensetzung nur im Rahmen der Messgenauigkeit (Abb. 13). Die Verwendung von Wasser und verschiedenen Puffern als Lösemittel, beispielsweise **T1*** in H_2O mit Rpn = 0,136 und **T1*** in IBP mit Rpn = 0,134, Tabelle 3, beeinflusst die Rpn-Werte nur geringfügig. Die CD-Spektren bestätigen eine tripelhelikale Struktur sowohl für die monomeren **EK2** und **EK2*** Peptide nach Äquilibierung bei 4 °C in 1 mM wässrigen Lösungen als auch für die Trimere **T1** und **T1*** (siehe Abb. 13). Fünf (Pro-Hyp-Gly)-Tripletts und die zwei natürlichen Tripletts des Adhäsionsmotivs reichen aus, um eine Tripelhelix auszubilden. Der Cystinknoten führt bekannterweise zu einer signifikanten Stabilisierung der tripelhelikalen Struktur. Die praktisch identischen CD-Spektren der Trimere bei 4 °C und 25 °C zeigen, dass bei 25 °C die tripelhelikale Struktur noch voll erhalten bleibt, während die selbstassoziierte Tripelhelix von **EK2*** bereits bei 25 °C entfaltet ist (Abb. 13).

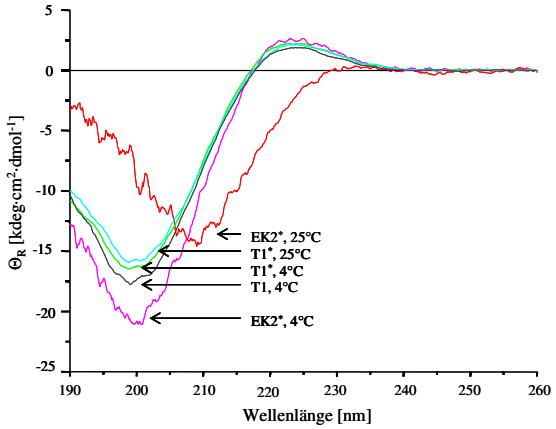


Abb. 13: CD-Spektren der Kollagenpeptide **T1**, **T1*, EK2** und **EK2*** im direkten Vergleich bei 4 °C und 25 °C in H_2O.

Die CD-Spektren für die hydrophoben Peptide **EK1** und **T2** mussten in MeOH oder Propylenglykol (PG) als Lösemittel durchgeführt werden. Für die Fmoc-derivatisierte Einzelkette **EK1** und das Fettsäure-derivatisierte Trimer **T2** konnte ebenfalls eine tripelhelikale Faltung nachgewiesen werden. Die Werte sind jedoch indikativ, da die Verbindungen nicht in homogener Form vorliegen. PG führt, verglichen mit H_2O oder wässrigen Puffern, zu außerordentlich hohen Rpn-Werten und erschwert den direkten Vergleich (siehe Tabelle 3).

Die Ausbildung der tripelhelikalen Struktur ist aufgrund von Mizellenbildung für **EK3** erschwert. Ein zu große Absorption bei der Aufnahme der CD-Spektren deutet auf Mizellenbildung hin und macht die Angabe der Intensität des Minimums und damit eine Berechnung des Rpn-Wertes nicht möglich. Es ist nicht möglich, anzugeben, ob **EK3** in tripelhelikaler oder in der Polyprolin-II-Struktur vorliegt.

3.3.2 Thermische Entfaltung der Kollagenpeptide

Die Aufzeichnung des beschriebenen positiven Cotton-Effekts bei 220-225 nm von Kollagenpeptid-Lösungen mittels CD in Funktion zunehmender Temperaturen ergibt Hinweise auf die thermische Stabilität der Tripelhelix-Struktur. Die Entfaltungskurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf, was einer kooperativen Entfaltung entspricht. Der Wendepunkt des Konformationsüberganges wird als Schmelzpunkt T_m der Struktur bezeichnet und liegt bei nativem Kollagen Typ I bei 38 °C. Die Endothermen aus DSC Messungen (*Differential Scanning Calorimetry*) ermittelt mit den jeweils identischen Probenlösungen aus den CD-Messungen, bestätigen das Schmelzverhalten der untersuchten Kollagenpeptide (siehe Tabelle 4, Abb. 14 - Abb. 16). Aufgrund gerätebedingter Kalibrierungseigenschaften sind DSC-Messungen erst nach einmaligem Durchlauf des vollständigen Temperaturgradienten verlässlich.

Abb. 14 zeigt die thermische Entfaltung des selbstassoziierten monomeren **EK3** in PG als Lösemittel ermittelt mittels DSC und CD. Durchgeführte zeitabhängige Untersuchungen in PG zeigen eine Erhöhung der verwendeten Heizrate von 12 °C/h auf etwa 15 °C/h. Eine Erklärung dieses Phänomens stellt die werksbezogene Kalibrierung des Gerätes mit Wasser und die größere Wärmekapazität des viskoseren PG im Vergleich zu wässrigen Puffersystemen dar. Das träge Verhalten dieses Lösemittels bezüglich der Wärmeübertragung kann zusätzlich zum unschaften Schmelzübergang und zu einer breiten Entfaltungskurve beitragen. Die CD-Schmelzkurven von **EK1** und **EK3** sind sehr ähnlich. Wenn der Beitrag der Verunreinigung nicht dominierend ist, würde dieses ähnliche Verhalten auf einen minimalen Einfluss der zwei unterschiedlichen N-terminalen hydrophoben Reste auf Ausbildung und Stabilität der Tripelhelix hinweisen.

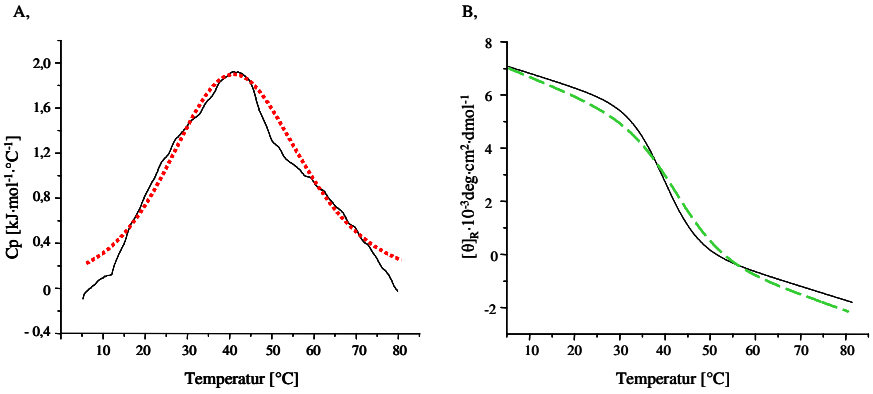


Abb. 14: A: DSC-Entfaltungskurve des selbstassoziierten Kollagenpeptids **EK3**, 1mM in Propylenglykol (PG); eingestellte Heizrate von 12 °C/h ergibt in PG etwa 15 °C/h, T_m = 41 °C, punktierte Linie = für Auswertung angepasste Linie; B: CD-Schmelzkurve der selbstassoziierten Kollagenpeptide **EK1** (gestrichelte Linie) und **EK3** (durchgehende Linie), 1mM in Propylenglykol (PG); Heizrate 12 °C/h, T_m(**EK1**) = 42 °C, T_m(**EK3**) = 41 °C.

In Tabelle 4 sind die Schmelzpunkte der tripelhelikalen Struktur der selbstassoziierten Kollagenketten **EK2** und **EK2*** und der Trimere **T1** und **T1*** aufgeführt, die durch CD und DSC ermittelt wurden. Die Werte für **EK1** sind richtungsweisend, da dieses Peptid nicht als homogenes Produkt erhalten werden konnten.

Tabelle 4: Schmelzpunkte der thermischen Entfaltung der Kollagenpeptide ermittelt mittels CD und DSC.

Peptid	Bedingung	CD-Schmelzkurve	DSC-Entfaltungskurven
EK1	1 mM in PG[#]	42 °C	nicht auswertbar
EK2	1 mM in H_2O	17 °C	17 °C
EK2	1 mM in PBS	24 °C	25 °C
EK2[*]	1 mM in H_2O	17 °C	17 °C
EK3	1 mM in PG[#]	41 °C	41 °C
T1	30 µM in H_2O	51 °C	54 °C
T1*	30 µM in H_2O	51 °C	52 °C
T1*	30 µM in IBP	56 °C	nicht durchgeführt

mit PG = Propylenglykol

* ^{15}N-Gly markierte Peptidkette

Ein Vergleich der Resultate von selbstassoziierten Einzelketten und des kovalent vernetzten Trimers in Abb. 15 und Abb. 16 bestätigt den erheblichen Stabilitätsgewinn von etwa $\Delta = 35$ °C durch den C-terminalen Cystinknoten. Die Schmelztemperaturen der Homotrimere mit dem natürlichen Knoten liegen über 50 °C, während das selbstassoziierte Homotrimer aus **EK2** einen Schmelzpunkt von 17 °C aufweist. Die Erhöhung der Tripelhelix-Stabilität von ca. 30 °C entspricht früheren Beobachtungen mit anderen Modellpeptiden.[148] Durch diese erhöhte Stabilität und wegen der Konzentrationsunabhängigkeit der tripelhelikalen Faltung des Homotrimers **T1** wird die essentielle Voraussetzung für Zellexperimente mit einer erforderlichen Arbeitstemperatur von 37 °C erfüllt.

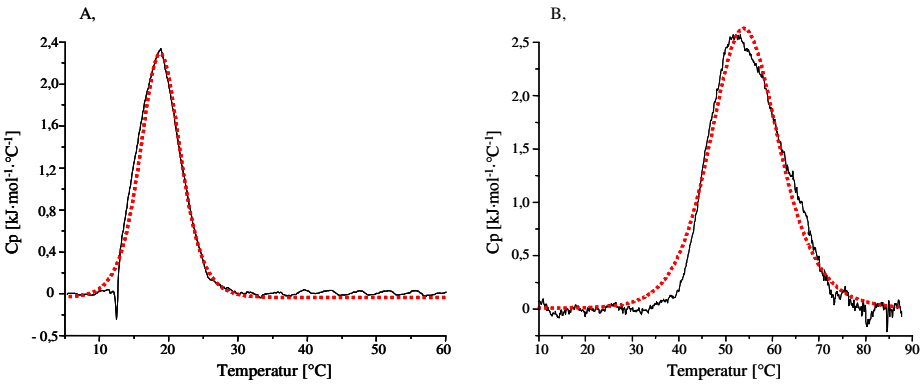


Abb. 15: DSC Entfaltungskurven (mit Heizrate von 12 °C/h); A: selbstassoziierte Einzelkette **EK2***, 1 mM in H_2O, $T_m = 17$ °C; B: Homotrimer **T1** mit Cystinknoten, 30 µM in H_2O, $T_m = 54$ °C; punktierte Linie = für Auswertung angepasste Linie.

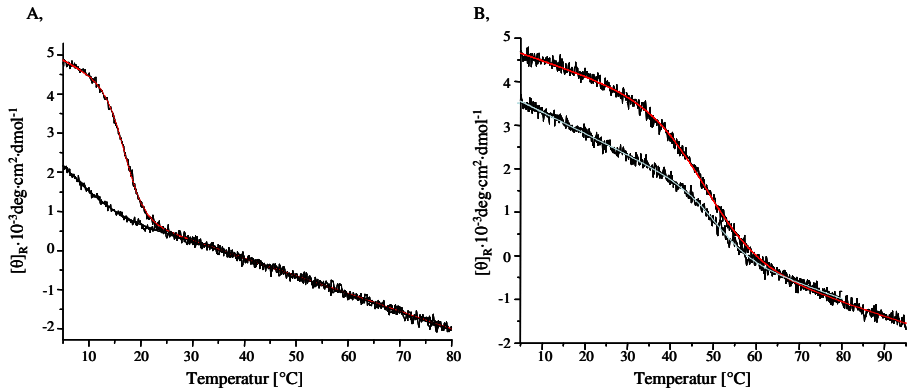


Abb. 16: CD-Schmelzkurven (mit 12 °C/h), Darstellung der Entfaltungskurve durch obere Linie; Darstellung der Rückfaltungskurve durch untere Linie; A: selbstassoziierte Einzelkette **EK2**, 1 mM in H_2O, $T_m = 17$ °C; B: Homotrimer **T1** mit Cystinknoten, 30 µM in H_2O, $T_m = 51$ °C.

3.3.3 NMR Untersuchungen

Die Kollagenpeptid-Einzelketten und –Trimere wurden in Zusammenarbeit mit Dr. S. Cadamuno und PD Dr. C. Renner der NMR Konformationsanalysen unterzogen, um Aussagen über lokale Strukturen in Lösung und strukturelle Details zu ermitteln.

Die 2D-NOESY Experimente bestätigen die Tripelhelix sowohl der Einzelketten als auch der Trimere, wie in Abb. 17 A exemplarisch für **EK2*** gezeigt wird. Der Bereich, der an der Tripelhelix beteiligten Glycine, ist im Spektrum hervorgehoben. Die 2D-^{1}H-^{15}N-Korrelationsspektren (FHSQC, *fast heteronuclear single quantum correlation*) der Einzelkette **EK2*** und des Trimers **T1*** (Abb. 17 B und C) verdeutlicht jedoch, dass die im Adhäsionsmotiv befindlichen Glycine nicht tripelhelikal gefaltet sind und somit die Tripelhelix in diesem Bereich aufgeweicht ist.

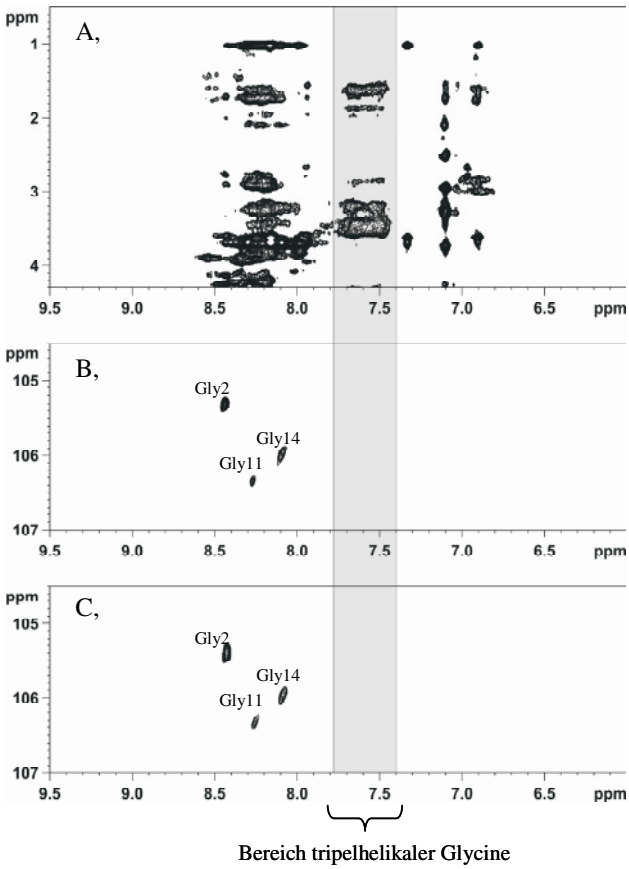


Abb. 17: A: Ausschnitt des 2D-NOESY-Spektrums von **EK2*** bei 4 °C: Der Bereich tripelhelikaler Glycine ist hervorgehoben; B: 2D-^{1}H-^{15}N-FHSQC-Spektrum von **EK2*** bei 4 °C: die Reste Gly11 und Gly14 im Adhäsionsmotiv und Gly2 am N-Terminus sind nicht tripelhelikal; C: 2D-^{1}H-^{15}N-FHSQC-Spektrum von **T1*** bei 4 °C: die Reste Gly11 und Gly14 im Adhäsionsmotiv und Gly2 am N-Terminus sind nicht tripelhelikal.

Temperaturverschiebungsexperimente bekräftigen die Aussage der FHSQC-Experimente. Die ^{15}N-Gly-Amidprotonen des Adhäsionsmotivs weisen in Temperaturabhängigkeit chemische Verschiebung der Signale von -7,5 und -11,3 ppb/K auf. Dies ist ein klarer Hinweis, dass diese Amidprotonen nicht in Wasserstoffbrücken involviert sind.

Der unterschiedliche Schmelzpunkt im CD-Spektrum von **EK2*** und **T1*** wird durch das unterschiedliche Verhalten bei 2D-^{1}H-^{15}N-FHSQC-Messungen bestätigt. Die ^{15}N-Gly Amidprotonen bilden zwar keine Wasserstoffbrücken im gefalteten Zustand, aber ihre Umgebung ändert sich dramatisch durch den gefalteten bzw. ungefalteten Zustand des Gesamtmoleküls. Bei 27 °C ist die **EK2*** ungefaltet und das Trimer **T1*** immer noch tripelhelikal, deshalb unterscheiden sich die entsprechenden Signale von **EK2*** und **T1*** (siehe Abb. 18).

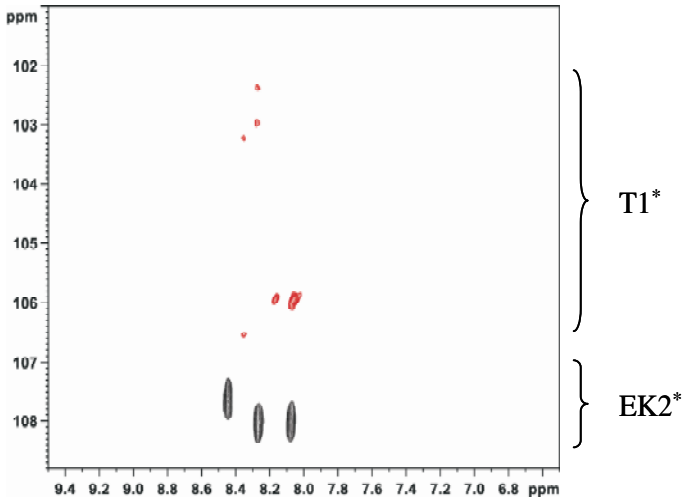


Abb. 18: 2D-^{1}H-^{15}N-FHSQC-Spektrum von **T1*** und **EK2*** bei 27 °C. Bei dieser Temperatur ist **T1*** im Gegensatz zu **EK2*** gefaltet.

Einen weiteren Hinweis zur Größe und Geometrie von Molekülen liefert die Bestimmung der Diffusionskonstanten (*translational diffusion constants).*[180] Unter gleichen Bedingungen (hier 4 °C, D_2O-Lösung) besitzen größere Moleküle kleinere Werte der Diffusionskonstanten. Die ermittelten Werte (siehe Tabelle 5) stimmen sehr gut mit den Erwarteten und denen der Referenzpeptide[181,182] überein. Der zweite Wert der Kollageneinzelkette **EK2*** verdeutlicht das Vorliegen des Monomers im Gleichgewicht mit dem selbstassoziierten Trimer.

Tabelle 5: NMR-Diffusionsmessungen: Konstanten (10^{-10} m^2/s) bei 4 °C in D_2O-Lösung

EK2*	**T1***	Referenzpeptid 1	Referenzpeptid 2[182]	Referenzpeptid 3[182]	H_2O
0,74 1,01	0,80	0,72	0,80	0,5	8,3

mit Referenzpeptid 1: Ac-(Pro-Hyp-Gly)$_7$Gly-Gly-NH_2

Referenzpeptid 2: Ac-[(4*R*)-FPro-Hyp-Gly]$_5$Pro-Cys(StBu)-Cys(StBu)-(Gly)$_3$-NH_2

Referenzpeptid 3: [Ac-(Pro-Hyp-Gly)$_5$Pro-(Cys)$_2$-(Gly)$_3$-NH_2]$_3$

Ein weiterer sehr interessanter Aspekt wäre das Verhalten und die lokale Flexibilität des Adhäsionsmotiv mit ungebundener und gebundener α1 I-Domäne in Lösung. Für diesen Vergleich eignen sich die ^{15}N-markierten Glycine im Adhäsionsmotiv. Leider ist bei den benötigten Konzentrationen für Titrationsexperimente der α1 I-Domäne mit **T1*** das Protein ausgefallen.

3.3.4 Kristallisationsexperimente

Die genaue Konnektivität der Cysteine im Kollagen Typ III Knoten konnte bislang, trotz „*molecular modeling*“ und NMR Untersuchungen, nicht endgültig geklärt werden.[154] Um diese Fragestellung zu beantworten und darüber hinaus wichtige Informationen zur Interaktion des Adhäsionsmotivs mit der α1 I-Domäne zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit I. Asen und Dr. K. Zeth entsprechende Kristallisationsexperimente mit dem Komplex Trimer **T1/**α1 I-Domäne durchgeführt. Emsley und Mitarbeitern konnten von einem Komplex eines ähnlichen trimeren Kollagenpeptides mit der Sequenz Ac(GPO)$_2$GFOGER(GPO)$_3$-NH_2 und einer rekombinanten α2 I-Domäne streuende Kristalle gewinnen.[92,183] Trotz dieser bekannten und weiteren 480 verschiedenen Kristallisationsbedingungen konnten bislang keine Kristalle ausreichender Größe erhalten werden. Alle Versuche das Trimer **T1** alleine zu kristallisieren, scheiterten genauso, obwohl die Kristallisationsbedingungen für (Gly-Pro-Pro)$_{10}$ und (Gly-Pro-Hyp)$_{10}$ bestens bekannt sind.[29,31,184,185]

3.4 Alpha1 I-Domäne des alpha1 beta1-Integrins

Das Kollagenmodellpeptid mit dem spezifischen Zelladhäsionsmotiv Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg zur Bindung der Integrine α1β1 und α2β1 wird von dem als I-Domäne bezeichneten Proteinbereich der Integrin α-Untereinheit gebunden.[155] Röntgenstrukturanalysen des kristallinen Komplexes der α2 I-Domäne mit unverbrückten Kollagentrimeren mit dem Adhäsionsmotiv wurden bereits von der Arbeitsgruppe um Emsley gelöst.[92,183] Entsprechende Strukturdaten der α1 I-Domäne mit Kollagenpeptiden oder -proteinen mit einem eingebetteten Adhäsionsmotiv sind noch ausständig. Für Bindungsassays und Kristallisationsexperimente wurde die α1 I-Domäne exprimiert, isoliert und als gefaltetes Protein charakterisiert.

3.4.1 Expression der α1 I-Domäne als GST Fusionsprotein in E.Coli mit Expressionsvektor pGEX

Der pGEX-4T-3 Vektor mit *Bam*HI und *Sal*-I insertierte α1 I Domäne in *E.coli,* ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Prof. J. Käpylä, University of Jyväskylä, Finnland,[186] diente der Expression des Proteins in löslicher und aktiver Form. (Vektor siehe Anhang)

Das rekombinante Proteinfragment wurde als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein mit N-terminalem GST-Anker in *E.coli* exprimiert. Dies ermöglichte die Isolierung des Fragmentes, da diese spezifisch an ihren natürlichen Liganden Glutathion (GSH) bindet. Zusätzlich befand sich an Position 918 – 935 mit Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser eine Thrombin-Schnittstelle. So kann der GST-Anker bei Bedarf entfernt werden. Die effiziente Expression war durch das Ampicillinresistenzgen und einen tac-Promotor gewährleistet. Die Transkription des Fusionsproteins konnte durch die Bindung von Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden.

Für die Kultivierung wurden die transformierten *E.coli* Zellen als Übernachtkultur angesetzt. Die Vorkultur wurde mit Ampicillin supplementiertem LB Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) = 1 angezogen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG. Nach der Induktion wurde das Medium durch Zentrifugation abgetrennt. Die Sedimente wurden in PBS-Puffer resuspendiert und bis zur Aufreinigung eingefroren.

3.4.2 Aufreinigung der α1 I- Domäne durch Affinitätschromatographie

Das Fusionsprotein mit GST-Anker wurde im Zelllysat durch Batchprozess über Nacht an GSH-Sepharose™4B gebunden. Für die Aufreinigungsschritte wurde eine geeignete Chromatographiesäule verwendet und das Fusionsprotein darin in PBST gequollen. Auf diesem Weg konnten Fusionsproteine schnell und schonend aus bakteriellen Lysaten isoliert werden. Um den relativ großen GST-Anker (26 kDa) nach der Reinigung abspalten zu können, bestand der Linker zwischen der GST und dem Protein aus der Erkennungssequenz für die Thrombin-Protease. Die lyophilisierte Protease wurde mit eiskaltem PBS-Puffer rekonstituiert und zusammen mit der an GSH-Sepharose™4B gebundenen α1 I-Domäne inklusive GST-Anker in der Säule inkubiert. Anschließend wurde die α1 I-Domäne als Eluat aufgefangen. Da das Eluat des Thrombinverdaus neben der gewünschten α1 I-Domäne auch Thrombin-Protease enthielt, wurde das Thrombin mittels Benzamidin Sepharosesäulen in einem chromatographischen Schritt entfernt. Dazu wurde zur Reinisolierung der α1 I-Domäne die Benzamidin Sepharosesäule nach Herstellerangaben präpariert und die gewünschte Salzkonzentration eingestellt. Das Protein wurde nach chromatographischer Trennung im Eluat erhalten.

Um die Aufreinigung der α1 I-Domäne überprüfen zu können, wurden an geeigneten Stellen Proben entnommen und gemeinsam mittels SDS-PAGE nach Laemmli[187] aufgetrennt (Abb. 19). Zur Denaturierung der Proteine erfolgt zuvor Erwärmung der Proben. Anschließende kurze Zentrifugation dient unter andere der Abtrennung der Gluthation-Sepharose 4B™ Partikeln. Die Elektrophorese-Anfangsspannung liegt bei 80 V. Nachdem die Lauffront die Trenngelgrenze erreicht hat, wird die Spannung erhöht. Erreicht die Lauffront die untere Gelgrenze wird der Lauf gestoppt und die Proteinbanden mit Coomassie-Färbung[188] gefärbt. Das Gel wird ausgewertet, getrocknet und archiviert.

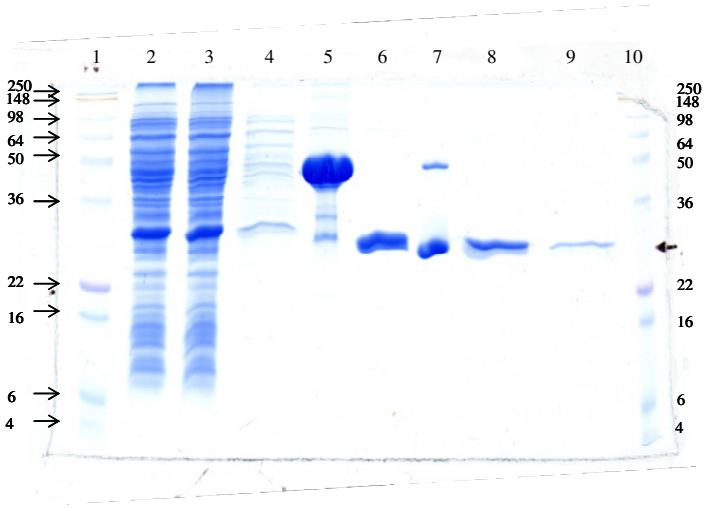


Abb. 19: SDS-PAGE der Aufreinigung der α1 I-Domäne; Proteinbanden mit Coomassie visualisiert; Spur 1+10: Standardmarker; Spur 2: Zelllysat-Überstand; Spur 3: Zelllysat nach Binden an Sepharose Partikel; Spur 4: Waschlösung nach Sepharose-Bindevorgang; Spur 5: beladene Sepharose Partikel; Spur 6: Thrombin-Eluat; Spur 7: mit Thrombin gewaschene Sepharose Partikel; Spur 8+9: Benzamindin-Eluat = α1 I-Domäne.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen

Zum Aufkonzentrieren der Proteinlösung und Pufferwechsel für Integrin-Bindungsexperimente wurde je nach Ausgangsvolumen *Centriprep-* oder *Centricons*-Membransäulen nach Herstellerangaben verwendet. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte zunächst durch Abschätzung mittels kommerziell erworbenem 10-20 % Tricin-Gradientengel durch Gegenüberstellung unterschiedlicher Verdünnungen mit bekannten Standardmarkerkonzentrationen. Mit UV/Vis spektroskopischer Methoden, beschrieben durch das Lambert-Beer'schen Gesetz (siehe Gleichung 2) wurden die Konzentrations-abschätzungen verifiziert und durch den Bradford-Test[189] bestätigt.

Gleichung 2: $E_\lambda = -\log(I/I0) = c \cdot \varepsilon_\lambda \cdot d$

E_λ = Extinktion (Absorbtion an der Wellenlänge λ); I = Intensität des transmittierten Lichts; I_0 = Intensität des eingestrahlten Lichts; c = Konzentration der absorbierten Substanz in Flüssigkeit; ε_λ = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei λ, kann pH-Wert abhängig sein; d = Wellenlänge des Lichtes in Flüssigkeit.

Die α1 I-Domäne konnte in Konzentrationen von etwa 7µg/µL in IBP-Puffer erhalten werden.

3.4.4 Charakterisierung der α1 I-Domäne

Um den gefalteten Zustand der Proteindomäne zu prüfen, wurden CD-Spektren im Integrin-bindungspuffer (IBP) aufgenommen.

Das CD-Spektrum der exprimierten α1 I-Domäne weist zwei negative Minima bei 222 nm und 208 nm sowie einen positives Maximum bei 195 nm auf (Abb. 20). Verlauf und Intensität des Spektrum sind dem Literatur-bekannten Spektrum dieser Domäne[111] sehr ähnlich und bestätigt den hohen Anteil an α-Helices.

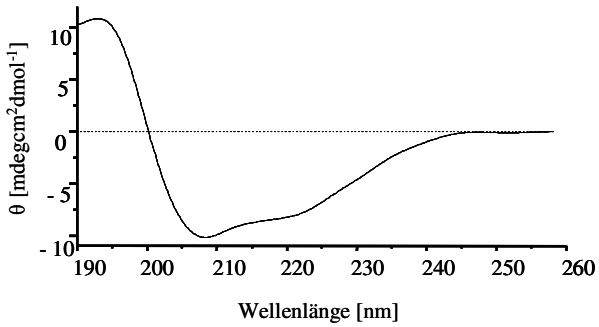


Abb. 20: CD-Spektrum der isolierten α1 I-Domäne nach der Aufkonzentrierung in PBS; Messung nach NMR-Spektroskopie um 1/100 verdünnt, 4 °C, Bandweite: 1 nm, Scan-Geschwindigkeit: 50 nm/min, Küvetten-Schichtdicke: 0,1 cm; Vier Aufnahmen wurden zur Erstellung der gezeigten CD-Kurve gemittelt und gegen den Puffer-Leerwert korrigiert.

Das ^{1}H NMR Spektrum der α1 I-Domäne in PBS Puffer/D_2O, pH 7,2, bei 27 °C bestätigte vor allem im Bereich der Amidprotonen ganz eindeutig, dass das Protein gefaltet vorliegt. Auch die ermittelte Konzentration von 8-10 mg/mL stimmt gut mit den UV-Wert von 7 mg/mL überein.

3.5 Bindungsexperimente der alpha1 I-Domäne an das trimere Kollagenpeptid mittels SPR

3.5.1 Planung der Experimente

BIAcore-Messungen (BIA = bimolekulare Interaktions-Analyse) ermöglichen zeitabhängige Untersuchungen von Adsorptionsprozesse an einer fest/flüssig-Grenzfläche. Für solche Experimente werden die zu untersuchenden Liganden auf einer Sensoroberfläche

immobilisiert, um die Bindungsfähigkeit eines in Lösung über diese Oberfläche geführten Analyten, z.B. der Kollagenrezeptoren zu ermitteln (Abb. 21).

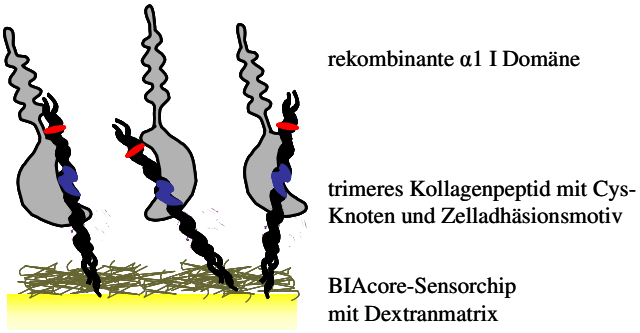


Abb. 21: Darstellung des experimentellen BIAcore Versuchsaufbaus: Immobilisierte Kollagenmodellpeptide auf Dextranmatrix-Sensorchipoberfläche; Zugabe der rekombinante α1 I-Domäne als Analyt.

Eine mögliche Interaktion zwischen dem Adhäsionsmotiv des Kollagenmodellpeptids und der α1 I-Domäne wird durch das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), einer sehr sensitiven und nichtinvasiven Detektionsmethode, in Echtzeit verfolgt. Ein Anstieg des SPR-Signals signalisiert die Interaktion des immobilisierten Liganden mit dem injizierten Analyten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Carboxydextran-beschichtete *CM5*-Sensorchips zur Verankerung des Kollagenpeptids verwendet. Diese wurden den *C1*-Sensorchips vorgezogen, da sie durch eine Carboxydextranmatrix größere Abstände des immobilisierten Bindungspartner zur Oberfläche sicherstellen.

Der *CM5*-Chip enthält vier unabhängig voneinander ansteuerbare Oberflächenbereiche, so dass parallel verschiedene Oberflächenbelegungen getestet werden können. Das Kollagenpeptid wurde kovalent durch eine Amidierung des Nα-Terminus an die aktivierten Hydroxysuccinimidester der Matrix des Sensorchips gebunden. Bei Immobilisierung der Peptide war eine starke Interaktion mit der Carboxydetranmatrix zu beobachten, die möglicherweise auf Wechselwirkungen zwischen den Hydroxylfunktionen der Hyp-Reste und den Alkoholgruppen der Matrix zurückzuführen sind.[190] Nach dem Immobilisierungsschritt wurde unspezifisch gebundenes Kollagenpeptid durch Waschen mit 5 M Guanidinium Hydrochlorid (GUA) von der Oberfläche abgelöst. Diese Behandlung könnte zur Entfaltung der Tripelhelix führen, aber anschließendes Waschen mit Puffer sollte eine korrekte Rückfaltung garantieren.

Es wurde auch überprüft, ob durch Verwendung verschiedener Puffersystemen die Belegung des Kollagentrimers auf der Dextranmatrix optimiert werden kann. Dazu wurden, wie in Tabelle 6 zusammengefasst, unterschiedliche Puffersysteme auf verschiedenen Spuren des gleichen *CM5*-Sensorchips getestet. Natrium Acetat- und Phosphat-Puffer ermöglichen eine optimale Immobilisierung des Kollagentrimers auf der Sensoroberfläche und wurden daher für die Immobilisierung verwendet.

Tabelle 6: Zusammenfassung verwendeter Puffer für Immobilisierung der BIAcore-Sensorchips.

Spur	Puffer	Resultat der Immobilisierung
1	H_2O	Negativkontrolle
2	NaOAc, 10 mM, pH 4,0	+ → für Immobilisierung geeignet
3	PBS, 1X, pH 7,3	+ → für Immobilisierung geeignet
4	$NaHCO_3$, 10 mM, pH 9,4	- → für Immobilisierung ungeeignet

Um etwaige unspezifische Wechselwirkungen auf der Sensoroberfläche von spezifischen Interaktionen unterscheiden zu können, wurde mindestens eine Spur des Chips nicht mit Kollagenpeptid belegt und diente als Referenzspur und Negativkontrolle. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass Messungen der Peptid-Analyt Interaktion nicht durch unspezifische Analyt-Matrix-Wechselwirkungen verfälscht werden. In den vorliegenden Experimenten konnten keine unspezifischen Interaktionen während der Messungen festgestellt werden, d.h. die inerte, hydrophile Dextranmatrix ist für die α1 I-Domäne nicht unspezifisch bindend.

Eine Verankerung der exprimierten α1 I-Domäne auf dem Sensor-Chip und synthetisches Kollagen als Analyt in der Flüssigphase sollte zu identischen Ergebnissen der Bindungsaffinität führen. Allerdings ist die Integrindomäne mit 25 kDa wesentlich größer als das Kollagentrimer mit knapp 9 kDa. Deshalb war der Massenzuwachs durch Bindung der Integrindomäne wesentlich leichter zu detektieren und somit die I-Domäne als Analyt vorzuziehen.

3.5.2 Bindungs- und Kinetikmessungen

Die Adsorption der isolierten rekombinanten α1 I-Domäne an die mit Kollagentrimer funktionalisierte Dextranmatrix wurde mittels SPR-Kinetik quantifiziert. Um den Einfluss von unspezifischer Bindung an die Matrixoberfläche zu erfassen, wurde das Referenzexperiment mit einer äquivalenten Oberfläche ohne Peptidderivatisierung erfasst. Die Messungen wurden bei konstantem Fluss durchgeführt.

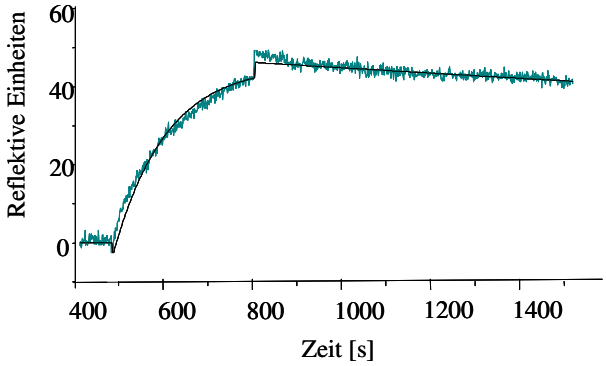


Abb. 22: Interaktionsmessung des synthetischen Kollagenpeptid **T1** mit der rekombinanten α1-I-Domäne; Kinetische Auswertung erfolgt mit 1:1 Modell der Langmuir-Theorie zur Bestimmung der *on*- und *off*-Raten; schwarze Kurve beschreibt die Kurvenanpassung; $K_D = 1{,}45 \cdot 10^{-6}$ M, d.h. µmolarer Bereich.

Abb. 22 zeigt, dass eine Bindung der α1 I-Domäne an das immobilisierte **T1**-Kollagentrimer erfolgt. Aus Kurvenform, Signalhöhe und der Konzentration des eingesetzten Analyten ist eine Berechnung der Bindungsstärke (K_D) möglich. Durch nichtlineare Transformation wird die Kinetik der Interaktionen berechnet.[191-193] Den Bestimmungen der *on*- und *off*-Raten wird das 1:1 Modell der Langmuir Theorie zu Grunde gelegt. Aus den berechneten Werten kann der Dissoziationskoeffizient K_D, als Maß für die Stärke der Bindung, ermittelt werden.

Für die Bindung des immobilisierten synthetischen Kollagens **T1** und der α1 I-Domäne wurde ein K_D-Wert von $1{,}45 \cdot 10^{-6}$ M, d.h. im µmolaren Bereich bestimmt. Dies weist auf eine relativ starke Bindung hin, die im Wesentlichen mit den Werten für natürliche Kollagen/Integrin Interaktionen übereinstimmt.[112]

3.6 Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie am Eigenbau-SPFS-Gerät

Eine Weiterentwicklung der SPS ist die Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie (SPFS), bei der das evaneszente Feld der Plasmonen die Fluoreszenz geeigneter Fluorophore verstärkt.[126,137]

3.6.1 Details zum verwendeten Eigenbau-SPFS-Gerät

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmonenspektrometer[194] ist durch Abb. 23 skizziert. Die Plasmonen der Gold-Schicht werden mit Hilfe eines HeNe-Lasers angeregt. Dieser Laserstrahl passiert zuvor zwei Glan-Thompson Polarisatoren, wovon der erste zur p-Polarisierung des Lichtes und der zweite für die Intensitätsregelung verwendet werden. Unter einem Winkel θ_i, welcher durch ein Zweikreis-Goniometer eingestellt wird, trifft der Lichtstrahl auf ein Glasprisma. Der goldbeschichtete LaSFN9-Glasträger, auf dem später die zu untersuchende Oberfläche aufgebaut wird, wird mit Immersionsöl (n = 1.680) optisch an das Prisma gekoppelt.

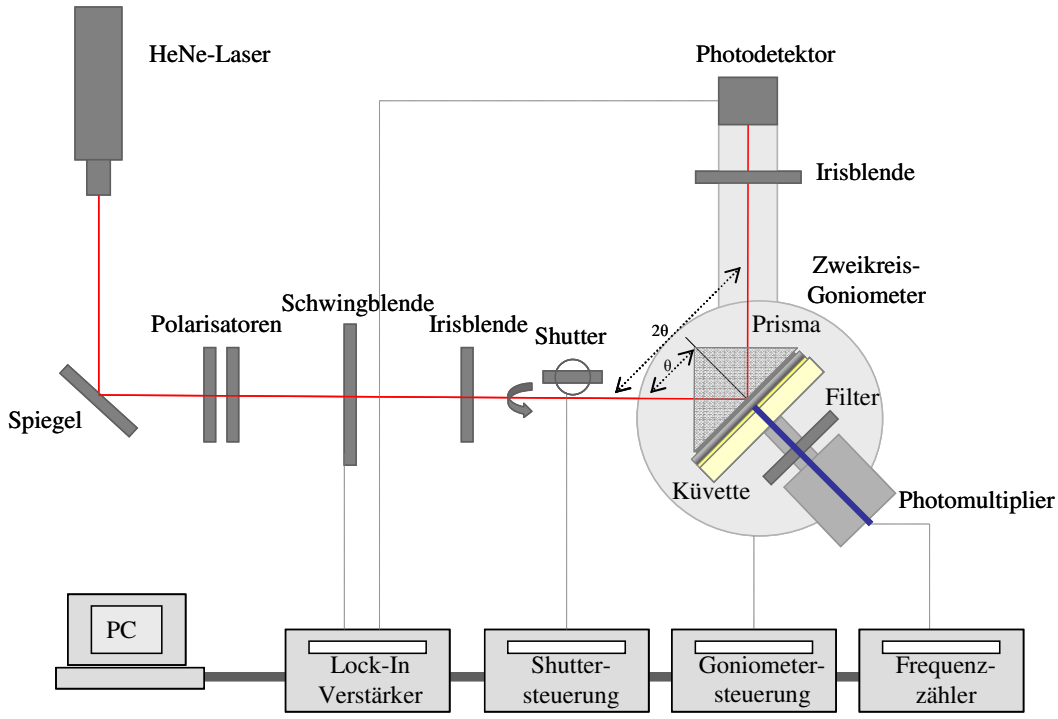


Abb. 23: Anordnung des verwendeten SPFS-Messaufbaus.

Die Goldschicht auf dem Glasträger sowie ein Objektträger begrenzen die verwendete offene Küvette (siehe Abb. 25 B), die im weiteren experimentellen Verlauf sukzessiv von den Lösungen im Rahmen der Oberflächenpräparationen und Derivatisierung der Goldschicht, anschließend von den gelösten Analyten zu Interaktionsstudien durchströmt wird (Abb. 24).

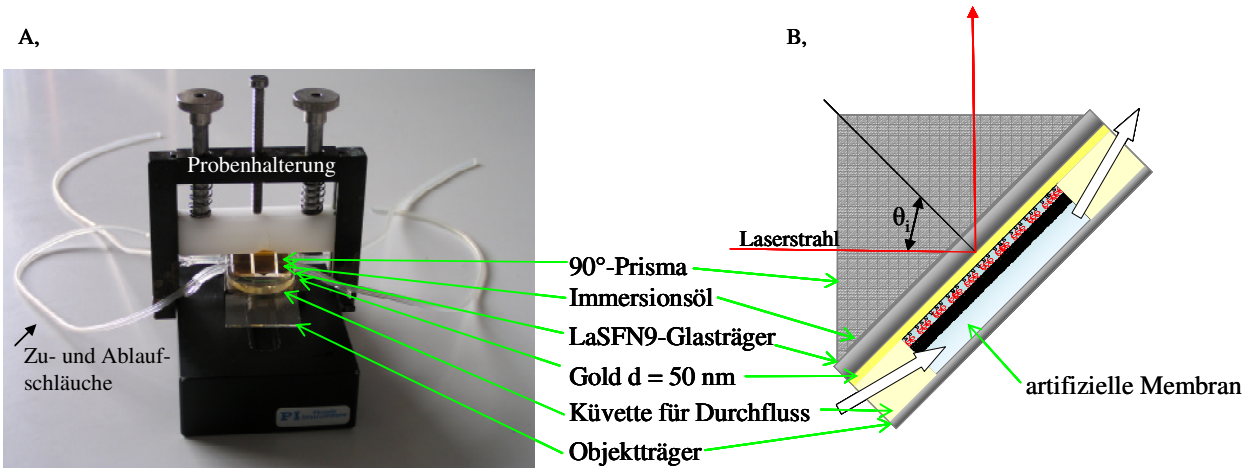


Abb. 24: A: Prisma-Küvetten-Goldträger „*Sandwich*“; B: Kretschmann-Konfiguration mit Durchflussküvette.

Vorangegangene Interaktionsexperimente wurden in Glasmeßküvetten (siehe Abb. 25 A) durchgeführt. Spülvorgänge mussten deshalb per Hand mit Hilfe von zwei eingeführten Kanülen ausgeführt werden. Diese Methode war sehr zeitintensiv und es bestand die Gefahr, dass die aufgebaute Oberfläche durch die händisch geführten Kanülen beschädigt wurde. Zur Arbeitserleichterung wurden die beschriebenen und verwendeten Küvetten aus Zwei-komponentensilikon mit Zu- und Ablauf entwickelt, welche zudem an Pumpen angeschlossen werden können.

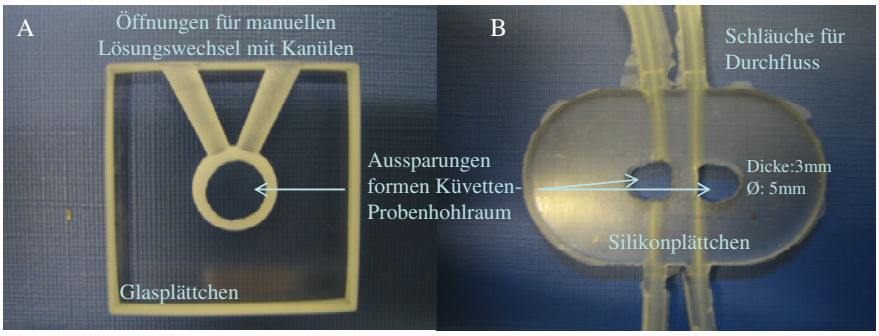


Abb. 25: SPFS-Küvetten. A: bisher verwendete Glasküvetten offerieren nur manuellen Lösemittel-Wechsel mit Kanülen; B: Sylgard-Silikonküvetten mit Schläuchen für Zu- und Ablauf der gewünschten Lösungen.

Zur Detektion des reflektierten Strahls wird das Licht durch eine Bikonvexlinse mit der Brennweite f = 100 mm auf eine Si-Photodiode fokussiert. Der Laserstrahl wird mit Hilfe einer Schwingblende mit einer Frequenz von 1193 Hz moduliert, um den Einfluss von Hintergrundlicht mittels *Lock in* Verstärker herausfiltern zu können.
Aus der Messzelle emittierte Fluoreszenz wird von einem Interferenzfilter selektiert, mit einem Photomultiplier gemessen und synchron zu dem reflektierten Licht der Plasmonen aufgezeichnet.

Der zeitliche Verlauf des artifiziellen Membranaufbaus wird mittels plasmonenspektroskopischer Kinetikmessungen erfasst. Die Intensität des reflektierten Lichts wird über eine vorgegebene Zeit bei einem fixierten Anregungswinkel aufgezeichnet. Dabei ändert sich durch kovalente Bindungen und Adsorption an der Goldoberfläche das Brechungsverhalten wodurch der Resonanzwinkel verschoben wird. Dieser beschreibt den Einfallswinkel unter welchem Oberflächenplasmonen angeregt werden können.
Durch die empirischen Reflektivitäten können mit den Fresnel-Gleichungen[143] bei Kenntnis der Brechungsindizes die physikalischen Schichtdicken errechnet werden.[4,140]

3.6.2 Planung der Versuchsanordnung

Die Bindung des synthetischen Kollagentrimers **T1** mit dem beschriebenen spezifischen Adhäsionsmotiv für α1β1- und α2β1-Integrine an die lösliche, rekombinante α1 I-Domäne konnte mittels SPR-Messungen am *BIAcore2000*-Gerät nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.5.2.). Eine weitere Annäherung dieser Experimente an natürliche, biologische Verhältnisse wurde durch die Weiterentwicklung der Methode zur Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie (SPFS) geplant.
Zum einen war es mit dem Eigenbau SPFS-Gerät möglich, artifizielle Membranen sequenziell aufzubauen, in die Proteine unter Erhalt ihrer biologischen Funktionalität durch Imitation ihrer natürlichen Umgebung eingebettet werden können. Zum anderen konnte die Empfindlichkeit der Methode durch die Einbeziehung von Fluoreszenzeffekten weiter erhöht werden.

In einer ersten Versuchsanordnung sollte das Kollagen in der Membran eingebettet werden und dem Integrin zur Erkennung/Bindung angeboten werden (siehe Abb. 26). Grundgedanke bei diesem Experiment war, dass neben der besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen am *BIAcore2000*-Gerät, das Integrin vor allem erheblich größer und damit der Massenzuwachs leichter zu detektieren ist. Das Kollagenpeptid sollte auf der Oberfläche in die tBLM inkorporiert und die exprimierte α1 I-Domäne oder auch ein kommerziell erworbenes, in Detergenz solubilisiertes α1β1-Integrin als Bindungspartner in Lösung angeboten werden. Zur benötigten Fluoreszenzmarkierung wurden die α1 I-Domäne bzw. das heterodimere Integrin mit dem monofunktionalen Cyaninmarker *Cy5* unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur verankert. Auf Entfernen des Reagenzüberschusses aus den Reaktionsansätzen konnte verzichtet werden, da unspezifische Bindung von *Cy5* an funktionalisierte Membranen nicht nachweisbar sind.[81]

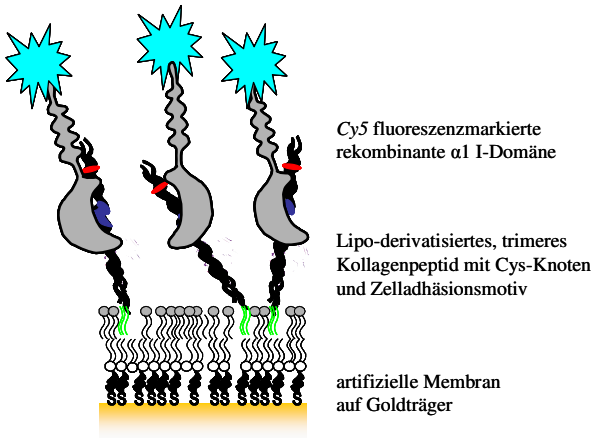


Abb. 26: Schematische Darstellung der zunächst geplanten experimentellen SPFS-Messung.

Allerdings zeigte sich im SPFS-Experiment, dass das Integrin nach Zugabe zur artifiziellen Membran, anders als im BIAcore Experiment (siehe 3.5.1), auch ohne inkorporiertes Kollagen, unspezifisch gebunden wird. Damit war dieser Versuchsaufbau (siehe Abb. 26) für aussagekräftige Messungen der Bindungsaffinitäten von Integrin an das Kollagenpeptid nicht eignet. Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein alternativer Versuchsaufbau geplant.
Dieser basiert auf einem Integrin-funktionalisierten artifiziellen, aber naturnäheren Membransystem, dem das synthetische Kollagenpeptid **T1** angeboten wird (Abb. 27).

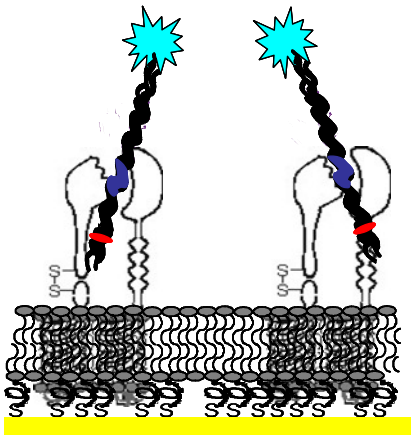


Abb. 27: Schematische Darstellung der durchgeführten experimentellen SPFS-Messungen. Auf einer goldbeschichteten Oberfläche wurde eine artifizielle Membran mit inkorporierten α1β1 Integrin aufgebaut und Bindungsassays mit *Cy5*-markierten Kollagenpeptid durchgeführt.

Auch in diesem Assay musste der Analyt mit einem Fluoreszenzmarker derivatisiert werden. Dazu wurde das Kollagentrimer **T1** mit dem Cyaninmarker, *Cy5*, als N-Hxydroxysuccinimid-Ester am N-Terminus derivatisiert.

Dieser Marker wird aufgrund seiner hohen Absorptions- und Fluoreszenzstärke ($\varepsilon = 250\,000\ M^{-1}cm^{-1}$ bei 649 nm) sowie sehr guten Wasserlöslichkeit und Bestrahlungsbeständigkeit in vielen biologischen Systemen eingesetzt.[195] Die Umsetzung des Kollagenpeptids zum **T1-*Cy5***–Derivat erfolgte sehr schnell. Eine chromatographische Abtrennung des Überschusses an Reagenz wurde nicht durchgeführt, da an den verwendeten Integrin-funktionalisierten artifiziellen Membranen keine meßbare unspezifische Bindung der *Cy5* Moleküle beobachtet wurde.[81] Dadurch konnten auch Verluste an *Cy5*-markiertem Peptid unterbunden werden. Die Reflexibilität des Bindungskomplexes wurde bei einer festgelegten Wellenlänge und unter geeignetem Einfallswinkel gemessen. Entsprechende Messreihen wurden vor und nach Zugabe des Analyten vorgenommen.

Vorhergehende grundlegende Arbeiten hatten die Vorteile von peptidunterstützten Membranmodellsystemen (tBLMs) mit eingebetteten Proteinen klar aufgezeigt. Zur Charakterisierung von Bindungen an natives Integrin α1β1 eignen sich solche peptidunterstützten artifiziellen Membranen, da sie die natürliche zelluläre Umgebung des Integrinrezeptors sehr gut nachahmen.[4,81,124,196,197] Durch die unterstützende Peptidschicht wird ein zusätzlicher

wässriger Zwischenraum zwischen der Gold- und unterhalb der Lipiddoppelschicht erzeugt. Dieser ermöglicht das Inkorporieren der peripheren cytosolischen Domänen des Integrinrezeptors und gewährleistet, dass die Integrinmoleküle in ihrer funktional aktiven Form insertiert werden können.

Die Möglichkeit zur Diffusion von Untereinheiten und laterale Beweglichkeit ist für viele Membranproteinrezeptoren entscheidend für die funktionellen Eigenschaften wie Bindungsaffinitäten und Signalübertragung.[198,199] Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass insertierte Proteine mit Bestandteilen der unterstützenden Peptidschicht interagieren können und dadurch die Beweglichkeit innerhalb der künstlichen Membran eingeschränkt wird.[7,200] Dementsprechend können Transmembranhelices eingebauter Membranproteine unbewegliche Hindernisse innerhalb der flüssigen Phospholipidmatrix ausbilden und die Fluidität der Phospholipide beeinflussen.[7]

Der Diffusionskoeffizient eines insertierten Membranproteins ist konzentrationsabhängig[201] und hängt ebenfalls von der Länge und Flexibilität der verwendeten Verankerungen ab.[202] Laterale Aggregationszustände, Phasenseparation und Diffusionsprozesse insertierter Integrin-Proteine sowie deren Verteilung waren im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen weder eindeutig zu charakterisieren noch durch experimentelle Parameter zu kontrollieren.[203] Das Diffusionsverhalten des in dieser Arbeit verwendeten α1β1-Integrins in der funktionalisierten artifiziellen Membran ist nicht bekannt. Eventuelle Unbeweglichkeiten der α1β1-Integrine in der artifiziellen Membran bleiben in den beschriebenen Bindungsstudien unberücksichtigt, da der Rezeptor bereits als Dimer inkorporiert wurde und die Interaktion der beiden Untereinheiten durch die Ligandenbindung verstärkt wird.[204] Die native Konformation der Integrine bleibt erhalten und ermöglicht es, das Bindungsverhalten von Integrinen unter weitgehend physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

Die korrekte Orientierung der Integrine zur Oberfläche ist von entscheidender Bedeutung für die anschließende Bindung der Substrate. Diese Orientierung der Makromoleküle in den Vesikeln und damit in den durch Spreiten resultierenden Membranschichten ist nur geringfügig beeinflussbar. Als entscheidender Parameter konnte die Vesikelgröße herausgestellt werden. Geringe Porendurchmesser von 50 nm bei der Vesikelextrusion führten zu einer nahezu homogen Membran mit wenigen Defekten in Form falsch orientierter Proteine.[205,206]

In der Praxis ist die funktionelle Inkorporation der Integrinrezeptoren in solche Vesikel deutlich erschwert. Ein Porendurchmesser von 100 nm vermindert allerdings die Scherkräfte während der Vesikelextrusion und induziert aus sterischen Gründen die Inkorporation korrekt orientierter Integrinmoleküle. Die nach der Vesikelspreitung resultierende Lipiddoppelschicht zeigte sich als geeignet für die weiteren Untersuchungen. Dabei zeigte sich, dass die Qualität der künstlichen Membran entscheidend für die Qualität der Bindungsmessungen ist.

Die jeweiligen Messungen wurden an einer unveränderten Messposition durchgeführt, um eine möglichst große Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten. Unterschiedliche Messpunkte auf demselben Membransystem können abweichende Mengen funktioneller Moleküle aufweisen und sind somit nur bedingt miteinander vergleichbar. Der Messbereich beträgt, begrenzt durch den Durchmesser des Laserstrahls, etwa 1 mm^2.

Eine Einzelmessung spiegelt die Bindungsaffinität zwischen eingebetteten Proteinen und den in Lösung befindlichen Molekülen aus einem einzelnen Bereich der artifiziellen Membran wider. Deswegen können auch Ergebnisse mit unterschiedlichen Lipiddoppelschichten nicht miteinander verglichen werden.

3.6.3 Aufbau von peptidunterstützten α1β1-Integrin funktionalisierten artifiziellen Membranen

Gereinigte LaSFN9-Glasträger wurden in einer Aufdampfanlage mit einer Goldschicht definierter Dicke bedampft. Die als Basis des folgenden Membranaufbaus dienende unterstützende Peptidmonoschicht bestand aus einem Lamininpeptidfragment, einem 19 Aminosäure langem Teilstück der α-Laminin-Untereinheit, das über freie Thiolgruppen N-terminaler Cysteine an die Goldoberfläche chemisorbiert wurde (in den Abbildungen als „S“ symbolisiert). Ungebundene Lamininpeptide wurden mit Wasser abgespült.

Die in der vorliegenden Untersuchung vermessenen ersten Schichtdicken des Aufbaus wichen mit einem Durchschnittswert von 1 nm deutlich von den theoretisch berechneten Dicken von 2,8 nm ab.[81] In dem gezeigten Membranaufbau in Abb. 29 betrug diese Schicht z.B. 0,8 nm.

Diese Abweichungen ließen sich durch eine locker gepackte Lamininpeptid- Schicht erklären, welche die metallische Goldoberfläche bedeckte. Eine lockere Packung war aber eine Grund-

voraussetzung für den folgenden Einbau der cytosolischen Domäne des Integrins. C-terminale Arginin-Reste des Laminidpeptids wurden durch N-Ethyl-N-dimethylaminopropylcarbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (HOSu) aktiviert, um im Folgenden die Lipidmonoschicht aus Dimyristoyl-phosphatidyl-ethanolamin (DMPE) kovalent über Amidbindungen zu kuppeln. Diese DMPE-Schicht war mit einer durchschnittlichen Dicke von 2,5 nm in Übereinstimmung mit theoretischen Berechnungen.[81]

Als hydrophobe Monolipidschicht ermöglichte diese Architektur eine anschließende Spreitung von Lipidvesikeln. Ungekuppelte DMPE-Moleküle mussten vor der Vesikelspreitung durch gründliches Spülen entfernt werden, um später eine möglichst homogene Lipiddoppelschicht zu erhalten. Unebenheiten könnten bei der Vesikelspreitung an die hydrophoben Alkylketten der Peptid-DMPE-Schicht zu Defekten und Inhomogenität der Lipiddoppelschicht führen. Durch die abschließende Spreitung der Vesikel wurde die Doppellipidschicht gebildet und damit der Aufbau der artifiziellen Membran abgeschlossen.

Die künstliche Membran konnte durch Inkorporation von Peptiden und Proteinen funktionalisiert werden.[128] Dazu wurden die gewünschten Peptide oder Proteinen bereits in die Lipidvesikel rekonstituiert, indem eine Emulsion aus Phosphatidylcholin (PC), Puffer und dem gewünschten Peptid oder Protein durch einen Polycarbonatfilter mit definierten Porendurchmesser extrudiert wurde. Dieser Vorgang erzeugte eine Größenverteilung der unilamellaren Vesikel, die im Rahmen der Messgenauigkeit mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS, *dynamic light scattering*) überprüft werden konnte (siehe Abb. 28).[207]

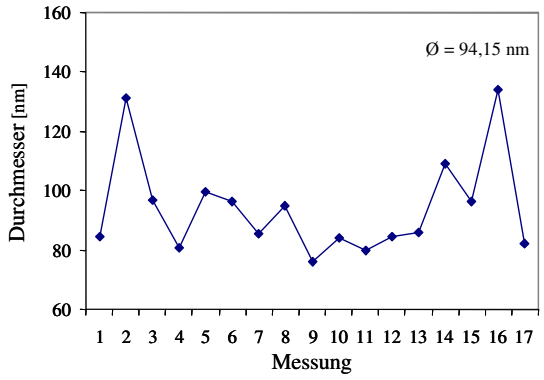


Abb. 28: DLS-Messung von PC-Vesikeln in PBS-Puffer, extrudiert mit 100 nm Membranporengröße.

Die Vesikelspreitung erfolgte bei Raumtemperatur unmittelbar nach dem Extrusionsprozess auf die Thiopeptid-Lipidmonoschicht. Die unilamellaren Vesikel interagierten mit hydrophoben Acylresten der DMPE-Schicht und bildeten spontan Lipiddoppelschichten aus. Nach etwa 35 min wurde ein Gleichgewichtszustand erreicht. Die artifizielle Membran wurde mit Puffer gespült, um ungebundene und unspezifisch gebundene Vesikel zu entfernen. Dabei wurde keine Veränderung der Schichtdicke beobachtet, was auf ein stabiles Membranmodellsystem ohne unspezifisch adsorbierte Vesikel deutete.

Die Integrin-Vesikel-Spreitung konnte als sofortiger Anstieg der Schichtdicke von durchschnittlich 5 nm ermittelt werden. Eine unspezifische Adsorption von ungespreiteten Vesikel würde langsamer erfolgen und zu einer höheren Schichtdicke führen, da sich unspezifisch adsorbierte Vesikel mit ihrer gesamten Masse an die Thiopeptid-Lipidmonoschicht anlagern statt auf dieser sich auszuspreiten. In vorangehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass in artifizielle Membranen eingebettete Integrine ihre Funktion erhalten.[81]

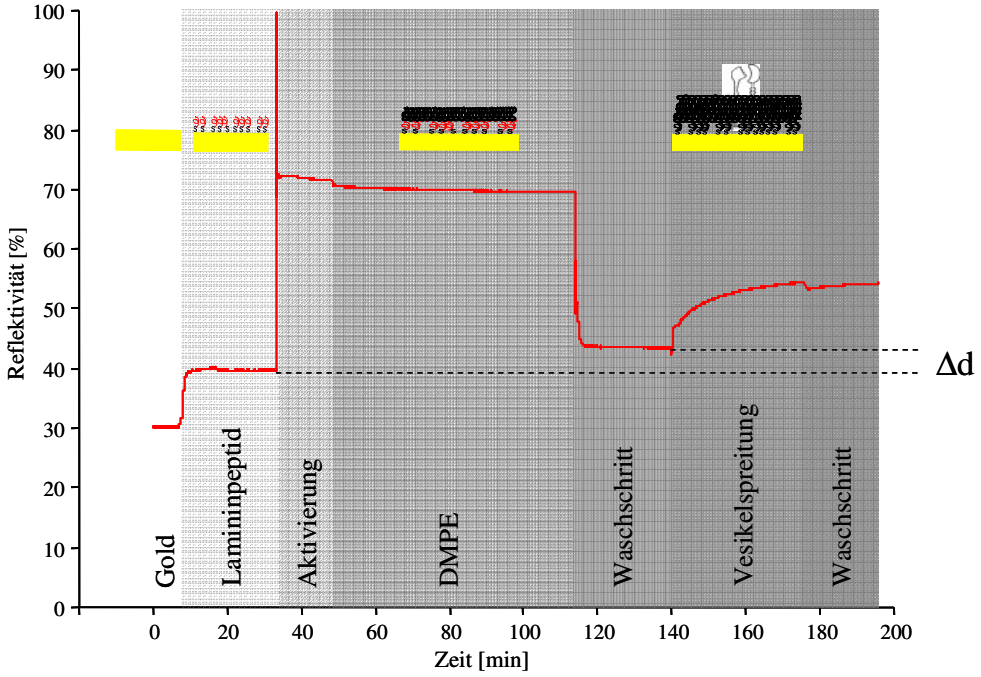


Abb. 29: Zeitliche Abfolge des artifiziellen Membranaufbaus in einer plasmonenspektroskopischen Kinetikmessung. Die Intensität des reflektierten Lichts wird über Beobachtungszeit bei fixiertem Anregungswinkel aufgezeichnet. $t_0 = 0$, Zugabe in H_2O gelöstes Lamininpeptid P19; $t_1 = 35$ min, Aktivierung mit EDC/HOSu, Zunahme der Reflektivität durch veränderten Brechungsindex; $t_2 = 45$ min, Kupplung von DMPE an Lamininpeptid, Abnahme der Reflektivität aufgrund des niedrigeren Brechungsindex von DMPE; $t_3 = 115$ min, Waschschritt, um nicht gekuppelte DMPE-Moleküle zu entfernen; $t_4 = 140$ min, Vesikelspreitung, Zunahme der Schichtdicke; $t_5 = 175$ min, Waschschritt.

Für die Herstellung der Vesikeln wurde ein Verhältnis von Integrin zu Phosphatidylcholin von etwa 1:5000 eingesetzt. Diese Größe liefert die Grundlage zur Abschätzung der Flächenbelegung der planaren Membran mit Integrin-Molekülen. Werden die Vesikel vollständig gespreitet, kann von etwa $6{,}6 \cdot 10^3$ Integrin-Molekülen pro Quadratzentimeter ausgegangen werden. Diese Berechnung diente jedoch lediglich als Schätzwert. Nach Schmidt[4] besitzt die Proteinkonzentration in den verwendeten Vesikel nur einen eingeschränkten Einfluss auf die Proteinkonzentration in der planaren Membran. Dies wurde in dieser Arbeit durch sterische Hinderungen der Proteinmoleküle erklärt.

Quantitativ exakte thermodynamische Bindungsmessungen an funktionalisierten Membranen sind abhängig von der Anzahl und Orientierung funktionaler Bindungspartner, die sich auf der vermessenen Fläche befinden.

3.6.4 Messungen an artifiziellen Membranen

Als Grundlage von Bindungsstudien wurde zunächst der Fluoreszenzhintergrund des artifiziellen Membransystems mittels SPFS Messungen bestimmt. Anschließende Bindungsexperimente erfolgten nach Zugabe des *Cy5*-markierten Kollagenpeptids, **T1-*Cy5***. Die spontane Bindung der Liganden an das immobilisierte Integrin erfolgte unter Lichtausschluss bei RT während einer Inkubationszeit von 100 min. Unspezifisch gebundene und ungebundene Liganden wurden vor der Bestimmung der spezifisch gebundenen Ligandenmenge durch Waschen entfernt. Nach der Messung konnte gebundenes Kollagentrimer durch Spülen mit EDTA abgelöst werden, da die zweiwertigen, chelatierten Kationen Mn^{2+} und Mg^{2+} für die Bindung von Integrin essentiell sind.[9]

Die hohe Stabilität der proteinogenen Metallzentren der bindungsfähigen Integrin-Konformationen[204] bedingen intensive EDTA Inkubation zur Ablösung der Liganden.

In diesen Experimenten wurde deutlich, dass mehrmals für Bindungs- und Ablösevorgänge verwendete funktionalisierte Membrane einen höheren Fluoreszenzhintergrund zeigen als direkt nach ihrem Aufbau (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen möglicherweise auf ein nicht vollständiges Ablösen von markierten Liganden/Analyten von der Membran hin. Die Membran bleibt bei den Spülschritten erhalten und unbeschädigt, wie Kontrollaufnahmen zeigen. Somit konnten Bindungsmessungen an derselben Membran reproduziert werden.

Zwischen den Bindungsexperimenten wurde die Messzelle abgedeckt, um eine Schädigung und ein Ausbleichen des Fluorophors durch die Belichtung mit dem Laserstrahl zu verhindern. Die Belichtung der integrinfunktionalisierten Membran bleibt nach dem Aufbau durch die Verwendung eines Shutters auf wenige Sekunden beschränkt.

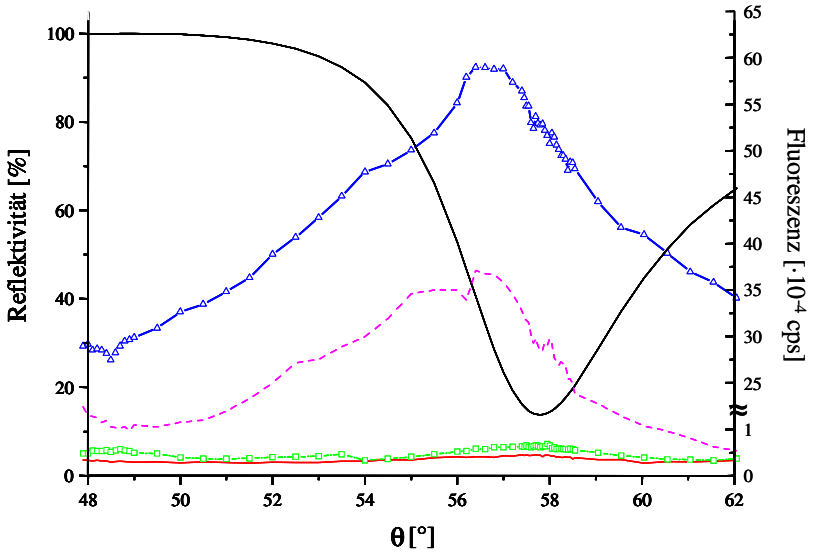


Abb. 30: SPFS Bindungsmessungen der *Cy5*-fluoreszenzmarkierten Kollagenpeptide an α1β1-Integrin funktionalisierte Membranschicht. Reflektionsspektrum (—), Fluoreszenzhintergrund (—); **T1-*Cy5*** (Δ-Δ-Δ), Fluoreszenzhintergrund nach Ablösen des **T1-*Cy5*** von der Membran mit EDTA (□-□-□); **EK2-*Cy5*** (- - -).

Um die Spezifität der Bindung des tripelhelikalen Trimers **T1** nachzuweisen, wurden auch Experimente mit der nicht Disulfid-vernetzten Einzelkette **EK2** mit identischer Aminosäuren-Sequenz wie das Trimer vorgenommen. Dieses Peptid wurde analog dem Trimer mit dem *Cy5*-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Diese Kontrollexperimente wurden zur besseren Vergleichbarkeit nach Ablösen des gebundenen **T1-*Cy5***-Kollagentrimers an derselben Integrin-funktionalisierten Membran durchgeführt. Der Ablauf des Kontrollversuchs mit der fluoreszenzmarkierten Kollageneinzelkette ist analog den oben beschrieben Bindungsexperimenten. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abb. 30 dargestellt. Die gemessene Fluoreszenz nach dem Spülschritt lag geringfügig über dem Fluoreszenzhintergrund der funktionalisierten Membran. Eine spezifische Bindung der Peptid-Einzelkette **EK2** an das Integrin konnte ebenfalls bestätigt werden, da nach Waschen mit EDTA durch erneute Zugabe der Einzelkette das Experiment reproduziert werden konnte.

3.6.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Bindung des Kollagentrimers **T1-*Cy5*** mit dem Adhäsionsmotiv Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg an α1β1 -Integrin erfolgt durch Interaktion der Untereinheiten des Integrins an der so genannten Metallionen-abhängigen Adhäsionsstelle (MIDAS). Die räumliche Orientierung des Motivs ist dabei essentiell und durch die tripelhelikale Struktur vorgegeben. Das Kollagentrimer **T1-*Cy5*** sollte trotz N-terminaler Modifizierung bei RT tripelhelikal gefaltet sein und eine Bindung dieses Peptids an das Integrin konnte durch eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz im entsprechenden Resonanzwinkel eindeutig nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht dem BIAcore Experimenten (siehe Kapitel 3.5). Unter der Annahme, dass aus sterischen Gründen am Trimer **T1** nur eine Fluoreszenzgruppe eingebaut wurde, würde ein direkter Vergleich der gemessenen Fluoreszenzintensität bei der entsprechenden nicht tripelhelikal gefalteten Einzelkette eine deutlich verringerte Bindungsaffinität nachweisen. Die Einzelkette **EK2** besitzt einen Schmelzpunkt von 17 °C, deutlich tiefer als RT. Trotzdem könnte im Konformationsgleichgewicht genügend gefaltetes selbstassoziiertes Trimer vorliegen, um den Fluoreszenzanstieg zu erklären. Allerdings erfolgt dieses Experiment bei sehr niedrigen Konzentrationen, die ebenfalls zur Auflösung des assoziierten Trimers beitragen. Eine deutlich verringerte Affinität des nicht gefalteten Kollagenpeptids im Vergleich zum tripelhelikalen Trimer scheint vorzuliegen. Dies scheinen auch die NMR Konformationsanalysen zu bestätigen, da das Adhäsionsmotiv selbst im gefalteten Trimer nicht typisch tripelhelikal vorliegt.

3.7 Grundlagen-Experimente für Bindungstudien an lebenden Zellen mit synthetischen Kollagenpeptiden

3.7.1 Planung der Experimente

Eine weitere experimentelle Annäherung an natürliche biologische Umgebungen war von Experimenten mit lebenden Zellen zu erwarten. Dazu sollten Bindungen auf der Oberfläche der *P19*-Zellen mit exprimierten α1β1- und α2β1-Integrinen an ein Kollagentrimer untersucht werden, das in die artifizielle Membran insertiert ist (Abb. 31).

Um eine praktisch irreversible Anhaftung von Peptiden oder Proteinen auf der Membranoberfläche zu garantieren, müssen bekannterweise diese mit zwei benachbarten lipophilen Resten versehen werden. Deshalb wurde die Synthese des Kollagentrimers **T2** betrieben, die aber insofern nicht zur vollen Zufriedenheit gelang, da es nicht als einheitliches Material gewonnen werden konnte. Die spektroskopischen Untersuchungen lieferten trotzdem genügend Beweise für das Vorliegen einer tripelhelikalen Struktur. Deshalb sollte für dieses Experiment wenigstens in Form von Vorversuchen dieses nicht homogene **T2** Lipoderivatisierte Trimer eingesetzt werden. Nach erfolgtem Membranaufbau sollte eine definierte Zellanzahl zu dieser funktionalisierten Lipiddoppelschicht zugegeben und die folgende spontane Adhäsion der Zellen auf der kollagenbeschichteten Lipidmembran nach bestimmten Zeitintervallen überprüft und ausgewertet werden.

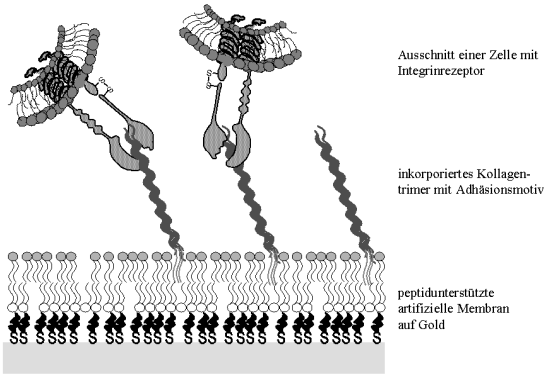


Abb. 31: Schematische Darstellung der artifiziellen Membran mit inkorporiertem Kollagenmodellpeptid T2 und adhärenten Zellen (im Ausschnitt).

Als Weiterentwicklung dieses Ansatzes war der Aufbau strukturierter funktionalisierter peptidgebundene Membrane anvisiert, um eine resultierende strukturierte Zelladhäsion zu induzieren. Zu diesem Zweck wurden Stempel aus Zweikomponentensilikon von Schablonen mit verschiedenen Formen, beispielsweise unterschiedlich breite Linien und Rechtecke, hergestellt (Abb. 32 A-C). Das jeweilige Muster wurde mit der peptidunterstützenden Lamininschicht manuell auf das Gold übertragen (Abb. 32 D).
Mit Hilfe einer reinen Lamininpeptidschicht konnte überprüft werden, welches Muster von der verwendeten Zelllinie bevorzugt wird. Mit diesen Experimenten wurde weiterhin deutlich,

ob *P19*-Zellen auf unmodifizierten Lipidschichten wachsen. Anschließend sollte mit dem bestimmten Muster eine kollagenfunktionalisierte und strukturierte Membran aufgebaut werden und die Adhäsion der Zellen überprüft und ausgewertet werden.

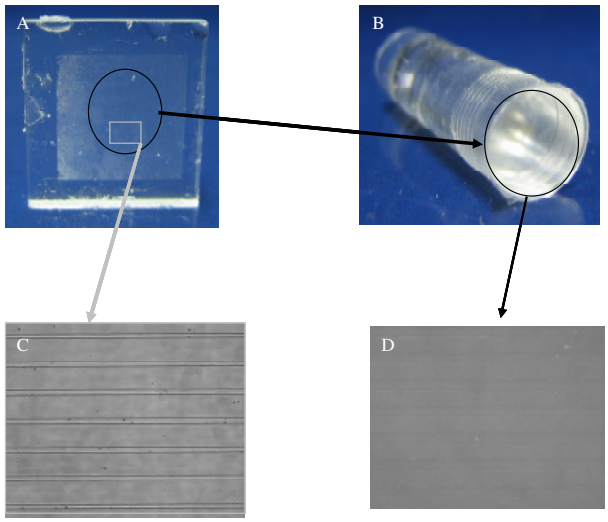


Abb. 32: Zweikomponentensilikon-Stempel für Mikrostrukturierung und ausgewählte Muster. A: Matrize für Stempel; B: Zweikomponentensilikon-Stempel; C: Matrize in Vergrößerung; D: Stempelabdruck des Laminins auf Gold.

3.7.2 Oberflächen - Adhäsionsexperimente mit P19 Zellen an artifizielle Membrane

Bei der ausgewählten Zelllinie *P19* handelt es sich um eine Teratokarzinom-Zelllinie, die ursprünglich aus embryonalen Stammzellen, implantiert in murines Hodengewebe, generiert wurde.[208]

3.7.2.1 P19-Zellen auf unmodifizierten Lipidoberflächen

Zunächst wurde sichergestellt, dass *P19*-Zellen nicht auf unmodifizierten Lipidoberflächen wachsen. Die vollzogene Adhäsion und damit Vitalität dieser kultivierten Zelllinie ist optisch durch ihre lang gestreckte Form erkennbar, die auf Adhäsion und Proliferation der Zellen hinweist.

Eine unmodifizierte artifizielle Lipidmembran wurde auf einem Goldträger in einer Petrischale (siehe Abb. 34 A) analog Abschnitt 3.6.3 aufgebaut. Die Substanzen wurden tropfenweise mit einer Pipette aufgebracht und vorsichtig abgenommen. Nach vollständigem Membranaufbau wurden $1*10^6$/mL Zellen im Kulturmedium ohne Seren zugegeben, da

dadurch ein Verfälschen der Ergebnisse durch adhäsionsaktive Substanzen im Serum ausgeschlossen wird (siehe Abb. 34 B).

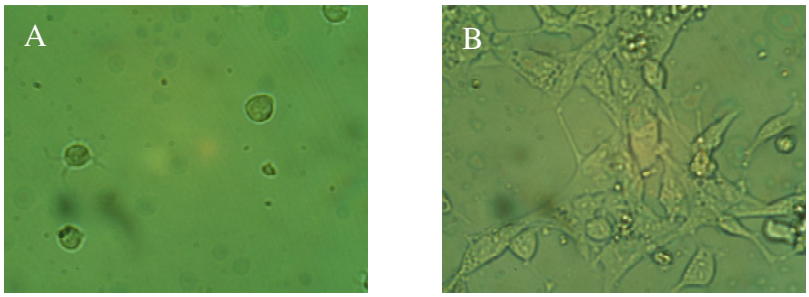


Abb. 33: Kultivierung von *P19* Zellen in Kulturmedium. A: eine runde Geometrie der Zellen deutet auf nicht-adhärent wachsende Zellen hin; B: adhärent wachsende Zellen bilden langezogene Netzwerke aus.

Zur Positivkontrolle wurde eine identische Anzahl analog präparierter Zellen in einer beschichteten Petrischale in dem Inkubator ebenfalls den gleichen Bedingungen ausgesetzt. Nach 1 h, 3 h und 25 h wurden beide Petrischalen unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Es zeigt sich (Abb. 34 C), dass *P19*-Zellen nicht auf unmodifizierten Lipidoberflächen, jedoch auf reinen Goldoberflächen und beschichteten Petrischalen kultiviert werden können.

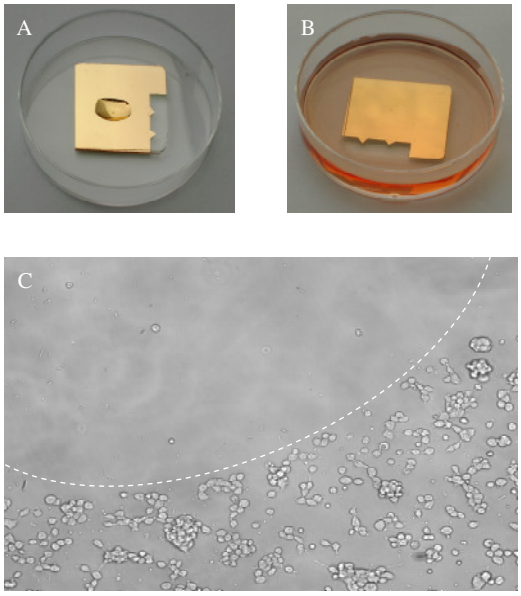


Abb. 34: A: Membranaufbau auf Goldträger mit Pipetten-Tropfen-Technik; B: Goldträger in beschichteter Petrischale mit Kulturmedium; C: obere Hälfte: Zellen auf unmodifizierter Lipidschicht adhärieren nicht, untere Hälfte: Positivkontrolle (reine Goldschicht) adhärente Zellen.

Es wurde beschrieben, dass Beschichtungen mit Laminin und Fibronektin in Zellkulturen unterschiedliche Proteinzusammensetzungen der extrazellulären Matrix induzieren[209,210] und somit die Strukturen der kultivierten Zellen beeinflussen.[211] Ebenso kann die Adhäsionsfähigkeit der Zellen durch Beschichtung der Goldoberfläche mit einem Protein der extrazellulären Matrix, beispielsweise Laminin, erheblich gesteigert werden.[209,212]

3.7.2.2 Kultivierung von P19-Zellen auf strukturierter Oberfläche

Die in Abschnitt 3.7.2.1 erfolgreich verlaufenen selektiven Kultivierungen der *P19*-Zellen auf Lamininpeptiden ergaben die Grundvoraussetzung für Experimente auf gestempelten Oberflächen-Mikrostrukturen.

Härteres Zweikomponentensilikon des Typs *Sylgard 186* erwies sich als besonders geeignet in einer nicht weiter ausgeführten Versuchsreihe zur Herstellung der benötigten Stempel für genaue Oberflächen-Strukturierungen.

Zunächst wurden die verschiedenen Stempel mit einer wässrigen Laminin-Lösung benetzt. Folgende Lufttrocknung der Stempel verhinderte ein späteres Verschmieren der Geometrie bei der Auftragung auf die Oberflächen. Nach der Stempelung der Goldoberfläche wurde zu der Präparation eine bekannte Anzahl von Zellen zugegeben und in dem Inkubator definierten Bedingungen ausgesetzt. Nach 4 h wurden die Kulturen auf den gestempelten Goldträgern unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Durch entsprechende Oberflächenstrukturen induziertes linienförmiges Adhärieren der Zellen (Abb. 35) zeigte sich als leichter zu detektieren als andere Geometrien. Deshalb wurde die linienförmige Mikrostrukturierung verwendet.

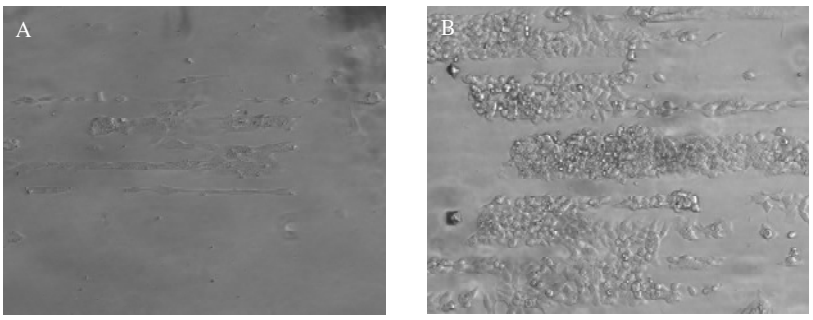


Abb. 35: Adhäsion der *P19*-Zellen auf linearer mikrostrukturierten Oberflächen. A: kultiviert für 4 h; B: über Nacht kultiviert.

3.7.2.3 P19 Zellen auf kollagenfunktionalisierten Oberflächen

Anschließend wurde das Experiment mit einer kollagenfunktionalisierten (nicht mikrostrukturierten) Membran und einer Positivkontrolle in Form einer Adhäsion auf einer beschichteten Petrischale wiederholt. Hierzu wurden kollagenfunktionalisierte Lipidvesikel entsprechend Abschnitt 3.6.3 gespreitet. Der Membranaufbau war analog dem oben beschriebenen (Abschnitt 3.7.2.1).

Im Gegensatz zur unmodifizierten Lipidmembran konnten auf der kollagenbeschichteten Membran adhärente Zellen im Lichtmikroskop detektiert werden. Allerdings war deren Anzahl deutlich niedriger als die Anzahl adhärenter Zellen auf den reinen Gold- oder den lamininbeschichteten Oberflächen.

Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die verwendeten *P19*-Zellen tatsächlich α1β1- und α2β1-Integrine besitzen und das Kollagenadhäsionsmotiv erkennen.

3.7.2.4 Nachweis von α1β1- und α2β1-Integrinen auf der P19-Zelloberfläche durch Fluoreszenzmikroskopie

Mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop, das mit geeigneten Filtern bestückt war, wurde überprüft, ob *P19* Zellen das *Cy3*-markierte Kollagentrimer **T1** erkennen. Das Trimer-Derivat wurde, wie in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen, hergestellt. Die in einer Messreihe optimierte Anzahl von Zellen wurde über Nacht in einer Kulturflasche ausgesät. Nach dem vollständigen Entfernen des Mediums wurde das markierte Trimer in filtriertem PBS-Puffer mit Ca^{2+}, Mg^{2+} und Mn^{2+} zugegeben. Nach 0,5 h unter konstanten, definierten Bedingungen im Inkubator wurde das ungebundene Kollagen durch Waschen mit dem oben genannten PBS-Puffer vollständig entfernt und die Proben wurden anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops charakterisiert.

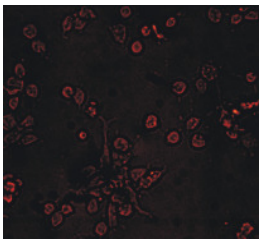


Abb. 36: Positive Fluoreszenz bestätigt Bindung von fluoreszenzmarkiertem Kollagenpeptid **T1-*Cy3*** und *P19* Zellen.

Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Reagenz alleine unter gleichen Bedingungen inkubiert und gewaschen. Während das Kontrollexperiment keine Anfärbung der Zellen zeigte, bestätigte die ermittelte Fluoreszenz im Falle des Kollagenpeptids, dass die *P19*-Zellen α1β1- und/oder α2β1-Integrine besitzen und das verwendete, markierte Kollagen mit dem Adhäsionsmotiv Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg Hexapeptid erkennen und binden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Zelladhäsion wird durch definierte Erkennungsepitope der extrazellulären Matrixproteine vermittelt. Diese werden durch Plasmamembranproteine erkannt und gebunden. Unter den Zelladhäsionsrezeptoren dominieren die Integrine, eine sehr diverse und prominente Familie von Membranproteinene.
Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Entwicklung eines Modellsystems, das eine detaillierte Untersuchung von Zell-Oberflächen-Interaktionensprozessen ermöglicht.

Dafür wurden verschiedene Kollagenpeptide entwickelt und synthetisiert, die das bekannte Adhäsionsmotiv für α1β1 Integrin, d. h. die Hexapeptidsequenz Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg, enthalten und N- und C-terminal mit den klassischen Kollagentripletts (Gly-Pro-Hyp) verlängert wurden, um eine tripelhelikale Struktur zu induzieren und zu stabilisieren. Zudem wurden diese Peptide C-terminal mit dem Cystinknoten des Kollagens Typ III versehen, um zusätzlich die Faltung thermisch zu stabilisieren und vor allem, um die konzentrationsabhängige tripelhelikale Faltung nicht vernetzter Kollagenpeptide zu vermeiden. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung für aussagekräftige biochemische und biologische Experimente, die bekannterweise nicht in den ansonsten benötigten millimolaren Konzentrationsbereichen ablaufen. Die Kollagenpeptide wurden in ihrer tripelhelikalen Struktur und thermischen Stabilität mittels CD und NMR charakterisiert. Dabei ergaben die NMR-Experimente mit erstmals ^{15}N-markierten Glycin-Peptiden den überraschenden Befund, dass das Adhäsionsmotiv selbst nicht tripelhelikal gefaltet ist, aber durch die tripelhelikale Faltung des Gesamtmoleküls in einer doch sehr starren Umgebung fixiert wird. Trotz dieser Strukturplastizität im Adhäsionsbereich bindet das trimere Kollagenpeptid mit einer mikromolaren Affinität die exprimierte, voll gefaltete α1 I-Domäne des α1β1-Integrins. Diese Bindungsaffinitäten wurden mittels der nichtinvasiven Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ermittelt.
Um biomimetische Systeme für eine Analyse der Kollagen/Integrin Wechselwirkungen zu entwickeln, wurden Cysteinpeptid-unterstützte Lipidmembrane (tBLMs) auf Goldoberflächen aufgebaut, die eine Einbettung von Proteinen unter Erhaltung ihrer Funktionalität in eine naturnahe hydrophobe Umgebung ermöglichen. In diese Modellmembrane wurde das α1β1-Integrine eingebettet und die bimolekulare Erkennung und Bindung des Fluoreszenz-

markierten trimeren Kollagenpeptids mittels Oberflächenplasmonenfluoreszenzspektroskopie untersucht. Mit diesen Experimenten konnte nicht eindeutig die Frage geklärt werden, ob für eine Bindung von Kollagenpeptiden an das Integrin eine tripelhelikale Faltung essentiell ist.

Als weitere Annäherung des Modellsystems an reale biologische Umgebungen erfolgten erste Bindungsexperimente zwischen *P19* Zellen an ein Membran-immobilisiertes Lipo-derivatisiertes trimeres Kollagenpeptid. Obwohl dieses hydrophobe Kollagenpeptid nicht in der gewünschten homogenen Form synthetisch gewonnen werden konnte, scheinen die kontaminierenden Nebenprodukte eine tripelhelikale Faltung nicht negativ zu beeinflussen. Deshalb wurde dieses Lipopeptid in Vesikeln eingebaut und durch deren Spreitung auf der Membran in das Modellsystem eingebettet. Nachdem festgestellt werden konnte, dass auf unmodifizierten Lipidschichten keine Zelladhäsionen erfolgte, zeigten die Experimente mit der funktionalisierten Membran eindeutig die Notwendigkeit eingebauter Adhäsionsepitope für die Anhaftung und somit für das Wachstum von *P19* Zellen. Die Präsenz von α1β1- und/oder α2β1-Integrinen auf der Plasmamembran dieser Zellen konnte nach Inkubation mit einem Fluoreszenz-markierten Kollagenpeptidtrimer bestätigt werden.

Für eine Ausdehnung dieser Experimente auf gestempelte Kollagen-funktionalisierte Membrane ist die Suche nach Zelllinien mit einer stärkeren Expression von α1β1- und/oder α2β1-Integrine notwendig. Hier könnten *RuGli* Zellen in Frage kommen, die bekannterweise einen besonders hohen Anteil an α1β1-Integrinen besitzen.[213] Dadurch könnte in Detail untersucht werden, ob solche Lipo-derivatisierten trimeren Kollagenpeptide als viel-versprechende neuartige Biomaterialien dienen könnten. Dazu müsste auch die synthetische Zugänglichkeit dieser komplizierten Konstrukte für eine gesicherte Reproduzierbarkeit optimiert werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Lösemittel

Alle verwendeten Lösemittel wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen, D), *Fluka* (Buchs, CH), *Merck* (Darmstadt, D) und *Riedel-de Haën* (Seelze, D) in p.a. Qualität bezogen. NMP und DMF wurden darüber hinaus unter Ultrahochvakuumbedingungen destilliert, wobei bei der DMF – Destillation Ninhydrin zum Abfangen der entstehenden Amine zugesetzt wurde. Für die analytische sowie präparative HPLC wurde Acetonitril der Qualität *LiChrosolv* der Firma *Merck* (Darmstadt, D), sowie mittels eines *Super-Q*™ *Plus* Wasseraufbereitungssystems der Firma *Millipore* (Billerica, USA) deionisiertes Wasser (MQ-H_2O) verwendet. HBTU und EDC·HCl stammen von *Senn Chemicals* (Dielsdorf, CH) und das Fluorierungsmittel TFFH wurde von *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen, D) bezogen.

Die verwendeten Fmoc-Aminosäure-Derivate stammen von den Firmen *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz, D), *Alexis* (Grünberg, D) *Fluka* (Buchs, CH) und *Advanced ChemTech*™ (Kentucky, USA) und wurden in ihrer L-Konfiguration am C_α-Atom eingesetzt. Die in der Festphasensynthese verwendeten Harze wurden von *NovaBiochem* (Läufingen, CH) bezogen.

Zur Hydrogenolyse wurde der Katalysator E10 E/W 10 % Pd auf Aktivkohle der Firma *Degussa* (Hanau, D) verwendet. Die *t*-Butylierung wurde mit iso-Buten der Firma *Linde Gase* (Höllriegelskreuth, D) durchgeführt.

Die Fluoreszenzmarker Cy3™ und Cy5™ stammen von *Amersham Pharmacia* (Uppsala, SE). Das aufgereinigte humane α1β1 Integrin (VLA-1) wurde von *Chemicon International* (Temecula, CA, USA) bezogen.

Der pGEX-Vektor mit der α1-I-Domäne war ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Prof. J. Kapylä (Universität Jyväskyla, Jyväskyla, Finnland).[186]

Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen, D), *Fluka* (Buchs, CH) und *Merck* (Darmstadt, D) erworben. Im folgendem bezeichnet dH_2O das destillierte Wasser des Hausanschlusses, ddH_2O mit einer *Fistreem* Anlage (Leicester, UK) bidestilliertes Wasser und MQ-H_2O mit einem *Super-Q*™ *Plus* Wasseraufbereitungssystem gereinigtes Wasser.

Für sämtliche Pipetierarbeiten wurden sterile Einmalpipetten von *Corning* (Schiphol-Rijk, NL) und Pipettierhilfen von *Gilson* (Bad Camberg, D) mit den entsprechenden Standardpipettenspitzen verwendet. Die sterilen Gefäße für die Zellkultur stammten von *Corning* (Schiphol-Rijk, NL), *Gibco* (Karlruhe, D) und *Falcon* (BD Bioscience, Heidelberg, D).

5.1.2 Bezugquellen

Abimed	Langenfeld, D
Advanched ChemTech	Kentucky, USA
Agfa	Köln, D
Agilent	Palo Alto, USA
Alexis	Grünberg, D
Amersham Bioscience	Freiburg, D
Anton Paar	Graz, A
Applied Biosystems	Foster City, USA
Avestin	Ottawa, CAN
BBC Goertz Metrawatt	Nürnberg, D
BD Bioscience (Falcon)	Heidelberg, D
Beckman	Palo Alto, USA
Berliner Glas	Berlin, D
Biacore	Freiburg, D
BioRad Laboratories	München, D
Biotronik	Maintal, D
Branson	Carouge-Geneve, CH
Bruker Daltonics	Bremen, D
	Ettlingen, D
Chemicon International	Temecula, USA
Christ	Osterode, D
Compix Inc.	Cranberry Township PA, USA
Corning	Schiphol-Rijk, NL
Degussa	Hanau, D
Dürr Technik	Bietigheim, D
Elmi	Riga, LV
Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
Epson	Meerbusch, D
Fistreem International	Leicester, UK
Fluka	Buchs, CH
Gibco	Karlsruhe, D
Gilson	Bad Camberg, D
Hellma	Müllheim, D
Hamamatsu, Perkin Elmer	Wiesbaden, D
Heinemann	Schwäbisch Gmünd, D
Heraeus	Hanau, D
Hettich-Zentrifugen	Tuttlingen, D
Huber Diffraktionstechnik GmbH&Co KG	Rimsting, D

IDS Uniphase Corp.	San Jose, USA
IKA	Staufen, D
Invitrogen	Karlsruhe, D
Iris Biotech GmbH	Marktredwitz, D
Ismatec SA	Wertheim-Mondfeld
Jasco	Groß-Umstadt, D
Labor-Brand	Gießen, D
Leica	Wetzlar, D
Linde Gase	Höllriegelskreuth, D
LKB	Bromma, SE
Macherey&Nagel	Düren, D
Menzler Gläser	Braunschweig, D
Merck	Darmstadt, D
MicroCal	Northampton, USA
Millipore	Biollerica, USA
	Neu Ulm, D
NovaBiochem	Läufingen, CH
PAA	Pasching, A
PepChem	Reutlingen, D
PE Sciex	Ontario, CAN
Perkin Elmer	Überlingen, D
Pfeiffer	Wessel, D
Plano GmbH	Wetzlar, D
Pharmacia Biotech	Freiburg, D
Precision Detectors, Inc.	Bellingham, USA
ResTec	Framersheim, D
Riedel-de Haën	Seelze, D
	Schwalbach, D
Roth GmbH	Karlsruhe, D
Sasco Semiconductor	Putzbrunn, D
Senn Chemicals	Dielsdorf, CH
Serva	Heidelberg, D
Shimadzu	Tokio, J
Sigma-Aldich	Deisenhofen, D
	Taufkirchen, D
Tork SCA Hygiene Products GmbH	Mannheim, D
Torrey Pines Scientific inc	San Marcos, USA
Umicore Materials	Balzers, FL
Waters	Eschborn, D

5.2 Allgemeine Methoden

5.2.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 Fertig-Glasplatten der Firma *Merck* (Darmstadt, D) je nach Anwendung ohne oder mit F_{254} Fluoreszenzindikator verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels UV-Absorption bei 254 nm.
Verbindungen mit einer Aminogruppe wurden durch Chlor/o-Tolidin-Färbung (Cl/T-Färbung) detektiert. Hierzu wurde die Dünnschichtplatte für 5 min einer Chlorgas-Atmosphäre ausgesetzt, mit Pressluft von überschüssigem Chlorgas befreit und mit einer Lösung von 1,5 g o-Tolidin in 60 mL Eisessig und 4,2 g KI in 940 mL MQ-H_2O besprüht. Es zeigen sich blauviolette oder gelbe Verfärbungen. In allen anderen Fällen wurde mit $KMnO_4$ oxidiert. Freie Thiole wurden mit Ellmann's Reagenz [214] angefärbt.

o-Tolidin Lösung:	1,5 g o-Tolidin in 60 mL Eisessig 4,2 g KI in 940 mL MQ-H_2O	
$KMnO_4$	2 % in H_2O	
Ellmann's Reagenz:	Lösung I:	0,1 M $NaHCO_3$
	Lösung II:	0,1 % 5,5'-Dithionitrobenzoesäure in EtOH

5.2.2 Gefriertrocknung

Es wurde eine Gefriertrocknungsanlage Modell *Alpha 2-4* der Firma *Christ* (Osterode, D) benutzt. Als Lösemittel wurden MQ-H_2O, 1 % HOAc in MQ-H_2O oder *t*-BuOH/MQ-H_2O (4:1 v/v) verwendet, die Trocknung erfolgte über Nacht bei 0,05 mbar und -45 °C.

5.2.3 Präparative Säulenchromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh ASTM) der Firma *Merck* (Darmstadt, D) verwendet. Das verwendete Laufmittelsystem der Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH Aufreinigung war $CHCl_3$/MeOH/CH_3COOH (82,5:12,5:0,5) mit einem $R_f = 0,70$.

5.2.4 Analytische HPLC

Die analytische HPLC-Trennung wurde mit einer Anlage der Firma *Waters* (Eschborn, D), bestehend aus zwei HPLC-Pumpen, Modell *515*, einem Autosampler *717$_{plus}$*, einem Datamodul und einem Photodioden Array Detektor *PDA 996* durchgeführt. Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde die Software *Millenium32* (Version *3.20*) der Firma *Waters* (Eschborn, D) verwendet. Als Trennsäule kam eine XTerra™ MS C_{18} (5 µm/3,9x150 mm) RP-Säule der Firma *Waters* (Eschborn, D) zum Einsatz.

Bei diesem System wurde innerhalb einer Zeit von 17 min ein linearer Gradient von 5 % CH_3CN / 95 % H_3PO_4 (2 % in H_2O) nach 90 % CH_3CN / 10 % H_3PO_4 (2 % in H_2O) bei einer Flussrate von 1,5 mL/min durchlaufen und bei 210 nm aufgenommen. Die Retentionszeiten der Verbindungen sind bei den jeweiligen Syntheseprotokollen angegeben.

EK1 ist sehr hydrophop, daher wurde der lineare Gradient abgeändert in 65,5 % CH_3CN / 34,5 % H_3PO_4 (2 % in H_2O) nach 90 % CH_3CN / 10 % H_3PO_4 (2 % in H_2O) in 20 min bei einer Flussrate von 1,5 mL/min und bei 210 nm aufgenommen. Die Retentionzeit betrug 17,9 min.

5.2.5 Präparative HPLC

Die präparative HPLC-Trennungen wurden mit zwei verschiedenen Trennsäulen der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) durchgeführt:

Trennsäule 1: VP 250/21 *Nucleosil* 500-5 C_{18} PPN

Trennsäule 2: VP 250/21 *Nucleosil* 500-5 C_4

Als Eluenten wurden jeweils die Puffer A (0,1 % TFA in MQ-H_2O) und B (0,08 % TFA in CH_3CN) bei einer Flussraten von 10 mL/min verwendet. Je nach Hydrophilie wurde der Gradient den optimalen Bedingungen angepasst. Allgemein wurden Laufzeiten um die 60 min benutzt. Die für die Trennungen benutzten Gradienten und Laufzeiten sind bei den jeweiligen präparativen Systemen angegeben.

Die Trennungen wurden mit folgenden Systemen durchgeführt:

<u>Präparatives System A:</u> Es wurden zwei HPLC-Pumpen Modell *305* und ein *Dynamic* Mixer *811B*, sowie ein Fraktionssammler Model *201* der Firma *Abimed* (Langenfeld, D) benutzt. Als Detektor diente ein UV-Detektor Modell *SPD6-A* der Firma *Shimadzu* (Tokio, J),

zum Aufzeichnen der Chromatogramme wurde ein xt-Schreiber *SE 120* der Firma *BBC Goertz Metrawatt* (Nürnberg, D) verwendet. Benutzte Gradienten und Laufzeiten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Benutzte Gradienten und Laufzeiten mit der präparativen HPLC, System A

Peptid	Gradienten[+]	Laufzeiten	t_R[#]
EK1	20 % B → 90 % B	90 min	nicht bestimmt
EK2	20 % B → 50 % B	50 min	26 min; 30 min
EK3	30 % B → 60 % B	40 min	26 min; 34 min

+ Puffer A: 0,1 % TFA in H_2O; Puffer B: 0,08 % TFA in CH_3CN

je nach verwendeter Säule

Präparatives System B: Präparative HPLC-Anlage der Firma *Abimed* (Langenfeld, D), bestehend aus den Teilsystemen Pumpe *321*, Detektor UV-VIS *152*, Interface *506 C* und einem Fraktionssammler Model *202* der Firma *Gilson* (Middleton, USA). Zur Steuerung und Datenverarbeitung wurde die Software des Typs *UniPoint* (Version *3.11*) der Firma *Gilson* (Middleton, USA) eingesetzt. In Tabelle 8 sind die benutzten Gradienten und Laufzeiten angegeben.

Tabelle 8: Benutzte Gradienten und Laufzeiten mit der präparativen HPLC, System B.

Peptid	Gradienten[+]	Laufzeiten	t_R[#]
EK2	20 % B → 60 % B	60 min	27 min
EK2	25 % B → 47 % B	45 min	21,5 min
EK2*	25 % B → 47 % B	45 min	21,5 min
EK3	20 % B → 60 % B	60 min	40 min

+ Puffer A: 0,1 % TFA in H_2O; Puffer B: 0,08 % TFA in CH_3CN

je nach verwendeter Säule

* ^{15}N-Gly markiert

5.2.6 Mikrokalorimetrische Messungen

Die Temperaturabhängigkeit der partialen Wärmekapazitäten der unterschiedlichen Peptidlösungen wurde mittels eines VP-DSC Mikrokalorimeters, mit jeweils einer Mess- und Referenzzelle (ca. 0,5 mL) der Firma *MicroCal* (Northampton, USA) verfolgt. Dabei wurde die Messzelle erst nach dem ersten Zyklus (Heiz- und darauffolgender Kühlzyklus) mit Proteinlösung befüllt. Die entsprechenden Peptidlösungen waren in Konzentration und Zusammensetzung äquivalent mit den für die CD-Experimente angesetzten Lösungen. Die vermessenen Proben wurden mit großer Sorgfalt entgast und mindestens 5 h bei 4 °C vorgekühlt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden 1 mM für nicht assoziierte und 30 µM Lösungen für kovalent verknüpfte Modellpeptide eingesetzt.
Die thermische Denaturierung erfolgte im Temperaturbereich von 4-88 °C mit einem Wärmegradienten von 12 °C/h (ergibt 15 °C/h mit Propylenglykol als Lösemittel). Die Datenanalyse erfolgt mit der Software *Origin* der Firma *MicroCal* (Northampton, USA), die speziell für DSC-Methoden angepasst wurde, mittels dem *non-two-state model*, um eine van't-Hoff-Enthalpie zu erhalten.

5.2.7 Massenspektrometrie

Es sind stets die monoisotopischen Massen angegeben.

5.2.7.1 System A:

LC-MS-Massenspektrometrie wurde an einem *PE Sciex API 165* ESI-Massenspektrometer der Firma *Applied Biosystems* (Forster City, USA) durchgeführt. Als HPLC-System wurde ein Microgradient-System *140 C* der Firma *Applied Biosystems* (Forster City, USA) mit einem Diodenarray-Detektor *1100 Series*, Modell *G1315B* der Firma *Agilent* (Palo Alto, USA), einem *Series 200* Autosampler und einem *Nelson 200 Interface* der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) eingesetzt. Als Trennsäule wurde eine *Nucleosil* 100-5 C_8 RP-Säule der Firma *Macherey&Nagel* (Düren, D) mit einem linearen Gradienten von 0,1 % TFA in H_2O (95:5) nach 0,1 % TFA in CH_3CN (5:95) bei einer Flussrate von 200 µL/min verwendet. Zum Erstellen und Prozessieren der Spektren wurde die Software *BioMultiView* (Version *1.3.1*) der Firma *PE Sciex* (Ontario, CAN) unter *MacOS 9* eingesetzt.

5.2.7.2 System B:

Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einem *micro-TOF-LC*-Massenspektrometer der Firmal *Bruker Daltonics* (Bremen, D) aufgenommen. Zur kombinierten LC-MS Analyse wurde das HPLC System *Series 1100* der Firma *Agilent* (Palo Alto, USA) eingesetzt, das aus Pumpe, Entgaser, Autosampler, Säulenofen und Detektor besteht. Die Steuerung erfolgte mittels der Software *Compass* (Version *1.1*) für *microTOF*, die Programme *HyStar* (Version *3.1.52*), *microTOF Fcontrol* (Version *1.1.59*) und *Data Analysis* (Version *3.3.149*) beinhaltet. Es wurde eine Säule *Hypersil Gold* 100-5 C_{18} der Firma *Thermo Electron Corp.* (Waltham, USA) mit einer Flussrate von 250 µL/min und einem linearen Gradienten von 0,05 % TFA in MQ-H_2O (90:10) nach 0,05 % TFA in CH_3CN (10:90) in 17 min verwendet. Die hochaufgelösten Massenspektren in Kombination mit HPLC sind als LC-HR-MS gekennzeichnet.

Das Massenspektrum des Lipokollagenpeptid Trimer T2 wurde an einem MALDI-TOF Massenspektrometer bei der Firma *Agilent* (Palo Alto, USA) in 40 % CH_3CN unter Druck durchgeführt.

5.2.7.3 System C:

In Zusammenarbeit mit Dr. Frank Siedler aus der Arbeitsgruppe wurde eine Messung zur Charakterisierung des Nebenproduktes der Kollagenpeptidsynthese an einem MALDI-TOF Massenspektrometer *Reflex III* der Firma *Bruker Daltonics* (Bremen, D) vollautomatisch durchgeführt.

5.2.8 Markierung der Peptide mit den Carbocyaninfarbstoffen Cy™3 und Cy™5

Für die Markierung der Kollagenpeptide mit Fluoreszenzmaker wurden die aktivierten mono-funktionellen Farbstoffderivat CyX™-HOSu-Ester (X = 3 oder 5) der Firma *Amersham Bio-science* (Freiburg, D) verwendet. (Cy™3: λ_{ex}= 550 nm, λ_{em} = 570 nm; Cy™5: λ_{cx}= 650 nm, λ_{em} = 680 nm)

Die Kollagenpeptid wurden unter Lichtausschluss zu dem jeweiligen Carbocyaninfarbstoff und 1 M $NaCO_3$, pH 9,3 (1:1:0,1 Äq.) gegeben und im Dunklen in einem *Echo Therm™ IC20* Thermostatschüttler von *Torrey Pines Scientific inc* (San Marcos, CA, USA) auf Stufe 2 bei

25 °C bzw. in einem *Elmi, Sky Line, Intelli-Mixer RM-2* (Riga, LV) mit Rpm = 25 bei 4 °C 30 min gekuppelt (siehe Tabelle 9). Die Vollständigkeit der Markierung wurde mittels analytischer HPLC überprüft. Zum Abreagieren von überschüssigem Farbstoff wurde 1 µL einer 1 M Ethanolamin/HCl- Lösung, pH 8,3, zugegeben und erneut unter Lichtausschluss 30 min bei 25 °C bzw. 4 °C im gleichen Gerät geschüttelt.

Tabelle 9: Übersicht über die Markierung der verschiedenen Peptide mit Fluoreszenzmakern

Peptid	Konz./Puffer	Fluorophor	Konz./Puffer	$NaCO_3$	Temp.	Bezeichnung
EK2*	1 mM/H_2O	Cy3	1 mM/H_2O	1 M	25 °C	**EK2*-Cy3**
EK2*	1 mM/H_2O	Cy3	1 mM/H_2O	1 M	4 °C	**T1*oK-Cy3#**
T1*	1,2 mM/H_2O	Cy3	1,2 mM/H_2O	1 M	25 °C	**T1*-Cy3**
EK2*	1,2 mM/IBP	Cy5	1,2 mM/IBP	1 M	25 °C	**EK2*-Cy5**
T1*	1,2 mM/IBP	Cy5	1,2 mM/IBP	1 M	25 °C	**T1*-Cy5**

* ^{15}N-Gly markiert

T1oK-*Cy3*: selbstassoziiertes Trimer ohne C-terminalen Cystinknoten (aus EK2*-Ketten)

Für die Markierung der α1-I Domäne mit Fluoreszenzmaker wurde das aktivierte monofunktionelle Farbstoffderivat Cy5™-HOSu-Ester benutzt. Dazu wurde der lyophylisierte Marker in 100 µL gelöst und 50 µL davon zu 1 mL α1-I Domäne (300 nmol) und 5 µL $NaCO_3$·HCl, pH 9,3, gegeben und 0,5 h bei RT unter Lichtausschluss im *Echo Therm™ IC20* Thermostatschüttler von *Torrey Pines Scientific inc* (San Marcos, CA, USA) auf Stufe 2 geschüttelt.
Ungebundener Farbstoff wurde nicht aus der Präparation des markierten Peptids entfernt, da keine unspezifische Bindung von Cy™5-Farbstoff an die Oberfläche beobachtet werden kann und der ungebundene Cy™3-Fluoreszenzmaker in der Gelelektrophorese nicht stört. Die Cy™3,5-Peptid–Präparation wurde bis zur Verwendung im Dunkeln bei 4 °C (Cystin-Knoten verknüpftes und selbstassoziertes Kollagenpeptid sowie die α1-I Domäne) bzw. RT (unverknüpftes einzelsträngiges Kollagenpeptid, **EK2-Cy3**) aufbewahrt.

5.2.9 Viskositätsmessung

Für die dynamische Lichtstreuung (siehe Punkt 5.2.10) ist die Kenntnis der Viskosität des verwendeten Lösemittels entscheidend und wurde daher im *Automated MicroViscometer* (*Anton*

Paar, Graz, A) ermittelt. Dazu wurde das Lösemittel in die Glasküvette gefüllt und von jeweils drei Messungen der Mittelwert berechnet.

5.2.10 Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann die Größe und die Homogenität von Lipidvesikel bestimm werden. Die Methode beruht auf der Untersuchung der Frequenzverteilung des gestreuten Lichts, die durch Braunsche Bewegungen von Partikel in Lösung erzeugt wird.

DLS wurde mit einem Detektor Modell *PDDLS/cool Batch 90T* mit *PD 2000 DLS Plus* in der dazugehörigen Küvette unter Verwendung der Software *Precision Deconvolve*[32] der Firma *Precision Detectors, Inc.* (Bellingham, USA) bei 25 °C durchgeführt. Wenn die DLS in Puffern (z.B. PBS) durchgeführt wurde, wurde zuvor die Viskosität der Lösung (siehe Punkt 5.2.9) bestimmt und dieser Parameter entsprechend miteinbezogen.

5.2.11 Kristallisation

Um genaue Aussagen über die Struktur von Proteinen treffen zu können, sind Röntgenstrukturanalysen von größter Bedeutung. Dazu ist es notwendig, das gewünschte Protein bzw. den Proteinkomplex zu kristallisieren, um dann Röntgenbeugungsexperimente durchführen zu können.

Für Proteine sind eine Vielzahl von vielversprechenden Kristallisationsmethoden bekannt (z.B. Shotgun-Kristallisation, „hanging drop Dampfdiffusion“ usw.)

In Zusammenarbeit mit Iris Asen aus der Arbeitsgruppe von Dr. Kornelius Zeth (MPI für Biochemie, Martinsried, D) und der Firma *Crelux* (Martinsried, D) wurden Kristallisationsversuche von Kollagen und als Kollagen/α1-I-Domäne-Co-Komplex in Nanoliter-Ansätzen unternommen. Bislang konnten jedoch keine Kristalle erhalten werden.

5.2.12 Herstellung von Mikrostempeln

Mit Hilfe von Mikrostempel ist es möglich, Strukturen auf Oberflächen zu bringen und dadurch mikrostrukturierte Oberflächen zu generieren.

Auf Glas wurden durch photolithographische Methoden linienförmige und rechteckige Stempelvorlagen geätzt. Diese Stempelnegative (eigene Herstellung, MPI für Polymerforschung,

Mainz, D) wurden mit 2 % Hellmanex-Lösung gründlich gereinigt, mit MQ-H_2O gespült und im gefiltertem Luftstrom getrocknet. Das Zweikomponentensilikon *PMDS Base 184* (bzw. *186*) *Sylgard Silicone Elastomer* der Firma *Sasco Semiconductor* (Putzbrunn, D) wurde nach Herstellerangaben mit entsprechenden Mengen an *PMBS Curing Agent Sylgard Silicone* (*Sasco Semiconductor*, Putzbrunn, D) gemischt und möglichst ohne Luftblasenbildung vorsichtig vermischt. Anschließend wurden abgeschnittene 1 mL-Pipettenspitzen auf die gereinigten Matrixen gestellt und mit der Silikonmischung angefüllt. Je nach verwendetem Zweikomponentensilikon wurden die Stempel 3-6 d trocknen gelassen. Durch Aufschneiden der Pipettenspitzen wurden die Stempel aus ihrer Form geholt und sofort gekennzeichnet, um eine spätere Zuordnung zu den Vorlagen zu ermöglichen. Die Stempel können durch Waschen mit 2 % Hellmanex-Lösung und EtOH gereinigt, in *6-well* Platten der Firma *Falcon* (*BD Bioscience,* Heidelberg, D) bei RT aufbewahrt und so mehrfach verwendet werden.

5.3 Spektroskopische Methoden

5.3.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektren wurden an einem Zweistrahlspektrometer *Lambda 19* der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) aufgenommen und mit der Software *UV WinLab* (Version *2.7*) der Firma *Perkin Elmer* (Überlingen, D) ausgewertet. Die Peptidkonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass die gemessene Absorption zwischen 0,1 und 1,0 Absorptionseinheiten lag. Zur Aufnahme der Spektren wurden Quarz *Suprasil*® Küvetten *282 QS* der Firma *Hellma* (Müllheim, D) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Sämtliche Proben wurden bei RT vermessen.

Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford (siehe Punkt 5.6.3) wurden an einem Spektrometer *Ultrospec*™ *2100 pro* von *Amersham Bioscience* (Freiburg, D) in Plastikküvetten von *Hellma* (Müllheim, D) mit einer Schichtdicke von 10 mm bei RT und einer Wellenlänge λ von 595 nm durchgeführt.

5.3.2 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem Spektrapolarimeter mit thermostatisierbaren Küvettenhalter des Typs *J-715* der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt, D) mit Power Supply *PS-150J* und

Peltier-Element *PFD-350S* bei 4 °C und 25 °C aufgenommen. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software *Spectra-Manager for Windows 95/NT* (Version *1.53.04*) der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt, D). Zur Aufnahme der Spektren wurden Quarz *Suprasil*® Küvetten *110 QS* der Firma *Hellma* (Müllheim, D) mit Schichtdicken von 0,1-1 mm verwendet. Alle Einzelketten wurden, soweit nicht anders beschrieben, in 1 mM 5 h auf 4 °C vorgekühlten Lösungen vermessen. Bei assoziierten Kollagenpeptidketten wurde hingegen eine Konzentration von 30 µM bevorzugt. Die verwendeten Puffer bzw. MQ-H_2O wurden entgast. Alle Spektren wurden in einem Bereich zwischen 190 – 260 nm aufgenommen, wobei je vier Scans pro Probe durchlaufen und kumuliert wurden, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Die resultierenden Spektren sind in Elliptizität pro Aminosäurerest gezeigt, welche nach der:

Gleichung 3: $$[\Theta]_R = [\Theta]/n \ [deg \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1}]$$

$[\Theta]_R$ = molare Elliptizität pro Aminosäure, $[\Theta]$ = molare Elliptizität; n = Anzahl der Peptidbindungen

aus den Rohdaten berechnet wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden sie in Einheiten pro mol und Aminosäurerest dargestellt ($[\Theta]_R$).

Thermische Entfaltungskurven wurden mit identischen Peptidkonzentrationen und Lösungssystemen durchgeführt. Dabei wurde das für trimere Strukturen typischen Maximum bei 225 nm als Funktion der Temperatur aufgezeichnet. Der Temperaturgradient war bei allen Versuchen 12 °C/h.

5.3.3 NMR Spektroskopie

^{1}H-NMR-Spektren wurden an einem *AM 400* bzw. *AMX 500* Spektrometer der Firma *Bruker* (Ettlingen, D) aufgenommen. Konformationsanalysen der Peptide wurden bei einer Protonenfrequenz von 500.13 MHz zwischen 4 °C und 75 °C mit Hilfe eines *DRX 500* Spektrometers der Firma *Bruker* (Ettlingen, D) aufgenommen. Die Konzentrationen der assoziierten Kollagenmodellpeptide lagen zwischen 1 und 2 mM. Für das Trimer konnten die Resonanzen größtenteils nach der Methode von Wüthrich mit Hilfe von 2D-TOCSY- und 2D-NOESY-Experimenten zugeordnet werden. Die Trimere wurden in einer Mischung aus H_2O/D_2O (9:1) vermessen, wobei die *WATERGATE*-Wasserunterdrückungsmethode Verwendung fand.

Temperatur-Shift Koeffizienten für die Amid Protonen wurden durch 1D-Spektren und ^{1}H-^{15}N-FHSQC-Spektren erhalten, die zwischen 4 °C und 27 °C aufgenommen wurden. Höhere Temperaturen verfälschten die Messungen durch beginnende Schmelzvorgänge der Tripelhelizes. H/D Austauschexperimente wurden bei 27 °C durchgeführt. D_2O wurde eisgekühlt zu einer aus H_2O lyophylisierten Probe gegeben, wobei erste 1D-Messungen 10 min nach D_2O Zugabe aufgenommen wurden, die einen vollständigen Austausch bestätigten. Datenweiterverarbeitung und -Zuordnung wurden mit XWINNMR-v3 durchgeführt.

5.4 Methoden und Vorschriften zur Peptidsynthese

5.4.1 Beladung von Rink –Amid- MBHA –Harzen

Das Harz wurde 10 min in trockenem DMF quellen gelassen und die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF (1 x 5 min und 1 x 15 min) abgespalten. Nach dem Waschen mit DMF (3 x 3 min), MeOH (3 x 3 min), CH_2Cl_2 (3 x 3 min) und MeOH (3 x 3 min) wurde mit Fmoc-Gly-OH/HBTU/HOBt/DIPEA (0,9 Äq., 1:1:1:2) in DMF für 2 h bei RT vorbelegt. Es folgten Waschschritte mit DMF (3 x 3 min), MeOH (3 x 3 min), CH_2Cl_2 (3 x 3 min), MeOH (3 x 3 min) und DMF (3 x 3 min). Restliche freie Aminogruppen wurden mit Ac_2O/DIPEA (4 Äq., 1:1) und DMAP (0,1 Äq.) in DMF (2 x 30 min) blockiert. Nach dem Trocknen im Vakuum wurde die Harzbelegung bestimmt.

5.4.2 Bestimmung der Harzbeladung

Die effektive Beladung des Harzes mit Fmoc-geschützten Aminosäuren kann UV-spektroskopisch bestimmt werden. Hierfür wurde eine definierte Menge des zuvor im Vakuum getrockneten Harzes in einen 10 mL-Messkolben gegeben und mit 1 mL einer frisch bereiteten Mischung aus 20 % Piperidin in DMF [v/v] versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit wurde der Messkolben mit MeOH auf 10 mL ($V_{Messkolben}$) aufgefüllt und die Absorption des bei der Reaktion entstandenen Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes ($\varepsilon = 7800\ M^{-1}cm^{-1}$) bei 301 nm ($A_{301nm}$) bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beer´schen-Gesetzes errechnet sich daraus die Beladung des Harzes nach folgender Gleichung:

Gleichung 4:
$$Beladung\left[\frac{mmol}{g}\right] = \frac{A_{301nm}}{7800 \cdot M^{-1}cm^{-1} \cdot D[cm]} \bullet \frac{V_{Masskolben}[mL]}{m_{Harz}[g]}$$

A_{301nm} = gemessene Absorption bei 301 nm; $V_{Messkolben}$ [mL] = 10 mL; m_{Harz} [g] = Menge an eingewogenem Harz; 7800 $M^{-1}cm^{-1}$ = ε des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes; D [cm] = Schichtdicke der verwendeten Küvette

5.4.3 Automatisierte Peptidsynthese

Für die Fragmentkupplung des Adhäsionsmotivs an die entstehende Polypeptidkette wurde das Hexapeptid Fmoc-Phe-Hyp(*t*Bu)-Gly-Glu(O*t*Bu)-Arg(Pbf)-Gly-OH Fmoc/*t*Bu geschützt als Säure am polymeren Trägerharz (TCP-Harz-Gly-Fmoc, *PepChem*, Reutlingen, D) synthetisiert. Hierbei kam ein Batch-Synthesizer Typ *431A* der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA) zum Einsatz.

5.4.4 Manuelle Peptidsynthese

Die vollständige Synthese der Polypeptidketten (Beladung des Harzes, Abspaltung der zur Fmoc/*t*Bu-Strategie orthogonalen Schutzgruppe, Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren und des Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH Tripeptid-Bausteins) erfolgte in Einmal-Plastikspritzen *Discardit II* (2, 5, 10 und 20 mL) der Firma *Becton Dickinson* (Franklin Lakes, USA) mit Polyethylen-Fritten, mittlere Porenweite 35 µm und Polyethylen-Verschlussstopfen. Die Durchmischung der Reaktionsansätze wurde mit einem Laborschüttler *KS 130 basic* der Firma *IKA* (Staufen, D) bewerkstelligt. Das Lösemittel wurde mittels Wasserstrahlpumpen erzeugtem Vakuum in eine Waschflasche abgesaugt.

5.4.4.1 Peptidsynthese in Lösung

Der Tripeptidbaustein Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH wurde nach der veröffentlichten Vorschrift nach Sacca et al. in Lösung im Grammassstab synthetisiert, abgespalten und mit Säulenchromatographie aufgereinigt.[215]

5.4.4.2 Peptidsynthesevorschriften am Harz (Generelle Methode)

Das in dieser Arbeit verwendete Standardprotokoll zur Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) ist in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Protokoll der Peptidsynthese am polymeren Träger (SPPS).

Syntheseschritt	Reagenzien und Lösemittel	Reaktionszeit
Quellen des Harzes	DMF oder NMP/CH_2Cl_2 (4:1)	2 x 10 min
Fmoc-Spaltung	20 % Piperidin/DMF [v/v] ab 9. AA: 2 % DBU, 2 % Piperidin in DMF	5 + 15 min 30 sec + 1 min
Waschschritte	3 x DMF 3 x MeOH 3 x CH_2Cl_2 3 x MeOH 3 x DMF oder NMP/CH_2Cl_2 (4:1)	3 x 5 min 3 x 5 min 3 x 5 min 3 x 5 min 3 x 5 min
Testspaltung	TFA/H_2O/TIPS = 95 : 3: 2 [v:v:v]	10 min
1. Kupplung	Fmoc-Xaa-OH/HBTU/HOBt/DIEA (4:4:4:8 Äq.)* bzw. Fmoc-PO(*t*Bu)G-OH/TFFH/DIEA (1,8 : 1,8 : 3,6 Äq.)	2-5 h
Waschschritte	3 x DMF oder NMP/CH_2Cl_2 (4:1) 3 x MeOH 3 x CH_2Cl_2 1 x Et_2O	3 x 5 min 3 x 5 min 3 x 5 min
Kaiser Test Chloranil Test	5 % Ninhydrin/EtOH + 4 g/mL Phenol/EtOH + 2 % KCN (1 mM)/Pyridin 200 µL Aceton + 50 µL Chloranil$_{sat}$/Toluol	5 min/ 95 °C 5 min
2. Kupplung	Fmoc-Xaa-OH/HBTU/HOBt/DIEA (4:4:4:8 Äq.)* bzw. Fmoc-PO(*t*Bu)G-OH/TFFH/DIEA (0,8 : 0,8 : 1,6 Äq.)	2-5 h
Waschschritte	3 x DMF oder NMP/CH_2Cl_2 (4:1) 3 x MeOH 3 x CH_2Cl_2 1 x Et_2O	3 x 5 min 3 x 5 min 3 x 5 min
Test	Kaiser- oder Chloraniltest (siehe oben)	
Lipoderivatisierung	$CH_3(CH_2)_8CO_2H$/HBTU/HOBt/DIEA (4:4:4:8 Äq.)	1 x 5 h
Harzabspaltung Entfernen der Schutzgruppen	TFA/H_2O/TIPS (96 : 2 : 2 v/v/v)	1 x 5 min 2 x 15 min 3 x 30 min
Harzabspaltung ohne Entfernen der Schutzgruppen	TFA/ CH_2Cl_2/TIPS (2 : 93 : 5 v/v/v)	1 x 5 min 1 x 30 min 1 x 90 min

Fmoc-Cys(S*t*Bu)-OH/HBTU/HOBt/DIEA (4:4:4:4 Äq.) [216]

Als Seitenketten-Schutzgruppen wurden *t*Bu für Serin und Hydroxyprolin, O*t*Bu für Glutaminsäure und S*t*Bu für Cystein verwendet. Arginin wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit als Pbf geschütztes Aminosäure-Derivat eingesetzt, allerdings im Verlauf der Arbeit durch das (*ω,ω'*)-Boc geschützte Derivat Fmoc-Arg(Boc)$_2$-OH ersetzt, um die auftretenden Probleme mit einer wandernden Pbf Schutzgruppe zu unterbinden.
Die Aufarbeitung der abgespalteten Peptide erfolgte durch Fällung mit MTB/Hexan (2:1 für **EK2** bzw. 1:2 für **EK1** und **EK3**) und anschließender Zentrifugation (*Eppendorf* Zentrifuge *5810 R*, Wesslingen-Berzdorf,D), wonach der Überstand verworfen wurde. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels RP-HPLC gereinigt und anschließend gefriergetrocknet.

5.4.4.3 Kaiser-Test

Die Vollständigkeit von Aminosäurekupplungen primärer Amine kann mit Hilfe des Tests nach Kaiser[217] überprüft werden. Zur Durchführung des Kaiser-Tests werden einige Harzkugeln in ein kleines Reagenzglas gegeben und mit jeweils 20 µL folgender Lösungen versetzt:

Kaiser Test:	Lösung I:	1,0 g Ninhydrin in 20 mL EtOH
	Lösung II:	80 g Phenol in 20 mL EtOH
	Lösung III:	0,4 mL 1 mM aq. KCN in 19,6 mL Pyridin

Die Mischung wird in einem Heizblock (*Eppendorf Thermostat 3401*, Wesslingen-Berzdorf, D) für 5 min auf 95 °C erwärmt. Blaufärbung zeigt eine unvollständige Kupplung an, wogegen eine schwach gelbliche Lösung einen vollständigen Kupplungsschritt bestätigt. Gegebenenfalls ist die Kupplung zu wiederholen, bis keine Blaufärbung mehr beobachtbar ist.

5.4.4.4 Chloranil-Test

Die Vollständigkeit von Aminosäurekupplungen sekundärer Amine (Prolin) kann mit Hilfe des Chloranil-Tests überprüft werden.[218,219] Zur Durchführung des Tests werden einige Harzkugeln in ein kleines Reagenzglas gegeben und mit 50 µL gesättigter Chloranil/Toluol-Lösung und 100 µL Aceton versetzt. Nach 5 min lässt sich am besten mit Hilfe einer Lupe feststellen, ob ein Farbumschlag der gelben Harzkugeln stattgefunden hat. Eine Blaufärbung zeigt eine unvollständige Kupplung an, wogegen eine unveränderte Färbung des Harzes einen

vollständigen Kupplungsschritt bestätigt. Gegebenenfalls ist die Kupplung zu wiederholen, bis keine Blaufärbung mehr beobachtbar ist.

Chloraniltest:	Lösung I:	gesättigte Chloranil/Toluol-Lösung
	Lösung II:	Aceton

5.4.4.5 Fragmentkupplung

Durch Fragmentkupplung, der durch automatisierte Synthese (siehe Punkt 5.4.3) entstandenen Fmoc geschützten Hexapeptidsäure, an die entstehende Polypeptidkette soll die zeitaufwendige einzelne manuelle Peptidkupplung beschleunigt und optimiert werden.
Dazu wurde das Hexapeptid Fmoc-Phe-Hyp(*t*Bu)-Gly-Glu(O*t*Bu)-Arg(Pbf)-Gly-OH mit TFA/CH_2Cl_2/TIPS [2:93:5] vom Harz abgespalten, ohne die Schutzgruppen zu entfernen. Die Lösung wurde nach Zugabe von NMP oder DMF im Vakuum eingeengt, das Peptid in eiskaltem Hexan/MTB-Gemisch (2:1) ausgefällt und anschließend gefriergetrocknet. Die Kupplung des Fragments an die Polypeptidkupplung erfolgte mit der TFFH-Variante (siehe Tabelle 10).

5.4.4.6 Abspaltung vom Harz mit gleichzeitiger Entfernung der Schutzgruppen

Die Schutzgruppen, bis auf die Cys(S*t*Bu), und das Harz wurde mit TFA/CH_2Cl_2/TIPS [96:2:2] (5, 15, 15, 30, 30, 30 min) von der Peptidkette abgespalten und das Harz abschießend (2 x 4-6 min) mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die vereinigten Filtraten wurden aufkonzentriert und das Rohprodukt im eiskalten MTB/Hexan-Gemisch (2:1) ausgefällt. Die entschützte Peptidkette wurde mit *t*BuOH/H_2O (4:1) gefriergetrocknet und für den weiteren Gebrauch mittels RP-HPLC (siehe Punkt 5.2.5) aufgereinigt. Die für die Trennung verwendeten Gradienten und Laufzeiten sind bei der Bescheibung der präparativen HPLC (Tabelle 7 und Tabelle 8) angegeben.

5.4.5 Abspaltung der S-tert-Butylthio-Schutzgruppe

Die Entschützung der Cysteine erfolgt reduktiv mit Tributylphosphin unter Inert-Bedingungen, da eine vorzeitige Oxidation der Seitenketten unterbunden werden muss.
Die Peptide wurden im geeigneten Lösemittel (**EK2**, **EK2*** = TFE/H_2O (95:5); **EK3** = Propylenglykol) gelöst und entgast. Unter Hochvakuumbedingungen wurde im Argonstrom

Tributylphosphin zugegeben und die Lösungen für 5 h bei RT gerührt. Der Fortgang der Reduktion wurde mittels analytischer HPLC überprüft, anschließend die Lösungen im Vakuum aufkonzentriert und das Peptid mit dem freien N-Terminus (**EK2**, **EK2***) mit kaltem Et_2O gefällt. Die kollagenartigen Peptide wurden aus *t*Bu/H_2O lyophylisiert und im Vakuum aufbewahrt.

5.4.6 Aufarbeitungsverfahren

Das wässrige Aufarbeiten eines Reaktionsansatzes bezeichnet die Extraktion einer Lösung des Rohproduktes in einem hydrophoben Lösemittel (EE, Diethylether) mit je dreimal 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung, und/oder 5 %iger $KHSO_4$-Lösung, gesättigter Kochsalzlösung und entionisiertem H_2O. Die organische Phase wird anschließend über Na_2SO_4 getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

5.4.7 Oxidation zum Cys-verknüpften Homotrimer

Für die C-terminale Verknüpfung und der damit einhergehenden Stabilisierung der drei Kollageneinzelketten ist eine zuvor korrekte Selbstassemblierung essentiell. Die anschließende Oxidation wird bei niedriger Temperatur mit Sauerstoff bewerkstelligt.

Eine Argon gesättigte Lösung des Peptids wurde unter Hochvakuumbedingungen in entgastem Lösemittel (**EK2**, **EK2*** = 25 mM NH_4Ac Lösung, pH 8,4; **EK3** = Propylenglykol) für 5-7 h auf 7 °C vorgekühlt. Danach wurde die Lösung unter Luftsauerstoff bei 4-7 °C für 30 d gerührt. Der Oxidationsverlauf wurde mit Ellmann's Reagenz und massenspektrometrisch überprüft. **T1** und **T1*** lagen homogen vor; **T2** konnte nicht in homogener Form erhalten werden. Die Homotrimere wurde gefriergetrocknet und bei 4 °C gelagert.

Ellmann's Reagenz:	Lösung I:	0,1 M $NaHCO_3$
	Lösung II:	0,1 % 5,5'-Dithionitrobenzoesäure in EtOH

5.4.8 Zusammenfassende Übersicht der Synthesevorschriften

Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH

Darstellung erfolgte nach Vorschrift von Saccà et al.[160] (siehe 5.4.4.1). Auswaage: 52 g (82 %); weißer Feststoff; DC: $R_f = 0,6$ (CH_3CN:H_2O:AcOH = 8:2:1); HPLC: $t_R = 11,5$ min; m/z = 564,4 $[M+H]^+$; Mr = 563,6 berechnet für $C_{31}H_{37}N_3O_7$.

Fmoc-Phe-Hyp(*t*Bu)-Gly-Glu(O*t*Bu)-Arg(Pbf)-Gly-OH

Darstellung erfolgte mittels automatisierter Peptidsynthese (siehe 5.4.3 und 5.4.4.5). Hierzu wurden jeweils 454 mg mit Fmoc-Gly vorbeladenes TCP-Harz (Substitution: 0,55 mmol/g) eingewogen. Für eine Harzbelegung von 0,25 mmol/g und Kupplung mit jeweils 4 Äq. der entsprechenden Aminosäure wurden je 1 mmol der jeweiligen Aminosäure eingewogen. Nach der automatisierten Peptidsynthese wurde das Hexapeptid mit 3 mL TFA:CH_2Cl_2:TIPS = 2:93:5 vom Harz abgespalten, ohne die Schutzgruppen zu entfernen. Nach Zugabe von 6 mL NMP wurde die Lösung im Vakuum eingedampft und das Peptid in eiskaltem Hexan:MTB = 2:1 ausgefällt und gefriergetrocknet. Auswaage: 255 mg (80,6 %); weißer Feststoff; HPLC: t_R = 16,9 min; m/z = 1264,8 $[M+H]^+$; M_r = 1264,5 berechnet für $C_{65}H_{85}N_9O_{15}S$.

Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Cys(S*t*Bu)-Cys(S*t*Bu)-Gly-Gly-Gly-Harz

3,44 g Rink-Amid-MBHA-Harz (Substitution 0,73 mmol/g) wurden nach der unter Kapitel 5.4.1 beschriebenen Methode mit Fmoc-Gly-OH beladen. Die effektive Beladung des Harzes wurde bestimmt (siehe 5.4.2) und betrug 0,47 mmol/g. Die weitere Synthese erfolgte nach der in Tabelle 10 beschriebenen, allgemeinen Peptidsynthesevorschrift. Von dem Peptid wurde eine Testabspaltung durchgeführt. Eine explizite Aufreinigung wurde nicht vorgenommen, daher liegt das Peptid nicht in homogener Form vor. Testabspaltung (Peptid ohne *t*Bu-Schutzgruppen): HPLC: t_R = 13,3 min; m/z = 1692,6 $[M+H]^+$, 847,0 $[M+2H]^{2+}$ und weitere; M_r = 1692,0 berechnet für $C_{76}H_{105}N_{16}O_{20}S_4$.

Fmoc-Phe-Hyp(tBu)-Gly-Glu(OtBu)-Arg(Pbf)-Gly-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Cys(S*t*Bu)-Cys(S*t*Bu)-Gly-Gly-Gly-Harz

Zunächst wurde eine Darstellung mittels Fragmentkupplung (siehe 5.4.4.5) zwischen 2 Äq. (32,06 mg) Fmoc-Phe-Hyp(tBu)-Gly-Glu(OtBu)-Arg(Pbf)-Gly-OH mit 1 Äq. (50 mg) des sich am Harz befindenden Peptids Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Pro-Cys(S*t*Bu)-Cys(S*t*Bu)-Gly-Gly-Gly-Harz unter Beteiligung von 2 Äq. TFFH und 4 Äq. DIPEA in DMF und einer Kupplungsdauer von 5 h als Dreifachkupplung

getestet. Testabspaltung (Peptid ohne *t*Bu-Schutzgruppen): HPLC: t_R = 10,8 min (Edukt am Harz ohne Fmoc), 12,8 min (Edukt Hexapeptid) und 15,7 min (Produkt); m/z = 1177,0 $[M+2H]^{2+}$ und weitere; M_r = 2351,75 berechnet für $C_{105}H_{147}N_{25}O_{29}S_4$.→ Die Darstellung mittels Fragmentkupplung wurde abgebrochen.

Die Synthese des Peptids wurde daher komplett durch manuelle Einzelkupplungen der entsprechenden Aminosäuren nach dem Protokoll aus Tabelle 10 (siehe 5.4.4.2) unter Verwendung von Fmoc-Arg$(Boc)_2$-OH anstelle von Fmoc-Arg(Pbf)-OH durchgeführt. Testabspaltung (Peptid ohne *t*Bu-Schutzgruppen): HPLC: t_R = 15,7 min; m/z = 1177,0 $[M+2H]^{2+}$; M_r = 2351,75 berechnet für $C_{105}H_{147}N_{25}O_{29}S_4$

Kollagenmodellpeptide

Alle Synthesen wurden dem Standardprotokoll zur Peptidsynthese aus Tabelle 10 (siehe 5.4.4.2) folgend durchgeführt. Alle Peptide lagen nach der Reinigung als weißer Feststoff vor. Da nicht immer der gesamte Ansatz aufgereinigt wurde, ist bei den kollagenartigen Peptiden die prozentuale Ausbeute der gereinigten Menge in Tabelle 11 angegeben. Die Peptide **EK1** und **T2** konnten nicht in homogener Form erhalten werden. Für weitere analytische Daten siehe auch Tabelle 2.

Tabelle 11: Übersicht über die Auswaagen der synthetisierten Kollagenmodellpeptide

Peptid	Auswaage[mg]
EK2 mit Cys(S*t*Bu)	6,45 (23,3 %)
EK2* mit Cys(S*t*Bu)	6,6 (13,8 %)
EK3 mit Cys(S*t*Bu)	4,42 (26,0 %)
T1	6,0 (99,3 %)
T1*	6,2 (100 %)

* 15N-Gly markiert

5.5 Proteinchemische Methoden

Expression und Aufreinigung der α1- I Domäne als GST Fusionsprotein

Für die Isolierung eines rekombinanten Proteins (-Fragments) (hier: α1- I Domäne) eignet sich die Expression als Gluthation S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen in *E.coli*. Bei diesem System werden die in einen pGEX-Vektor klonierten Gene oder Genfragmente als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-Anker, der Gluthathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum*, exprimiert, die spezifisch an ihren natürlichen Liganden Gluthation (GSH) bindet. Das Fusionsprotein mit GST-Anteil wird im Batchpozess an GSH-Sepharose™4B (*Pharmacia Biotech*, Freiburg, D) gebunden und diese für die Aufreinigungsschritte in eine Chromatographiesäule überführt. So können Fusionsproteine schnell und schonend aus bakteriellen Lysaten isoliert werden. Um diesen relativ großen tag (26 kDa) nach der Reinigung abspalten zu können, besteht der Linker zwischen der GST und dem Protein aus einer Erkennungssequenz für eine spezifische Protease, z.B. Thrombin. In der vorliegenden Arbeit ist am daher C-Terminus der GST zusätzlich eine Sequenz für eine Thrombinschnittstelle eingebaut, so dass Proteine durch Thrombinprotease ohne die Thrombinschnittstelle von der GST abgespalten werden können. Mittels Benzamidin Sepharosesäule kann die Thrombinprotease in einem chromatographischen Schritt entfernt und das aufgereinigte Protein erhalten werden.

5.5.1 Expression der α1 I-Domäne als GST Fusionsprotein vom E.Coli Expressionsvektor pGEX

5.5.1.1 Expressionsvektor, IPTG Induktion und Herstellung bakterieller Lysate

Der *E.coli BL21*-Stamm mit dem pGEX-4T-3 Vektor mit inserierter α1-I Domäne als Glycerolstock war ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Prof. J. Käpylä, University of Jyväskylä, Finnland. Der Vektor besitzt ein Ampicilinresistenzgen (ampr) und einen tac-Promotor (Ptac) für eine effiziente Expression des Fusionsproteins. Die Transkription des Fusionsproteins kann durch die Bindung von IPTG induziert werden. Die Expression ist auf die Produktion des Proteins in löslicher und aktiver Form ausgerichtet. Entscheidend für die

Menge an exprimiertem Protein sind die Induktionstemperatur, die Induktionsdauer, die IPTG Konzentration und die Wachstumsphase der Bakterien zum Zeitpunkt der Induktion.
Für die Kultivierung wurden die transformierten *E.coli* Zellen im Schüttelkolben (Kolben mit Schikanen) bei 37 °C in 100 mL LB Medium supplementiert mit 100 µg/mL Ampicillin, auf dem Rotationsschüttler (*Elmi, Sky Line, Intelli-Mixer RM-2*, Riga, LV) bei 220 U/min als Übernachtkultur angesetzt. Die Vorkultur wurde 1:10 mit Ampicillin supplementiertem LB Medium verdünnt und bei 37 °C und 220 U/min bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 1 angezogen (ca. 2 h). Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 100 mM IPTG bis eine Endkonzentration von 0,1 mM IPTG erreicht wurde. Die Induktionsdauer betrug ca. 6 h bei einer Induktionstemperaturen von 30 °C und 200 Umdrehungen/min. Nach der Induktion wurde das Medium durch Zentrifugation in der *Beckman*-Zentrifuge *Coulteur™ Avanti J-20XP* (*Beckman*, Krefeld, D) mit einem *JLA* Rotor bei 7500 x g und 4 °C für 15 min abgetrennt. Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente in PBS bei -70 °C eingefroren.

LB Medium	1% [w/v] Trypton 0,5 % [w/v] Hefe Extrakt 1 % [w/v] NaCl 10 mM NaOH autoklavieren Lagerung bei RT

5.5.1.2 Zellaufaufschluss mittels Sonifizieren

Zur Lyse wurden die gefrorenen Zellen schonend aufgetaut und die Suspensionen in ein *Rosetta* Gefäß (*Rosett Cooling Cell*, *Branson*, Carouge-Geneve, CH) überführt. Die Sonifizierung erfolgte auf Eis mit einem *Branson Sonifier 450* (*Heinemann*, Schwäbisch Gmünd, D) gepulst bei 70 % *Duty Cycle* für ca. 6 x 30 sec Intervallen mit zweiminütiger Pause dazwischen. Der Zellaufbruch wurde auf Objektträgern unter einem Auflichtmikroskop *Dialux 20* (*Leica*, Wetzlar, D) überprüft. Die anschließend in ein Schraubdeckelglas überführte Zellsuspension wurde mit TritonX-100 bis zu einer Endkonzentration von 1 % TritonX-100 versetzt. Nach Rotation von 30 min bei 4 °C ist die Zelllyse abgeschlossen. Die Suspension wurde in einer *Beckman*-Zentrifuge *Avant J25* (Palo Alto, USA) für 30 min bei 20000 x g und 4 °C abgetrennt, der Überstand abgenommen und sofort weiterverwendet.

10 % Triton-X 100	Trition-X 100	5 mL/50 mL
	mit ddH_2O auf 50 mL auffüllen	
	sterilfiltrieren	
	Lagerung bei RT	

5.5.2 Aufreinigung der α1- I Domäne mittels Affinitätschromatographie

5.5.2.1 Vorbereiten der Glutathion (GSH)-Sepharose™ 4B

GSH-Sepharose™4B *(Pharmacia Biotech*, Freiburg, D) werden mit Zusätzen (z.B. 20 % EtOH) bei 4 °C gelagert, damit keine Kontaminationen mit Bakterien oder Schimmel entstehen. Daher muss sie vor Verwendung von diesen Zusätzen befreit werden. Dazu wurde die benötigte Menge an GSH-Sepharose™4B zweimal mit der zehnfachen Menge an gekühltem PBST gewaschen, in einer *Eppendorf* Zentrifuge *5810R* (Wesseling-Berzdof, D) bei 3220 x g 10 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend sofort verwendet.

PBS (10x):	1,37 M NaCl	80 g/L
	26,8 mM KCl	2 g/L
	43 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	7,7 g/L
	14,7 mM KH_2PO_4	2 g/L
	pH ~7,3,	
	autoklavieren	
	Lagerung bei RT	
PBS (1x):	PBS (10x)	5 mL/50 mL
	mit sterilem ddH_2O auf 50 mL auffüllen	
	Lagerung bei RT	
PBST:	PBS (10x)	5 mL/50 mL
	10 % Triton-X 100	5 mL/50 mL
	mit sterilem ddH_2O auf 50 mL auffüllen	
	Lagerung bei RT	
10 % Triton-X 100	Trition-X 100	5 mL/50 mL
	mit ddH_2O auf 50 mL auffüllen	
	sterilfiltrieren	
	Lagerung bei RT	

5.5.2.2 Binden der GST-Fusionsproteine an vorbereiteten GSH-Sepharose™4B

Nach dem Zellaufschluss (siehe Punkt 5.5.1) wurde die benötigte Menge gewaschener GSH-Sepharose™4B (siehe oben) mit dem Zellysat unter leichtem Rühren bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die so mit dem GST-Fusionsprotein beladene GSH-Sepharose™4B wurde in eine geeignete Chromatographiesäule (*BioRad Laboratories*, München, D) überführt, mit der zehnfachen Menge an PBST gewaschen und in PBST gequollen.

5.5.2.3 Regenerieren der GSH-Sepharose™4B

Nach Abspalten des Fusionsproteins (siehe Punkt 5.5.3) kann die GSH-Sepharose™4B regeneriert werden. Dazu wurde sie zuerst mit dem zweifachen Volumen an REG 1 gewaschen, dann mit dem doppelten Volumen an REG 2 und diese zwei Schritte wurden 4-5 x wiederholt. Anschließend wurde die GSH-Sepharose™4B mit dem 3-5fachen Volumen an PBS gewaschen. Um präzipitierte und denaturierte Substanzen zu entfernen, wurden die GSH-Sepharose™4B mit dem doppelten Volumen an 6 M GUA, gefolgt von dem fünffachen Volumen PBS gewaschen. Um hydrophobisch gebundene Substanzen zu entfernen, wurde die Matrix mit dem 3-4 fachen Volumen 70 % EtOH, gefolgt von dem fünffachen Volumen PBS gewaschen. Abschließend folgten Waschschritte mit 20 % EtOH und Lagerung bei 4 °C.

REG 1:	0,1 M TRIS/Cl pH 8,5 0,5 M NaCl Lagerung bei RT	100 mL/L 100 mL/L
REG 2:	0,1 M NaOAc pH 4,5 0,5 M NaCl Lagerung bei RT	100 mL/L 100 mL/L
GUA	6 M GUA autoklaviert Lagerung bei RT	573 g/L

5.5.3 Thrombinverdau von GST Fusionsproteinen

Lyophilisierte Thrombinprotease (*Amersham Biosciences*, Freiburg, D) wurde nach Herstelleranweisung durch vorsichtiges Umschwenken in gekühltem PBS (1 x) mit einer Endkonzentration von 1 U/µL rekonstituiert und in kleineren Mengen bei -70 °C gelagert.

Gebundene GST-Fusionsproteine wurden mit einer Thrombinprotease-Lösung (80 µL + 920 µL PBS pro mL GSH-Sepharose™4B) 2 h bei RT auf einem Plattenschüttler *Rocky* (*IKA Labortechnik*, Staufen, D) geschwenkt. Die α1-I-Domäne wurde als Eluat aufgefangen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit PBS gewaschen, die Eluate vereint und bei 4 °C gelagert.

5.5.4 Entfernen der Thrombinprotease mittels Benzamidin Sepharose

Um die unerwünschte Thrombinprotease, die sich ebenfalls im Eluat mit dem gewünschten Protein (α1-I-Domäne) befindet, eliminieren zu können, wurde mit einer Benzamidin Sepharose Säule (*HiTrap™ Benzamidin FF(high sub)*, 1 mL, *Amersham Bioscience*, Freiburg, D) aufgereinigt. Dazu wurde die Säule zunächst mit ddH_2O gespült, um den darin enthaltenen Benzamidinlagerungspuffer (*Benzamidine storage buffer*, BSB) zu entfernen. Anschließend wurde sie mit dem fünffachen Volumen an PBS + 1 M NaCl äquilibriert. Die α1-I-Domäne/Thrombinprotease-Lösung wurde aufgebracht, langsam gesäult und die α1-I-Domäne im Eluat aufgefangen. Die Säule wurde zweimal mit dem fünffachen Volumen an PBS + 1 M NaCl gewaschen und die vereinigten Eluate bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die *HiTrap™ Benzamidin FF* Säulen wurden nach dem Lauf durch Spülen mit dem zehnfachen Volumen an REG 3 und 6 M GUA regeneriert. Durch Waschen mit dem zehnfachen Volumen an BSB und bei verschlossener Lagerung bei 4 °C ist eine Wiederverwendung möglich.

BSB:	50 mM NaAc pH 4,0	500 mL/L
	20 % EtOH	200 mL/L
	mit sterilem ddH_2O auf 1L auffüllen	
	Lagerung bei RT	
0,1 M Na-Ac	0,2 M HOAc	410 mL/L
	0,2 M NaOAc	90 mL/L
	mit sterilem ddH_2O auf 1 L auffüllen	
	pH 4,0	
	Lagerung bei RT	
REG 3	10 mM HCl	10 mL/L
	0,5 M NaCl	100 mL/L
	mit sterilem ddH_2O auf 1 L auffüllen	
	Lagerung bei RT	

5.5.5 Änderung von Pufferbedingungen und Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Zur Änderung von Pufferbedingungen und Aufkonzentrierung der α1-I-Domänen Proteinlösungen wurden je nach Volumenmenge Centriprep® YM-10 und Centricon® YM-10 Zentrifugeneinheiten (*Millipore*, Schwalbach, D) mit einer Molekulargewichtsausschlussgröße (*molecular weight cut off*, MWCO) von 10 kDa verwendet. Die Zentrifugationen wurden mit einer *Eppendorf Zentrifuge 5810 R* (Wesseling-Berzdorf, D) bei 3000 x g und 4 °C nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.6 Proteinanalytische Methoden

5.6.1 Elektrophoretische Trennverfahren

Für die Analyse der Proteine wurden SDS- und TRIS/Tricin-Gelelektrophoresen durchgeführt, bei denen die Proteine im elektrischen Feld vertikal wandern. Die Auftrennung von mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturierten Proteinen durch Polyacrylamid-Gelelektorphorese (PAGE) erfolgte nach Lämmli.[187] War eine verbesserte Auflösung im niedermolekularen Bereich erwünscht, fand die Methode nach Schägger Anwendung.[187,220]

Für die Elektorphorese wurden zur besseren Auftrennung der Proteine die Trenngele (pH 8,8) mit niederprozentigen Sammelgelen (pH 6,8) überschichtet. Für die Polymerisierung und als Radikalstarter für die Quervernetzung des Polyacrylamids aus Acrylsäureamid mit N,N'-Methylenbisacrylsäureamid (N,N'-Bisacrylamid, *BioRad Laboratories*, München, D) wurden Ammoniumpersulfat (APS, *BioRad Laboratories*, München, D) und N,N,N´,N´,-Tetramethylethylendiamin (TEMED, *BioRad Laboratories*, München, D) verwendet. Ein entsprechender Kamm wurde als Taschenformer während der Polymerisierung in einer Proteingel-Gießapparatur (*Hoefer*, *BioRad Laboratories*, München, D bzw. *LKB*, Bromma, SE) eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben auf das polymerisierte Gel wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült und die Pufferkammern mit Laufpuffer gefüllt. Die jeweils verwendeten Laufpuffer sind in den entsprechenden Protokollen vermerkt. Als Molekulargewichtsmarker diente *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained* Standard (Myosin 250 kDa, Phosphorylase B 148 kDa, BSA 98 kDa, Glutamindehydrogenase 64 kDa, Alkoholdehydrogenase 50 kDa, Carboanhydrase 36 kDa, Myoglobin-Rot 22 kDa, Lysozym 16 kDa, Aprotinin 6 kDa, Insulin B Kette, 4 kDa)

der Firma *Invitrogen* (Karlsruhe, D). Für die Elektrophorese wurde mit einem Spannungsmodul, Modell *Blue Power 500* der Firma *Serva* (Heidelberg, D) eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Lauffront die Trenngelgrenze erreichte. Die Spannung wurde dann auf 120 V – 180 V erhöht. Beim Erreichen der Lauffront an der unteren Gelgrenze wurde der Lauf gestoppt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele (wenn möglich) mittels Coomassie®-Färbemethoden (siehe Punkt 5.6.2) gefärbt, ausgewertet, getrocknet und archiviert (*Agfa Snapscan 600* Flachbett Scanner; *Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG*, Köln, D; *Epson*, *Epson Expression 1680 Pro*, Meerbusch, D).

5.6.1.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE): Diskontinuierliches Trennsystem nach Laemmli

Die SDS-Gelelektrophorese wurde in einem *XCell II mini cell apparatus* (*Novex*, *Invitrogen*, Karlsruhe, D) durchgeführt. Da die aufzutrennende und zu visualisierende α1-I-Domäne mit 25 kDa ein relativ geringes Molekulargewicht besitzt, wurden 14 %ige Gele verwendet (siehe Tabelle 12). Vor dem Auftragen auf das polymerisierte Gel wurden die Proteinproben mit 1/6-1/3 Volumen 5x SDS Probenpuffer (Denaturierungspuffer) 5-10 min bei 95 °C denaturiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Laemmli-Gels

Reagenzien	Trenngel (14 %)	Sammelgel
30 % [v/v] Acrylamid/Bis	2,35 mL	325 µL
1,5 M TRIS/Cl pH 8,8 + 0,4 % [v/v] SDS	1,25 mL	-
0,5 M TRIS/Cl pH 6,8 + 0,4 % [v/v] SDS	-	500 µL
ddH_2O	1,38 mL	1,185 mL
10 % [w/v] APS	25 µL	10 µL
TEMED	2,5 µL	2 µL

TRIS: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1,5 M TRIS/Cl, pH 8,8 mit 0,4 % SDS:	1,5 M TRIS 0,4 % SDS mit HCl auf pH 8,8 einstellen Lagerung bei RT	181,7 g/L 4g/L
0,5 M TRIS/Cl, pH6,8 mit 0,4 % SDS:	0,5 M TRIS 0,4 % SDS mit HCl auf pH 6,8 einstellen Lagerung bei RT	60,6 g/L 4g/L
1 M TRIS/Cl pH 6,8:	1 M TRIS mit HCl auf pH 6,8 einstellen Lagerung bei RT	121,14 g/L
SDS Probenpuffer (5x)	20 % SDS 1M TRIS/Cl pH 6,8 12,5 % [v/v]Glycerin 0,2 % [w/v] Bromphenolblau mit ddH_2O auf 48 mL auffüllen 4% [v/v] β-Mercaptoethanol	25 mL /50 mL 45 mL /50 mL 6,25 mL /50 mL 0,1 g /50 mL 2 mL /50 mL
SDS Laufpuffer (10x)	1 % SDS 1,92 M Glycin 0,25 M TRIS Lagerung bei RT	10 g/L 144 g/L 30 g/L
SDS Laufpuffer (1x)	10 x SDS Laufpuffer auf 1L mit ddH_2O auffüllen Lagerung bei RT	100 mL/L

5.6.1.2 System nach Schägger:

Die Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow [220,221] stellt eine Variante der oben beschriebenen SDS-PAGE dar. Sie zeichnet sich gegenüber dem allgemein gebräuchlicheren Gelsystem nach Laemmli durch ein größeres Auflösungsvermögen in kleineren Proteinbereich aus. Dieses System wurde zur groben Abschätzung der Konzentration der α1-I-Domänen-Lösung verwendet.

Kommerziell erworbene *Novex*®-Fertiggele (1,0 mm x 12 Kammern) mit einem kontinuierlichem Gradienten von 10-20 % Tricin® der Firma *Invitrogen* (Karlsruhe, D) wurden nach Herstellerangaben in einer geeigneten Gelkammer mit 1 x *NuPAGE*® *MOPS* SDS-Laufpuffer und 1 x *NuPAGE*® Probenpuffer durchgeführt, um die Konzentration der α1-I-Domänen-Lösung grob abschätzen zu können. Anhand der bekannten Menge z.B. der Carboanhydrase

im aufgetragenen Standardproteinmarker (0,9 µg/10 µL) konnten Rückschlüsse auf die vorhandene Konzentration des Proteins in der Lösung durch eine grobe Abschätzung der aufgetragenen unterschiedlichen bekannten Verdünnungen gezogen werden.

5.6.2 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Coomassie Färbung

Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie® *Brillant Blau* Färbelösung visualisiert. Dazu wurden die Polyacrylamidgele nach Beendigung der Elektrophorese für mindestens 30 min bei RT unter leichtem Schütteln in der Färbelösung (0,01 % [w/v] *Serva Blau R-250* bzw. *-G-250*, 40 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Essigsäure) inkubiert. Dann wurde das Gel mit dH_2O gespült und anschließend so lange in Entfärberlösung (40 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Essigsäure) gelegt, bis eine vollständige Entfärbung des Hintergrundes erfolgt war. Beschleunigt konnte dieser Prozess durch Zugabe eines Einmalpapiertuches werden. Die Gele wurden nach der Entfärbung erneut mit dH_2O gespült und zur Dokumentation im Durchlicht fotografiert oder eingescannt (*Agfa Snapscan 600* Flachbett Scanner; *Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG*, Köln, D; *Epson*, *Epson Expression 1680 Pro*, Meerbusch, D). Für eine Archivierung wurden die Gele für mindestens 1 h mit 10 % [v/v] Ethanol und 5 % [v/v] Glycerin inkubiert, anschließend zwischen zwei Zellophanblättern 2 d im Plexiglasrahmen an der Luft getrocknet und bei RT aufbewahrt.

5.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford)

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden nach Bradford mit Bradford-Lösung der Firma *BioRad Laboratories* (München, D) nach Herstellerangaben durchgeführt.[189]

Bei der Bindung von Coomassie® *Brilliant Blau G-250* und *-R-250* (*Serva*, Heidelberg, D) an Proteine (an die Arginyl-Reste) verschiebt sich das Absorptionsmaximum bathochrom von 465 nm (freier Farbstoff) nach 595 nm (peptidgebunden als Farbstoff-Protein-Komplex). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration in einer Lösung. Die Reaktion läuft in saurem Milieu ab. Stark basische Lösungen und Seifen wie Triton X-100 oder SDS stören die Messung.

Für den Zusammenhang von Proteinkonzentrationen und Extinktion bei 595 nm in der vermessenen Lösung gilt hier folgende Gleichung:

Gleichung 5: $[c] = (\Delta E+0{,}044)/0{,}0855$ in [µg/mL]

[c] = Proteinkonzentration, ΔE = Extinktion

Die zu bestimmende Proteinlösung wurde mit Puffer (z.B. PBS) auf ein Volumen von 100 µL gebracht und mit 900 µL der verdünnten Bradford-Lösung gemischt. Nach 15 min wurde die Extinktion der Lösung in Plastikküvetten der Firma *Hellma* (Müllheim, D) mit einer Schichtdicke von 10 mm bei RT und der Wellenlänge λ = 595 nm in einem Spektrometer *Ultrospec™ 2100 pro* von *Amersham Bioscience* (Freiburg, D) gemessen. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wurden Doppelbestimmungen jeder Konzentration aufgenommen. Eine Eichkurve wurde unter Verwendung von BSA-Verdünnungen so gewählt, dass die gemessene Absorption bekannter Konzentrationen zwischen 0,1-1,0 Absorptionseinheiten lag, um im linearen Bereich zu bleiben. Die Extinktionsdifferenz wurde berechnet und der Proteingehalt der Probe mit Hilfe dieser Eichgeraden ermittelt.

5.7 Methoden für Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS)

5.7.1 Allgemeine Vorbereitungen

5.7.1.1 Medien für SPS und SPFS Messungen

Integrin Bindungspuffer (IBP):	50 mM TRIS	6,06 g/L
	150 mM NaCl	8,76 g/L
	2 mM $MgCl_2$	0,406 g/L
	pH 7,4 einstellen, filtrieren	
	Zugabe frischer, 1 M $MnCl_2$ Lösung (Endkonz. 1 mM)	
	Lagerung bei RT	
1 M $MnCl_2 \cdot 2H_2O$	$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	8,094 g/50 mL
	filtrieren	
	Lagerung bei RT	
IBP ohne $MnCl_2$ (IBPoMn):	50 mM TRIS	6,06 g/L
	150 mM NaCl	8,76 g/L
	2 mM $MgCl_2$	0,406 g/L
	pH 7,4 einstellen, filtrieren	
	Lagerung bei RT	

IBP ohne zweiwertige Kationen ($IBPo^{2+}$):		
	50 mM TRIS	6,06 g/L
	150 mM NaCl	8,76 g/L
	auf pH 7,4 einstellen	
	filtrieren; Lagerung bei RT	
5 M GUA	Guanidinium Hydrochlorid	804,39 mg/mL
	pH 5,1	
	Lagerung bei RT	
0,5 M EDTA in $IBPo^{2+}$:	0,5 M EDTA	186,12 g/L
	mit $IBPo^{2+}$ auf 1L auffüllen	
	pH 7,4 einstellen	
	Lagerung bei RT	
PBS (ohne Ca^{2+}, Mg^{2+})	kommerziell erworben bei *PAA* (Pasching, A)	
PBS (mit Ca^{2+}, Mg^{2+})	kommerziell erworben bei *PAA* (Pasching, A)	
0,4 M EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid	
	Hydrochlorid	76,68 mg/mL
	sterilfiltrieren	
	Lagerung bei -20 °C	
0,1 M HOSu	N-Hydroxysuccinimid	11,5 mg/mL
	sterilfiltrieren	
	Lagerung bei -20 °C	
1 M EA*HCl	Ethanolamin Hydrochlorid	97,54 mg/mL
	sterilfiltrieren	
	Lagerung bei -20 °C	
DMPE	Dimyristoyl-L-α-phosphatidylethanolamin	
		10 mg/mL
	in 0,1 % [w/v] Triton X-100	
	Lagerung bei -20 °C	
PC	L-α-Phosphatidylcholin	10 mg/mL
	aus der Sojabohne, Typ III-S	
	10 % [w/v] in Chloroform	
	Lagerung bei -20 °C	
P19	Cys-Lamininpeptid	0,01 mg/mL
	α-Kette, 2091-2108, CSRARKQAASIKVAVSADR	
	Lagerung bei -20 °C	
Goldätz-Lösung (10x)	Iod	2g/100mL
	Kaliumiodid	8g/100mL
	Lagerung bei RT	

Goldätz-Lösung (1x)	Goldätz-Lösung (10x)	10 mL
	H_2O	90 mL
	Lagerung bei RT	

5.7.1.2 Reinigung der Glasträger, Glasprisma und der Küvette

Durch vorsichtiges Abreiben mit 2 %iger [v/v] Hellmanex-Detergenslösung (*Hellma*, Müllheim, D) wurden die hochbrechenden LaSFN9-Glasträger der Firma *Berliner Glas* (Berlin, D) gereinigt und mit ddH_2O nachgespült. Zum Trocknen wurde das Glas mit Ethanol in p.a. Qualität benetzt und der Alkohol mit gefilterter Druckluft evaporiert. Nach diesem Protokoll wurden auch das hochbrechende Glasprisma (*Berliner Glas*, Berlin, D) und die Küvette (Eigenherstellung, MPI für Biochemie, Martinsried, mit *Sylgard® 184*, *Sasco Semiconductor*, Putzbrunn, D) gereinigt. Für die Reproduzierbarkeit der Messungen ist die Reinheit der benutzten Glasgeräte von entscheidender Bedeutung, da Unreinheiten zu Artefakten in der Fluoreszenzdetektion führen können.

Nach der Messung wurden die relativ teuren LaSFN9-Glasträger zur Wiederverwendung von der Goldschicht befreit. Dafür wurden die goldbeschichteten Glasträger in einer 2 % [w/v] Iod/ 8 % [w/v] Kaliumiodid-Lösung (Goldätz-Lösung) für 10 min im Ultraschallbad eingelegt, die Glasmaterialien mit ddH_2O gespült und, wie oben beschrieben, gereinigt.

5.7.1.3 Aufdampfen eines Goldfilms auf Glasträger

Gereinigte LaSFN9-Glasträger wurden mit Hilfe einer Aufdampfanlage (*Pfeiffer Vacuum C250*, Wessel, D) mit Gold (4N Granulat, 0,2-0,7 mm, *Umicore Materials*, Balzers, FL) 480 nm dick beschichtet. Das Gold wurde hierfür mittels Elektronenbeschuß bei $2.5 \cdot 10^{-6}$ mbar verdampft.

5.7.2 Vorgehensweise für Experimente am Biacore2000 Gerät

Zur Untersuchung der Kollagen-Integrin Spezifität sowie zur Bestimmung des K_D-Wertes als Maß für die Affinität der Interaktion wurden Bindungsstudien an einem *Biacore® 2000* Messgerät (*BIACORE*, Freiburg, D) mit der Steuerungssoftware *BIACORE 2000 Control Software* (Version *3.2*) durchgeführt. Als Bindungsoberfläche diente ein *CM5*-Sensorchip der Firma

BIACORE (Freiburg, D). Die Auswertung der Bindungskinetiken erfolgte mit der *BIA-evaluation Software* (Version *4.1*).

Dazu wurden die terminalen Carboxygruppen der carboxymethylierten Dextranmatix des Chips mit einer Mischung aus 200 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'ethyl-carbodiimid Hydrochlorid in MQ-H_2O (EDC, *Fluka*, Neu-Ulm, D) und 50 mM N-Hydroxysuccinimid in MQ-H_2O (HOSu, *Fluka*, Neu-Ulm, D) aktiviert, an welche das synthetische Kollagenpeptid über Serin gekoppelt wurde. Zwei Spuren des Chips wurden bei einer Flussrate von 10 µL/min mit à 100 µL einer 3 µM Kollagenpeptid/PBS Lösung beladen. Ungekuppelte aktivierte Matrixreste wurden mit 1 M Ethanolamin Hydrochlorid Lösung (EA, *Sigma*, Deisenhofen, D) blockiert. Um unspezifisch gebundenes Kollagenpeptid von der Oberfläche zu entfernen, wurde mit 5 µL 5 M Guanidinium Hydrochlorid Lösung (GUA) bei einer Flussrate von 20 µL/min gespült.

Bindungskinetiken wurden bei 20 °C mit einer Injektionszeit von 35 min und einer Flussrate von 30 µL/min durchgeführt. Die verwendeten α1-I-Domäne-Konzentrationen betrugen 7,5 - 120 µM. Zur Regenerierung wurde 5 M GUA verwendet.

5.7.3 Vorgehensweise für Experimente am Eigenbau-SPRS-Gerät

5.7.3.1 Verwendeter Messaufbau

Das verwendete Plasmonenspektrometer ist in Abb. 23 schematisch dargestellt. Oberflächenplasmonen wurden von einem HeNe-Laser (*JDS Uniphase corp.*, San Jose, CA, USA) mit der Wellenlänge $\lambda = 633$ nm angeregt. Der Lichtstrahl durchlief dabei zwei *Glan-Thompson* Polarisatoren (*Berliner Glas*, Berlin, D), wovon der erste die Intensität des Laserstrahls regelt, während der zweite das Licht p-polarisiert. Der Lichtstrahl traf dann unter einem Winkel θ_i auf das Glasprisma, welches auf einem Zweikreis-Goniometer (*Huber Diffraktionstechnik GmbH&Co. KG*, Rimsting, D) montiert ist. Der Einfallswinkel θ_i konnte über das Goniometer eingestellt werden. Der goldbeschichtete LaSFN9 Glasträger (*Berliner Glas*, Berlin, D) wurde mittels Immersionsöl (n_{20} = 1.680, *Plano GmbH*, Wetzlar, D) optisch an das Prisma gekoppelt. Die Küvette mit integriertem Zu- und Ablauf (Eigenherstellung mit *Sylgard®184*, *Sasco Semiconductor*, Putzbrunn, D), in der sich die Probenpräparationen befinden, wurde durch den Goldfilm auf dem hochbrechenden Glasträger sowie einem „normalen" Objekt-

träger begrenzt (siehe Abb. 24). Zur Detektion des reflektierten Strahls wurde das Licht durch eine Bikonvexlinse der Brennweite f = 100 nm auf eine Si-Photodiode fokussiert. Um den Einfluss von Hintergrundlicht zu vermeiden, wurde die Intensität des Laserstrahls zunächst mit Hilfe einer Schwingblende mit der Frequenz $\upsilon = 1193$ Hz moduliert. Das resultierende, modulierte Detektorsignal wurde mit einem Lock-In-Verstärker (*EG&G Instruments 5210/Princeton Applied Research,* Trenton, USA) gemessen und anschließend von einem Computer aufgezeichnet. Die aus der Messzelle emittierte Fluoreszenz wurde von einem Interferenzfilter (LOT 670 nm, 10 nm FWHM) (*LOT-Oriel,* Darmstadt, D) selektiert, mit einem zugeschaltetem Photomultiplier (*Hamamatsu*, *Perkin Elmer Optoelectronics*, Wiesbaden, D) gemessen und gleichzeitig mit dem reflektierten Licht aufgezeichnet.

Der gleichmäßige Lösungsfluß (Einstellung: 0,500) von Puffer und Probenpräparationen über die (Gold-) Oberfläche wurde durch eine Pumpe (*Ismatec SA*, Wertheim-Mondfeld, D) gesteuert, die über einen Silikonschlauch (Innendurchmesser $\varnothing = 0{,}5$ mm, *Ismatec*, Wertheim-Mondfeld, D) mit der Küvette und den Proben- und Pufferlösungsvorlagen verbunden wurde.

Der experimentelle Aufbau wird durch einem Computer mit der Software WASPLAS (*ResTec*, Framersheim, D) gesteuert, mit der Goniometer, Shutter, Reflektivität- und Fluoreszenzdetektion angesteuert werden kann.

5.7.3.2 Aufbau einer peptidunterstützten Monolipidschicht

Eine artifizielle peptidunterstützte Monolipidschicht wurde bei RT auf einem gold-beschichteten Glasträger generiert.[4,81,124,196] Der Vorgang des Aufbaus wurde durch die Zunahme der Schichtdicke mit der Methode der Plasmonenspektroskopie detektiert (siehe Kapitel 3.6.3).

Zum Aufbau einer peptidunterstützten Monolipidschicht wurden 0.01 mg/mL in MQ-H_2O gelöstes Lamininpeptid CSRARKQAASIKVAVSADR (Derivat der α-Laminin-Untereinheit, *C6171*, *Sigma*, Deisenhofen, D) über Nacht an die Goldoberfläche chemisorbiert. Ungebundenes Peptid wurde mit MQ-H_2O abgespült. Die terminale Carboxygruppe des Lamininpeptids wurde anschließend mit einer Mischung aus 200 mM N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'ethyl-carbodiimid Hydrochlorid in MQ-H_2O (EDC, *Fluka*, Neu-Ulm, D) und

50 mM N-Hydroxysuccinimid in MQ-H_2O (HOSu, *Fluka*, Neu-Ulm, D) durch Inkubation von 10 min aktiviert. An diese aktivierte Peptidschicht wurde eine Lipidschicht aus 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DMPE, 10 mg/mL gelöst in 0.1 % [w/v] Triton X-100, *Sigma*, Deisenhofen, D) durch Inkubation von 45 min angekoppelt und so eine Thiopeptid-Monolipid-Schicht erhalten. Ungebundenes DMPE wurde mit Integrin Bindungspuffer (IBP) abgespült.

5.7.3.3 Vesikelpräparation mit der Extruder Methode

Die Homogenität der erzeugten Vesikel wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (siehe Punkt 5.2.10) überprüft.

5.7.3.3.1 Methode 1: Vesikel ohne inkorporierte Proteinmoleküle

50 µL einer 1 mg/mL Phosphatidylcholin-Lösung (aus Sojabohnen, 10 % in $CHCl_3$, *Fluka*, Neu-Ulm, D) wurden in einen 10 mL-Spitzkolben überführt. Durch Evaporation des Lösemittels mit Helium oder Stickstoff wurde ein dünner Phospholipidfilm erzeugt, zu dem 5 mL PBS gegeben wurden. Nach kräftigem Schwenken der Lösung wurden davon 500 µL 30 x durch eine Polycarbonatmembran (Durchmesser Ø = 19 mm, *Avestin*, Ottawa, CAN) mit Porengrößen von 50 - 100 nm extrudiert (Vesikel-Extruder, *LiposoFast*, *Avestin*, Ottawa, CAN) und sofort verwendet.

5.7.3.3.2 Methode 2: Integrin-Vesikelpräparation

100 µL einer 1 mg/mL Phosphatidylcholin-Lösung (aus Sojabohnen, 10 % in $CHCl_3$, *Fluka*, Neu-Ulm, D) wurden in einen 10 mL-Spitzkolben überführt. Durch Evaporation des Lösemittels mit Helium oder Stickstoff wurde ein dünner Phospholipidfilm erzeugt, zu dem gleichzeitig 5 mL IBP Puffer und 25 µg humanes α1β1-Integrin (*VLA-1*, kommerziell erworben bei *Chemicon International* (Temecula, CA, USA) in Puffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7,5; 1,0 mM $MgCl_2$ mit 0,1 % Triton X-100) pipettiert wurden. Nach vorsichtigem Schwenken der Lösung wurden davon 500 µL fünfmal vorsichtig durch eine Polycarbonatmembran (Durchmesser Ø = 19 mm, *Avestin*, Ottawa, CAN) mit einer Porengröße von 100 nm extrudiert (Vesikel-Extruder, *LiposoFast*, *Avestin*, Ottawa, CAN) und sofort verwendet.

5.7.3.3.3 Methode 3: Kollagen-Vesikelpräparation

Homotrimeres Cystin-verknüpftes Kollagenpeptid **T2** wurde in MeOH als 100 µM Stammlösung angesetzt. Von dieser wurden 681 µL in einen 10 mL-Spitzkolben überführt und das Lösemittel durch Evaporation mit Helium oder Stickstoff bis zur völligen Trockenheit abgedampft. Dann wurden 50 µL einer 1 mg/mL Phosphatidylcholin-Lösung (aus Sojabohnen, 10 % in $CHCl_3$, *Fluka*, Neu-Ulm, D) zugegeben, das Gefäß geschüttelt und das Lösemittel ebenfalls evaporiert. Nach Zugabe von 5 mL PBS Puffer wurde mehrfach kräftig geschüttelt, bevor 500 µL dieser Lösung entnommen wurden und ca. 40mal durch eine Polycarbonatmembran (Durchmesser Ø = 19 mm, *Avestin*, Ottawa, CAN) mit einer Porengröße von 50 nm extrudiert wurden (Vesikel-Extruder, *LiposoFast*, *Avestin*, Ottawa, CAN) und sofort verwendet wurden.

5.7.3.4 Aufbau der peptidunterstützten artifiziellen Membran durch Vesikelspreitung

Unilamellaren Vesikel wurden unmittelbar nach dem Extrusionsprozess (siehe oben) 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 [6,81] in der je nach verwendeten Vesikel entweder keine oder Integrin- oder Kollagenpeptid-Moleküle inkorporiert sind, wenn diese zuvor in die Vesikel eingebaut wurden. Nicht gebundene Vesikel wurden durch Spülen mit IBP entfernt.

5.7.3.5 Durchgeführte Messungen an artifiziellen Membranen

Die an artifiziellen Membranen durchgeführten Messungen wurden mit einem Mindestvolumen von 500 µL Flüssigkeit im Vorratsbehälter (1,5 mL Eppendorf Gefäß) durchgeführt.

5.7.3.5.1 Bindungsstudie

Für die Bindungsstudien wurde zunächst der Fluoreszenzhintergrund der artifiziellen Membran mittels SPFS gemessen. Die nachfolgenden Bindungsmessungen erfolgen mit jeweils 50 µmol des gekoppelten *Cy5*-Liganden.

Die Ligandenbindung an die inkorporierten Moleküle in der Membran wurde unter Lichtausschluß während einer Inkubationszeit von 60 min bei RT. Anschließend wurde ungebundener

und unspezifisch gebundener Ligand durch Spülen mit Bindungspuffer entfernt. Danach erfolgt die eigentliche SPFS-Messung.

5.7.3.5.2 Ablösen der Liganden

Die artifizielle funktionalisierte Membran wurde durch Ablösen der gebundenen Liganden wieder verwendet, um einen besseren Vergleich der Bindungsstudien durchführen zu können. Hierfür wurde eine Lösung aus EDTA verwendet, welche die zur Integrinbindung essentiellen Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen komplexiert.[9,74] Der an die Membran gebundene Ligand wurde durch 0,5 M EDTA Lösung, pH 7,2, abgelöst, indem die Küvette mit 500 µL der Lösung gespült wurde. Vor erneuter Ligandenbindung wurde das EDTA durch Spülen mit IBP entfernt

5.8 Zellbiologische Methoden

In der Anwendung aller zellbiologischen Methoden wurde auf Sterilität geachtet. Bei der Handhabung der kultivierten Zellen wurde nach dem Lehrbuch von T. Lindl [222] gearbeitet.
Es wurden *P19* Mäuse-Teratokarzinom-Zellen (*Teratocarcinoma*, *Mus musculus, American Type Culture Collection ATCC # CRL-1825,* Rockville, Maryland, USA) verwendet. Die Zellen wurden bis zur Verwendung in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium:	70 % [v/v] RPMI 1640 mit 25 mM Hepes und L-Glutamin 20 % [v/v] FCS (Gibco) 10 % [v/v] DMSO 0,98 % [v/v] β-Mercaptoethanol

5.8.1 Medien für Säugerzellkultur

Alle Komponenten wurden - wenn nicht anders angegeben - von *Gibco* (Karlsruhe, D) und *PAA Laboratories GmbH* (Pasching, A) bezogen und sterilfiltriert geliefert.
Wurden die Zellen direkt für Zelladhäsionsexperimente auf artifiziellen Membranen verwendet, wurden die Seren im Medium weggelassen, da in den Seren viele Proteine enthalten sind, die das Ergebnis der Adhäsion auf künstlichen Oberflächen verfälschen könnten.

α-Mem Medium:	500 ml *MEM Alpha* Medium (PAA) 2,5% *Foetal Calf* Serum 7,5% *Newborn Calf* Serum 10 *ml MEM Amino Acids* (50x) (*PAA*) 5 ml *MEM Vitamins Solution* (100x) (*PAA*)

5.8.2 Kultivierung von P19-Zellen

P19 murine Teratokarzinom-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in *α-Mem* Medium unter Zugabe von Aminosäuren, Vitaminen, Neugeborenen-Rinderserumalbumin und fötalem Rinderserum in einem Inkubator von der Firma *Heraeus* (Hanau, D) bei 37 °C, 5 % [v/v] CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 % kultiviert. Zur Erhaltung der Zellen war es erforderlich, die adhärenten Zellen nach 2-3 Tagen durch Trypsinierung zu ernten, da die Zelllinie ihre Prolieferationsrate bis zum Wachstumsstopp senkt, sobald die ihr zur Verfügung stehende Kulturflasche eingenommen ist. Hierfür wurden die Zellen zuerst mit 37 °C warmen PBS (1 x) ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} (*Gibco*, *Invitrogen*, Karlsruhe, D bzw. *PAA*, Pasching, A) gewaschen, proteolytisch nach Zugabe von 1 mL/25 cm^2 Trypsin/EDTA (*Gibco*, Karlsruhe, D) vom Boden gelöst und das Trypsin nach 1 min mit der fünffachen Menge an frischem Medium inaktiviert. Nach Überführung in ein steriles *Falcon* Gefäß (*BD Bioscience*, Heidelberg, D) wurde die Zellsuspension 2 min in einer *Hettich*-Zentrifuge (Tuttlingen, D) bei 400 x g sedimentiert und der Mediumüberstand verworfen. Eine neue Kulturflasche wurde anschließend mit 1/5 der Zellen inokuliert und mit frischem, 37 °C warmen Medium versehen.

5.8.3 Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer-Zählkammer

Da bei einigen Experimenten die Anzahl der Zellen von entscheidender Bedeutung ist, und um die Experimente reproduzierbar zu machen, ist es notwendig, die Menge der eingesetzten Zellen zu kennen. Eine häufig angewandte Methode ist das Auszählen der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer (*Labor-Brand*, Gießen, D). Dazu wurde nach dem Trypsinieren und Zentrifugieren (siehe oben) das Zellsediment in einer bekannte Menge Medium resuspendiert, 10 µL dieser Suspension entnommen und zu 90 µL Trypanblau gegeben. 1/10 dieser Mischung wurde in die Zählkammer gefüllt und nach der Methode von W. Ertel die farblosen Zellen (= lebende Zellen, blaue = tote Zellen) im Auflichtmikroskop *Leitz DM IL* (*Leika*,

Wetzlar, D) im Großquadrat ausgezählt. Mit Hilfe der Anzahl der Zellen war nun eine Hochrechnung auf die Zellzahl/mL Medium in der Ausgangssuspension möglich und die gewünschte Zellzahl/mL Medium durch entsprechende Verdünnung einstellbar.

5.8.4 Zelladhäsion auf artifiziellen Membranoberflächen

Zurechtgeschnittene Objektträger (ca. 2,5 x 2,5 cm, *Menzel Gläser*, Braunschweig, D) wurden gereinigt (siehe Punkt 5.7.1) und mit Gold bedampft (siehe Punkt 5.7.1). Um sicherzustellen, dass steril gearbeitet wird, wurde ab hier unter einer Sterilbank (*HeraSafe*, *Heraeus*, Hanau, D) gearbeitet. Daher wurden die Glasträger mit der Goldschicht nach oben in beschichtete Petrischalen (Durchmesser: 5 cm, *Falcon*, *BD Bioscience*, Heidelberg, D) gelegt und eine halbe Stunde mit dem UV-Licht der Sterilbank bestrahlt.

Auf die Goldoberfläche wurden mittig 0,1 mg/mL P19-Laminin-Lösung (Derivat der α-Laminin-Untereinheit, *Sigma*, Deisenhofen, D; siehe Punkt 5.7.1) mit einer Pipette als Tropfen aufgebracht. Nach 20 min. wurde der Tropfen mittels 200 µL-Einmalpipettenspitze (*Gilson*, Bad Camberg, D), die mit einer Pumpe (*Dürr Technik*, Bietigheim, D) verknüpft war, vorsichtig abgesaugt und dreimal mit MQ-H_2O gespült. Die artifizielle Membran wurde weiter, wie unter Punkt 5.7.3 beschrieben, aufgebaut, allerdings unter Verwendung dieser manuellen Variante, d.h. mit „Pipetten- und Tropfentechnik“. Als Negativkontrolle wurden auch reine Lipidmembrane (ohne inkorporiertes Kollagen) aufgebaut. Sobald die Membran aufgebaut war, wurden eine bekannte Anzahl von Zellen ($4 \cdot 10^6$ Zellen in 5 mL Medium) auf die Membran aufgebracht und sofort in den Inkubator gestellt. In regelmäßigen Abständen wurde die Adhäsion unter einem Inversmikroskop (*Carl Zeiss*, *Axiovert 100*, Aalen, D) beobachtet und mittels *CCD* Kamera (*Digital Camera*, *Hamamatsu*, Wiesbaden, D), einen Kontrollgerät (*Camera Controller*, *Hamamatsu*, Wiesbaden, D) und der Software *Simple PCI Imaging System* (*Compix, Inc., Imaging Systems*, PA, USA; Version *5.2.0.2404*) dokumentiert.

5.8.5 Zelladhäsion auf mikrostrukturierten Oberflächen

Der artifizielle Membranaufbau auf goldbeschichteten Objektträger wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden zum Aufbringen der P19 Laminin-Lösung (siehe Punkt

5.7.3) die hergestellten Mikrostempel (siehe Punkt 5.2.12) verwendet. Dazu wurden die Stempel in 0,1 mg/mL P19-Laminin-Lösung getaucht und das Lösemittel abgedampft. Dann wurde mit leichtem Druck das Laminin mit der jeweiligen Mikrostrukturierung des verwendeten Stempels auf die Goldschicht aufgebracht und der artifizielle Membranaufbau, wie oben beschrieben ebenfalls mit der „Pipetten- und Tropfentechnik“, durchgeführt. Die Zugabe der Zellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen in 10 mL Medium) erfolgte ebenfalls sofort nach vollständigem Membranaufbau und die Adhäsion wurde unter den gleichen Bedingungen wie oben verfolgt und dokumentiert.

5.8.6 Bindungsexperiment: Erkennen P19-Zellen Cy3-markiertes Kollagentrimer?

Eine bekannte Anzahl von *P19*-Zellen ($5 \cdot 10^4$ Zellen in 1,5 mL) wurde in beschichteten Petrischalen (Durchmesser: 5 cm, *Falcon*, *BD Bioscience*, Heidelberg, D) ausgesät und in den Inkubator gestellt. Nach 16 h wurden unterschiedliche Konzentrationen an Cy3-markiertem Kollagentrimer **T1-Cy3** (siehe Punkt 5.2.8) zu den verschiedenen Petrischalen gegeben und wieder in den Inkubator gegeben. Nach bestimmten Zeitabständen wurde die Adhäsion unter einem Inversmikroskop (*Carl Zeiss*, *Axiovert 100*, Aalen, D) beobachtet und mittels *CCD* Kamera (*Digital Camera*, *Hamamatsu*, Wiesbaden, D), einem Kontrollgerät (*Camera Controller*, *Hamamatsu*, Wiesbaden, D) und der Software *Simple PCI Imaging System* (*Compix, Inc., Imaging Systems*, PA, USA; Version *5.2.0.2404*) dokumentiert.

5.9 Datenanalyse

Zur digitalen Analyse und Auswertung von Daten wurden, wenn nicht bei den entsprechenden Geräten bereits angegeben, folgende Programme benutzt:
Adobe Acrobat 6.0 und *8.0 Professional*, *Adobe Photoshop 6*. *CorelDraw 11*, *CorelPhotoPaint 11*, *DNAssist 2.0*, *Endnote 7*, *Excel XP*, *Isis Draw 2.4*, *Nero Burning ROM*, *Origin 6.1*, *pDraw 32, Peptide Companion, PowerPoint XP*, *WasPlas 2.19*, *WaspView 3.34*, *Winspall 2*, *Word XP*.

6 Literaturverzeichnis

1. von Heijne, G. A Day in the Life of Dr K. Or How I Learned to Stop Worrying and Love Lysozyme: A Tragedy in Six Acts. *Journal of Molecular Biology* **293**, 367-379 (1999).
2. Mould, A. P. & Humphries, M. J. Cell Biology: Adhesion Articulated. *Nature* **432**, 27-28 (2004).
3. Sevin-Landais, A. et al. Functional Immobilisation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor in Tethered Lipid Membranes. *Biophysical Chemistry* **85**, 141-152 (2000).
4. Schmidt, E.-K. et al. Incorporation of the Acetylcholine Receptor Dimer from Torpedo Californica in a Peptide Supported Lipid Membrane Investigated by Surface Plasmon and Fluorescence Spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **13**, 585-591 (1998).
5. Naumann, R. et al. The Peptide-Tethered Lipid Membrane as a Biomimetic System to Incorporate Cytochrome C Oxidase in a Functionally Active Form. *Biosensors and Bioelectronics* **14**, 651-662 (1999).
6. Bunjes, N. et al. Thiopeptide-Supported Lipid Layers on Solid Substrates. *Langmuir* **13**, 6188-6194 (1997).
7. Naumann, R. et al. Proton Transport through a Peptide-Tethered Bilayer Lipid Membrane by the H+-Atp Synthase from Chloroplasts Measured by Impedance Spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **17**, 25-34 (2002).
8. Gumbiner, B. M. Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357 (1996).
9. Hynes, R. O. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).
10. Hynes, R. O. Integrins: A Family of Cell Surface Receptors. *Cell* **48**, 549-554 (1987).
11. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **110**, 673-687 (2002).
12. Bökel, C. & Brown, N. H. Integrins in Development: Moving on, Responding to, and Sticking to the Extracellular Matrix. *Developmental Cell* **3**, 311-321 (2002).
13. LeBaron, R. G. & Athanasiou, K. A. Extracellular Matrix Cell Adhesion Peptides: Functional Applications in Orthopedic Materials. *Tissue Engineering* **6**, 85-103 (2000).
14. Yamada, K. M. & Geiger, B. Molecular Interactions in Cell Adhesion Complexes. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 76-85 (1997).

15. Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. & Turner, C. Focal Adhesions: Transmembrane Junctions between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology* **4**, 487-525 (1988).
16. Ruoslahti, E. Rgd and Other Recognition Sequences for Integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **12**, 697-715 (1996).
17. Eble, J. A. in *Molecular Biology Intelligence Unit. Integrin-Ligand Interaction* (eds. Eble, J. A. & Kühn, K.) 1-40 (Chapman and Hall, New York, 1997).
18. Pfaff, M. in *Molecular Biology Intelligence Unit. Integrin-Ligand Interaction* (eds. Eble, J. A. & Kühn, K.) 101-122 (Chapman and Hall, New York, 1997).
19. Kadler, K. Extracellular Matrix. 1:Fibril-Forming Collagens. *Protein Profile* **1**, 519-638 (1994).
20. Brodsky, B. & Ramshaw, J. A. M. The Collagen Triple-Helix Structure. *Matrix Biology* **15**, 545-554 (1997).
21. Ackerman, M. S. et al. Sequence Dependence of the Folding of Collagen-Like Peptides. Single Amino Acids Affect the Rate of Triple-Helix Nucleation. *J. Biol. Chem.* **274**, 7668-7673 (1999).
22. Ramshaw, J. A. M., Shah, N. K. & Brodsky, B. Gly-X-Y Tripeptide Frequencies in Collagen: A Context for Host-Guest Triple-Helical Peptides. *Journal of Structural Biology* **122**, 86-91 (1998).
23. Chan, V. C., Ramshaw, J. A. M., Kirkpatrick, A., Beck, K. & Brodsky, B. Positional Preferences of Ionizable Residues in Gly-X-Y Triplets of the Collagen Triple-Helix. *J. Biol. Chem.* **272**, 31441-31446 (1997).
24. Dölz, R. & Heidemann, E. Influence of Different Tripeptides on the Stability of the Collagen Triple Helix. I. Analysis of the Collagen Sequence and Identification of Typical Tripeptides. *Biopolymers* **25**, 1069-1080 (1986).
25. Shah, N. K., Ramshaw, J. A .M., Kirkpatrick, A., Shah, C. & Brodsky, B. A Host-Guest Set of Triple-Helical Peptides - Stability of Gly-X-Y Triplets Containing Common Nonpolar Residues. *Biochemistry* **35**, 10262-10268 (1996).
26. Beck, K. & Brodsky, B. Supercoiled Protein Motifs - the Collagen Triple-Helix and the Alpha-Helical Coiled Coil. *J. Struct. Biol.* **122**, 17-29 (1998).
27. Persikov, A. V., Ramshaw, J. A .M., Kirkpatrick, A. & Brodsky, B. Amino Acid Propensities for the Collagen Triple-Helix. *Biochemistry* **39**, 14960-14967 (2000).
28. Ramachandran, G. N. Stereochemistry of Collagen. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **31**, 1-16 (1988).
29. Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B. & Berman, H. M. Crystal and Molecular Structure of a Collagen-Like Peptide at 1.9 A Resolution. *Science* **266**, 75-81 (1994).
30. Berg, R. A. & Prockop, D. J. The Thermal Transition of a Non-Hydroxylated Form of Collagen. Evidence for a Role for Hydroxyproline in Stabilizing the

Triple-Helix of Collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **52**, 115-120 (1973).
31. Berisio, R., Vitagliano, L., Mazzarella, L. & Zagari, A. Crystal Structure of the Collagen Triple Helix Model $[(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}]_3$. *Protein Sci* **11**, 262-270 (2002).
32. Burjanadze, T. V. & Kisiriya, E. L. Dependence of Thermal Stability on the Number of Hydrogen Bonds in Water-Bridged Collagen Structure. *Biopolymers* **21**, 1695-1701 (1982).
33. Cooper, A. Thermal Stability of Tropocollagens - Are Hydrogen Bonds Really Important? *Journal of Molecular Biology* **55**, 123-127 (1971).
34. Inouye, K., Sakakibara, S. & Prockop, D. J. Effects of the Stereo-Configuration of the Hydroxyl Group in 4-Hydroxyproline on the Triple-Helical Structures Formed by Homogeneous Peptides Resembling Collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **420**, 133-141 (1976).
35. Inouye, K. et al. Synthesis and Physical Properties of $(Hydroxyproline\text{-}Proline\text{-}Glycine)_{10}$: Hydroxyproline in the X-Position Decreases the Melting Temperature of the Collagen Triple Helix. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **219**, 198-203 (1982).
36. Vitagliano, L., Berisio, R., Mazzarella, L. & Zagari, A. Structural Bases of Collagen Stabilization Induced by Proline Hydroxylation. *Biopolymers* **58**, 459-464 (2001).
37. Babu, I. R. & Ganesh, K. N. Enhanced Triple Helix Stability of Collagen Peptides with 4R-Aminoprolyl (Amp) Residues: Relative Roles of Electrostatic and Hydrogen Bonding Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2079-2080 (2001).
38. DeRider, M. L. et al. Collagen Stability: Insights from NMR Spectroscopic and Hybrid Density Functional Computational Investigations of the Effect of Electronegative Substituents on Prolyl Ring Conformations. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2497-2505 (2002).
39. Holmgren, S. K., Bretscher, L. E., Taylor, K. M. & Raines, R. T. A Hyperstable Collagen Mimic. *Chemistry & Biology* **6**, 63-70 (1999).
40. Malkar, N. B., Lauer-Fields, J. L., Borgia, J. A. & Fields, G. B. Modulation of Triple-Helical Stability and Subsequent Melanoma Cellular Responses by Single-Site Substitution of Fluoroproline Derivatives. *Biochemistry* **41**, 6054-6064 (2002).
41. Piez, K. A. & Sherman, M. R. Characterization of the Product Formed by Renaturation of Alpha1-Cb2, a Small Peptide from Collagen. *Biochemistry* **9**, 4129-4140 (1970).
42. Saygin, O., Heidemann, E. & Klump, H. The Triple Helix-Coil Transition of Cyanogen-Bromide Peptides of the Alpha 1-Chain of the Calf-Skin Collagen. *Biopolymers* **17**, 511-522 (1978).

43. Highberger, J. H., Corbett, C. & Gross, J. Isolation and Characterization of a Peptide Containing the Site of Cleavage of the Chick Skin Collagen Alpha1 I Chain by Animal Collagenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **89**, 202-208 (1979).
44. Rossi, A. et al. Type I Collagen Cnbr Peptides: Species and Behavior in Solution. *Biochemistry* **35**, 6048-6057 (1996).
45. Rossi, A., Zanaboni, G., Cetta, G. & Tenni, R. Stability of Type I Collagen Cnbr Peptide Trimers. *Journal of Molecular Biology* **269**, 488-493 (1997).
46. Bhatnagar, R. S. & Rapaka, R. S. Polypeptide Models of Collagen: Properties of $(Pro\text{-}Pro\text{-}Ala)_n$. *Biopolymers* **14**, 597-603 (1975).
47. Roth, W. , Heppenheimer, K. & Heidemann, E. R. Die Struktur kollagenähnlicher Homo- und Heteropolytripeptide, 4. Polytripeptide durch repetitive Peptidsynthese und Verbrückung von Oligopeptiden. *Die Makromolekulare Chemie* **180**, 905-917 (1979).
48. Thakur, S., Vadolas, D., Germann, H.-P. & Heidemann, E. Influence of Different Tripeptides on the Stability of the Collagen Triple Helix. 2. An Experimental Approach with Appropriate Variations of a Trimer Model Oligotripeptide. *Biopolymers* **25**, 1081-1086 (1986).
49. Germann, H.-P. & Heidemann, E. A Synthetic Model of Collagen: An Experimental Investigation of the Triple-Helix Stability. *Biopolymers* **27**, 157-163 (1988).
50. Miles, A. J., Skubitz, A. P., Furcht, L. T. & Fields, G. B. Promotion of Cell Adhesion by Single-Stranded and Triple-Helical Peptide Models of Basement Membrane Collagen Alpha 1(IV)531-543. Evidence for Conformationally Dependent and Conformationally Independent Type IV Collagen Cell Adhesion Sites. *J. Biol. Chem.* **269**, 30939-30945 (1994).
51. Rao, G. H., Fields, C. G., White, J. G. & Fields, G. B. Promotion of Human Platelet Adhesion and Aggregation by a Synthetic, Triple-Helical "Mini-Collagen". *J. Biol. Chem.* **269**, 13899-13903 (1994).
52. Yu, Y.-C., Berndt, P., Tirrell, M. & Fields, G. B. Self-Assembling Amphiphiles for Construction of Protein Molecular Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12515-12520 (1996).
53. Feng, Y., Melacini, G. , Taulane, J. P. & Goodman, M. Collagen-Based Structures Containing the Peptoid Residue N-Isobutylglycine (Nleu): Synthesis and Biophysical Studies of Gly-Pro-Nleu Sequences by Circular Dichroism, Ultraviolet Absorbance, and Optical Rotation. *Biopolymers* **39**, 859-872 (1996).
54. Feng, Y., Melacini, G., Taulane, J. P. & Goodman, M. Acetyl-Terminated and Template-Assembled Collagen-Based Polypeptides Composed of Gly-Pro-Hyp Sequences. 2. Synthesis and Conformational Analysis by Circular Dichroism, Ultraviolet Absorbance, and Optical Rotation. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10351-10358 (1996).

55. Bächinger, H.-P. & Davis, J. M. Sequence Specific Thermal Stability of the Collagen Triple Helix. *International Journal of Biological Macromolecules* **13**, 152-156 (1991).
56. Bächinger, H.-P., Morris, N. P. & Davis, J. M. Thermal Stability and Folding of the Collagen Triple Helix and the Effects of Mutations in Osteogenesis Imperfecta on the Triple Helix of Type I Collagen. *American Journal of Medical Genetics* **45**, 152-162 (1993).
57. Sakakibara, S., Kishida, Y., Kikuchi, Y., Sakai, R. & Kakiuchi, K. Synthesis of Poly-(L-Prolyl-L-Prolylglycyl) of Defined Molecular Weights. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **41**, 1273-1280 (1968).
58. Sakakibara, S. et al. Synthesis of $(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_n$ of Defined Molecular Weights Evidence for the Stabilization of Collagen Triple Helix by Hydroxypyroline. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **303**, 198-202 (1973).
59. Fields, G. B. & Prockop, D. J. Perspectives on the Synthesis and Application of Triple-Helical, Collagen-Model Peptides. *Peptide Science* **40**, 345-357 (1996).
60. Engel, J. & Prockop, D. J. The Zipper-Like Folding of Collagen Triple Helices and the Effect of Mutations That Disrupt the Zipper. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 137-152 (1991).
61. Bächinger, H. P., Bruckner, P., Timpl, R. & Engel, J. The Role of Cis-Trans Isomerization of Peptide Bonds in the Coil Triple Helix Conversion of Collagen. *Eur. J. Biochem.* **90**, 605-613 (1978).
62. Bächinger, H. P., Bruckner, P., Timpl, R., Prockop, D. J. & Engel, J. Folding Mechanism of the Triple Helix in Type-IIIi Collagen and Type-III pN-Collagen. Role of Disulfide Bridges and Peptide Bond Isomerization. *Eur. J. Biochem.* **106**, 619-632 (1980).
63. Bruckner, P., Bächinger, H. P., Timpl, R. & Engel, J. Three Conformationally Distinct Domains in the Amino Terminal Segment of Type III Procollagen and Its Rapid Tripel Helix-Coil Transition. *Eur. J. Biochem.* **90**, 595-603 (1978).
64. Fields, C. G., Lovdahl, C. M., Miles, A. J., Matthias Hageini, V. L. & Fields, G. B. Solid-Phase Synthesis and Stability of Triple-Helical Peptides Incorporating Native Collagen Sequences. *Biopolymers* **33**, 1695-1707 (1993).
65. Fields, C. G., Mickelson, D. J., Drake, S. L., McCarthy, J. B. & Fields, G. B. Melanoma Cell Adhesion and Spreading Activities of a Synthetic 124- Residue Triple-Helical "Mini-Collagen". *J. Biol. Chem.* **268**, 14153-14160 (1993).
66. Hojo, H. et al. Synthesis and Structural Characterization of Triple-Helical Peptides Which Mimic the Ligand Binding Site of the Human Macrophage Scavenger Receptor. *Tetrahedron* **53**, 14263-14274 (1997).
67. Tanaka, T. et al. A Synthetic Model of Collagen Structure Taken from Bovine Macrophage Scavenger Receptor. *FEBS Letters* **334**, 272-276 (1993).

68. Tanaka, Y., Kazou, S. & Tanaka, T. Synthesis and Stabilization of Amino an Carboxy Terminal Constrained Collagenous Peptides. *J. Peptide Res.* **51**, 413-419 (1998).
69. Goodman, M., Feng, Y., Melacini, G. & Taulane, J. P. A Template-Induced Incipient Collagen-Like Triple-Helical Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5156-5157 (1996).
70. Melacini, G., Feng, Y. & Goodman, M. Collagen-Based Structures Containing the Peptoid Residue N-Isobutylglycine (Nleu). 6. Conformational Analysis of Gly-Pro-Nleu Sequences by 1H-NMR, CD, and Molecular Modeling. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10725-10732 (1996).
71. Ottl, J. et al. Design and Synthesis of Heterotrimeric Collagen Peptides with a Built-in Cystine-Knot Models for Collagen Catabolism by Matrix-Metalloproteases. *FEBS Letters* **398**, 31-36 (1996).
72. Frank, S. et al. Collagen Triple Helix Formation Can Be Nucleated at Either End. *J. Biol. Chem.* **278**, 7747-7750 (2003).
73. Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K. & Juliano, R. L. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins. *Pharmacol Rev* **50**, 197-264 (1998).
74. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand Binding to Integrins. *J. Biol. Chem.* **275**, 21785-21788 (2000).
75. Berman, A. E., Kozlova, N. I. & Morozevich, G. E. Integrins: Structure and Signaling. *Biochemistry (Moscow)* **V68**, 1284-1299 (2003).
76. Tamkun, J. W. et al. Structure of Integrin, a Glycoprotein Involved in the Transmembrane Linkage between Fibronectin and Actin. *Cell* **46**, 271-282 (1986).
77. Travis, J. Biotech Gets a Grip on Cell Adhesion. *Science* **260**, 906-908 (1993).
78. Albelda, S. M. & Buck, C. A. Integrins and Other Cell Adhesion Molecules. *FASEB J.* **4**, 2868-2880 (1990).
79. Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. D. New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins. *Science* **238**, 491-497 (1987).
80. Arnaout, M. A. Coming to Grips with Integrin Binding to Ligands. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 641-651 (2002).
81. Sinner, E.-K. et al. Incorporation of Integrins into Artificial Planar Lipid Membranes: Characterization by Plasmon-Enhanced Fluorescence Spectroscopy. *Analytical Biochemistry* **333**, 216-224 (2004).
82. Loftus, J. C. et al. A Beta 3 Integrin Mutation Abolishes Ligand Binding and Alters Divalent Cation-Dependent Conformation. *Science* **249**, 915-918 (1990).
83. Gailit, J. & Ruoslahti, E. Regulation of the Fibronectin Receptor Affinity by Divalent Cations. *J. Biol. Chem.* **263**, 12927-12932 (1988).

84. Kirchhofer, D., Gailit, J., Ruoslahti, E., Grzesiak, J. & Pierschbacher, M. D. Cation-Dependent Changes in the Binding Specificity of the Platelet Receptor GpIIb/IIIa. *J. Biol. Chem.* **265**, 18525-18530 (1990).
85. Kirchhofer, D., Grzesiak, J. & Pierschbacher, M. D. Calcium as a Potential Physiological Regulator of Integrin-Mediated Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* **266**, 4471-4477 (1991).
86. Humphries, M. J. Integrin Activation: The Link between Ligand Binding and Signal Transduction. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 632-640 (1996).
87. Vogel, B. E., Tarone, G., Giancotti, F. G., Gailit, J. & Ruoslahti, E. A Novel Fibronectin Receptor with an Unexpected Subunit Composition (Alpha V Beta 1). *J. Biol. Chem.* **265**, 5934-5937 (1990).
88. Koivisto, L., Heino, J., Häkkinen, L. & Larjava, H. The Size of Intracellular Beta1 Integrin Precursor Pool Regulates Maturation of Beta1-Integrin Subunit and Associated Alpha-Subunits. *Biochem. J.* **300**, 771-779 (1994).
89. Akiyama, S. K., Hasegawa, E., Hasegawa, T. & Yamada, K. M. The Interaction of Fibronectin Fragments with Fibroblastic Cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 13256-13260 (1985).
90. Erb, E.-M., Tangemann, K., Bohrmann, B., Müller, B. & Engel, J. Integrin Alpha IIb Beta 3 Reconstituted into Lipid Bilayers Is Nonclustered in Its Activated State but Clusters after Fibrinogen Binding. *Biochemistry* **36**, 7395-7402 (1997).
91. Wilcox-Adelman, S. A., Denhez, F. & Goetinck, P. F. Syndecan-4 Modulates Focal Adhesion Kinase Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 32970-32977 (2002).
92. Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J. & Liddington, R. C. Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin Alpha 2 Beta 1. *Cell* **101**, 47-56 (2000).
93. Fernandez, C., Clark, K., Burrows, L., Schofield, N. R. & Humphries, M. J. *Frontiers in Bioscience* **3**, 684-700 (1998).
94. Mould, A. P., Askari, J. A. & Humphries, M. J. Molecular Basis of Ligand Recognition by Integrin Alpha 5beta 1. I. Specificity of Ligand Binding Is Determined by Amino Acid Sequences in the Second and Third NH_2-Terminal Repeats of the Alpha Subunit. *J. Biol. Chem.* **275**, 20324-20336 (2000).
95. Corbi, A. L., Garcia-Aguilar, J. & Springer, T. A. Genomic Structure of an Integrin Alpha Subunit, the Leukocyte P150,95 Molecule. *J. Biol. Chem.* **265**, 2782-2788 (1990).
96. Humphries, M. J. & Newham, P. The Structure of Cell-Adhesion Molecules. *Trends in Cell Biology* **8**, 78-83 (1998).
97. Ignatius, M. J. et al. Molecular Cloning of the Rat Integrin Alpha 1-Subunit: A Receptor for Laminin and Collagen. *J. Cell Biol.* **111**, 709-720 (1990).

98. Michishita, M., Videm, V. & Arnaout, M. A. A Novel Divalent Cation-Binding Site in the a Domain of the Beta2 Integrin Cr3 (Cd11b/Cd18) Is Essential for Ligand Binding. *Cell* **72**, 857-867 (1993).
99. Diamond, M. S., Garcia-Aguilar, J., Bickford, J. K., Corbi, A. L. & Springer, T. A. The I Domain Is a Major Recognition Site on the Leukocyte Integrin Mac- 1 (Cd11b/Cd18) for Four Distinct Adhesion Ligands. *J. Cell Biol.* **120**, 1031-1043 (1993).
100. Lee, J.-O., Rieu, P., Arnaout, M. A. & Liddington, R. C. Crystal Structure of the a Domain from the a Subunit of Integrin Cr3 (Cd11 B/Cd18). *Cell* **80**, 631-638 (1995).
101. Cierniewska-Cieslak, A. et al. Identification and Characterization of Two Cation Binding Sites in the Integrin Beta 3 Subunit. *J. Biol. Chem.* **277**, 11126-11134 (2002).
102. Tuckwell, D. S. & Humphires, M. J. A Structure Prediction for the Ligand-Binding Region of the Integrin Beta Subunit: Evidence for the Presence of a Von Willebrand Factor a Domain. *FEBS Letters* **400**, 297-303 (1997).
103. Shih, D. T., Edelman, J. M., Horwitz, A. F., Grunwald, G. B. & Buck, C. A. Structure/Function Analysis of the Integrin Beta 1 Subunit by Epitope Mapping. *J. Cell Biol.* **122**, 1361-1371 (1993).
104. Green, L. J., Mould, A. P. & Humphries, M. J. The Integrin Beta Subunit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30**, 179-184 (1998).
105. Heino, J. The Collagen Receptor Integrins Have Distinct Ligand Recognition and Signaling Functions. *Matrix Biology* **19**, 319-323 (2000).
106. Kühn, K. & Eble, J. A. The Structural Bases of Integrin-Ligand Interactions. *Trends in Cell Biology* **4**, 256-261 (1994).
107. Gardner, H., Kreidberg, J., Koteliansky, V. & Jaenisch, R. Deletion of Integrin Alpha1 by Homologous Recombination Permits Normal Murine Development but Gives Rise to a Specific Deficit in Cell Adhesion. *Developmental Biology* **175**, 301-313 (1996).
108. Calderwood, D. A., Tuckwell, D. S., Eble, J. A., Kühn, K. & Humphries, M. J. The Integrin Alpha 1 A-Domain Is a Ligand Binding Site for Collagens and Laminin. *J. Biol. Chem.* **272**, 12311-12317 (1997).
109. Kern, A., Briesewitz, R., Bank, I. & Marcantonio, E. E. The Role of the I Domain in Ligand Binding of the Human Integrin Alpha 1 Beta 1. *J. Biol. Chem.* **269**, 22811-22816 (1994).
110. Emsley, J., King, S. L., Bergelson, J. M. & Liddington, R. C. Crystal Structure of the I Domain from Integrin Alpha 2 Beta 1. *J. Biol. Chem.* **272**, 28512-28517 (1997).
111. Nolte, M. et al. Crystal Structure of the Alpha 1 Beta 1 Integrin I-Domain: Insights into Integrin I-Domain Function. *FEBS Letters* **452**, 379-385 (1999).

112. Rich, R. L. et al. Trench-Shaped Binding Sites Promote Multiple Classes of Interactions between Collagen and the Adherence Receptors, Alpha 1 Beta 1 Integrin and Staphylococcus Aureus Cna Mscramm. *J. Biol. Chem.* **274**, 24906-24913 (1999).
113. Kern, A., Ebel, J., Golbik, R. & Kühn, K. Interaction of Type Iv Collagen with the Isolated Integrins Alpha 1 Beta 1 and Alpha 2 Beta 1. *Eur. J. Biochem.* **215**, 151-159 (1993).
114. Camper, L., Hellman, U. & Lundgren-Akerlund, E. Isolation, Cloning, and Sequence Analysis of the Integrin Subunit Alpha 10, a Beta 1-Associated Collagen Binding Integrin Expressed on Chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 20383-20389 (1998).
115. Velling, T., Kusche-Gullberg, M., Sejersen, T. & Gullberg, D. Cdna Cloning and Chromosomal Localization of Human Alpha 11 Integrin. A Collagen-Binding, I Domain-Containing, Beta 1-Associated Integrin Alpha -Chain Present in Muscle Tissues. *J. Biol. Chem.* **274**, 25735-25742 (1999).
116. DiPersio, C. M., Shah, S. & Hynes, R. O. Alpha 3a Beta 1 Integrin Localizes to Focal Contacts in Response to Diverse Extracellular Matrix Proteins. *J Cell Sci* **108**, 2321-2336 (1995).
117. Pozzi, A., Wary, K. K., Giancotti, F. G. & Gardner, H. A. Integrin Alpha 1 Beta 1 Mediates a Unique Collagen-Dependent Proliferation Pathway in Vivo. *J. Cell Biol.* **142**, 587-594 (1998).
118. Arcangelis, A. D. & Georges-Labouesse, E. Integrin and ECM Functions: Roles in Vertebrate Development. *Trends Genetic* **16**, 389-395 (2000).
119. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
120. Kronberg, R. D. & McConnell, H. M. Inside-Outside Transitions of Phospholipids in Vesicle Membranes. *Biochemistry* **10**, 1111-1120 (1971).
121. Purrucker, O., Förtig, A., Jordan, R. & Tanaka, M. Supported Membranes with Well-Defined Polymer Tethers - incorporation of Cell Receptors. *ChemPhysChem* **5**, 327-335 (2004).
122. Steinberg-Yfrach, G. et al. Light-Driven Production of Atp Catalysed by F0f1-ATP Synthase in an Artificial Photosynthetic Membrane. *Nature* **392**, 479-482 (1998).
123. Wiedemann, I., Benz, R. & Sahe, H.-G. Lipid II-Mediated Pore Formation by the Peptide Antibiotic Nisin: A Black Lipid Membrane Study. *J. Bacteriology* **186**, 3259-3261 (2004).
124. Knoll, W. et al. Functional Tethered Lipid Bilayers. *Reviews in Molecular Biotechnology* **74**, 137-158 (2000).
125. Naumann, R. et al. Incorporation of Membrane Proteins in Solid-Supported Lipid Layers. *Angewandte Chemie International Edition in English* **34**, 2056-2058 (1995).

126. Neumann, T., Johansson, M.-L., Kambhampati, D. & Knoll, W. Surface-Plasmon Fluorescence Spectroscopy. *Advanced Functional Materials* **12**, 575-586 (2002).
127. Rodahl, M., Hook, F., Krozer, A., Brzezinski, P. & Kasemo, B. Quartz Crystal Microbalance Setup for Frequency and Q-Factor Measurements in Gaseous and Liquid Environments. *Review of Scientific Instruments* **66**, 3924-3930 (1995).
128. Schmidt, E.-K. in *Charakterisierung thiopeptidunterstützter Lipidschichten zur Inkorporation von Membranproteinen, Dissertation* (Universität Hannover, 1998).
129. Anselme, K. Osteoblast Adhesion on Biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667-681 (2000).
130. Ito, Y., Kajihara, M. & Imanishi, Y. Materials for Enhancing Cell Adhesion by Immobilization of Cell-Adhesive Peptide. *Journal of Biomedical Materials Research* **25**, 1325-1337 (1991).
131. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue Engineering. *Science* **260**, 920-926 (1993).
132. Kantlehner, M. et al. Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as Well as Bone Formation. *ChemBioChem* **1**, 107-114 (2000).
133. Rawlings, R. D. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *Clinical Materials* **14**, 155-179 (1993).
134. Saccà, B. et al. Binding and Docking of Synthetic Heterotrimeric Collagen Type IV Peptides with Alpha1 Beta1 Integrin. *ChemBioChem* **3**, 904-907 (2002).
135. Epple, M. & Rueger, J. M. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **47**, 1405-1410 (1999).
136. Schwartz, Z., Kieswetter, K., Dean, D. D. & Boyan, B. D. Underlying Mechanisms at the Bone-Surface Interface During Regeneration. *Journal of Periodontal Research* **32**, 166-171 (1997).
137. Liebermann, T. & Knoll, W. Surface-Plasmon Field Enhanced Fluorescence Spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **171**, 115-130 (2000).
138. Yu, F., Yao, D. & Knoll, W. Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy Studies of the Interaction between an Antibody and Its Surface-Coupled Antigen. *Anal. Chem.* **75**, 2610-2617 (2003).
139. Ekgasit, S., Thammacharoen, C., Yu, F. & Knoll, W. Evanescent Field in Surface Plasmon Resonance and Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopies. *Anal. Chem.* **76**, 2210-2219 (2004).
140. Knoll, W. Interfaces and Thin Films as Seen by Bound Electromagnetic Waves. *Annual Review of Physical Chemistry* **49**, 569-638 (1998).
141. Kretschmann, E. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **V241**, 313-324 (1971).

142. Kretschmann, E. & Raether, H. Radiative Decay of Nonradiative Surface Plasmon Excited by Light. *Z. Naturf.* **23A**, 2135-2136 (1968).
143. Raether, H. *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings* (Springer Verlag, Heidelberg, 1988).
144. Attridge, J. W., Daniels, P. B., Deacon, J. K., Robinson, G. A. & Davidson, G. P. Sensitivity Enhancement of Optical Immunosensors by the Use of a Surface Plasmon Resonance Fluoroimmunoassay. *Biosensors and Bioelectronics* **6**, 201-214 (1991).
145. Ottl, J. in *Synthese von Disulfid-verbrückten Collagenpeptiden; Modellpeptide der Collagenase-Schnittstelle und ihre Interaktion mit Matrix Metalloproteinasen* (Technische Universität München, 1998).
146. Müller, J. C. D. in *Substrate und Inhibitoren für Matrixmetalloproteinasen; Synthese tripelhelikaler Collagenmodellpeptide als Fluoreszenzsubstrate sowie nichtpeptidischer Cysteinderivate als Inhibitoren* (Technische Universtiät München, 1999).
147. Sacca, B. in *Selective Binding of Integrins to Synthetic Heterotrimeric Collagen IV Peptides Containing the Cell-Adhesion Epitope* (Technische Universität München, 2002).
148. Barth, D. in *Kollagenmodellpeptide: Synthese und biophysikalische Eigenschaften* (Technische Universität München, 2003).
149. Mechling, D. E. & Bächinger, H.-P. The Collagen-Like Peptide $(Ger)_{15}GPCCG$ Forms pH-Dependent Covalently Linked Triple Helical Trimers. *J. Biol. Chem.* **275**, 14532-14536 (2000).
150. Mann, K. et al. Glycosylated Threonine but Not 4-Hydroxyproline Dominates the Triple Helix Stabilizing Positions in the Sequence of a Hydrothermal Vent Worm Cuticle Collagen. *J. Mol. Biol.* **261**, 255-266 (1996).
151. Boudko, S. et al. Nucleation and Propagation of the Collagen Triple Helix in Single-Chain and Trimerized Peptides: Transition from Third to First Order Kinetics. *Journal of Molecular Biology* **317**, 459-470 (2002).
152. Frank, S. et al. Stabilization of Short Collagen-Like Triple Helices by Protein Engineering. *Journal of Molecular Biology* **308**, 1081-1089 (2001).
153. Barth, D. et al. The Role of Cystine Knots in Collagen Folding and Stability, Part I. Conformational Properties of $(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_5$ and $(Pro\text{-}(4S)\text{-}FPro\text{-}Gly)_5$ Model Trimers with an Artificial Cystine Knot. *Chem. Eur. J.* **9**, 3692-3702 (2003).
154. Barth, D., Kyrieleis, O., Frank, S., Renner, C. & Moroder, L. The Role of Cystine Knots in Collagen Folding and Stability, Part II. Conformational Properties of $(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_n$ Model Trimers with N- and C-Terminal Collagen Type III Cystine Knots. *Chem. Eur. J.* **9**, 3703-3714 (2003).

155. Siljander, P. R.-M. et al. Integrin Activation State Determines Selectivity for Novel Recognition Sites in Fibrillar Collagens. *J. Biol. Chem.* **279**, 47763-47772 (2004).
156. Farndale, R. W. & Barnes, M. J. Collagen Peptides and Uses Thereof. *Patent*, WO9950281, CA2325017 (1999).
157. Heidemann, E. & Roth, W. Synthesis and Investigation of Collagen Model Peptides. *Adv. Polymer Sci.* **43**, 143-203 (1982).
158. Moroder, L. in *Protection of Functional Groups. Synthesis of Peptides and Peptidomimetics* (Goodman, M.; Felix, A.; Moroder, L.: Toniolo, C., Thieme Verlag, Stuttgart, 2001).
159. Atherton, E., Logan, C. J. & Sheppard, R. C. Peptide Synthesis. 2. Procedures for Solid-Phase Synthesis Using N-Alpha-Fluorenylmethoxycarbonylamino-Acids on Polyamide Supports - Synthesis of Substance-P and of Acyl Carrier Protein 65-74 Decapeptide. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2**, 538-546 (1981).
160. Saccà, B. & Moroder, L. Synthesis of Heterotrimeric Collagen Peptides Containing the Alpha 1 Beta 1 Integrin Recognition Site of Collagen Type IV. *Journal of Peptide Science* **8**, 192-204 (2002).
161. Sakakibara, S. & Nagai, Y. Synthesis of Poly-(L-Prolyl-L.Prolylglycyl) of Defined Molecular Weights. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **33**, 1537-1542 (1960).
162. Wünsch, E. in *Peptides Proceedings of the 5. European Symposium 1962* (ed. Young) 89-91 (Pergamon Press Oxford, 1963).
163. Goodman, M. & Levine, L. Peptide Synthesis Via Active Esters. 4. Racemization and Ring-Opening Reactions of Optically Active Oxazolones. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2918-2922 (1964).
164. Dourtoglou, V., Ziegler, J.-C. & Gross, B. L'hexafluorophosphate De O-Benzotriazolyl-N,N-Tetramethyluronium: Un Reactif De Couplage Peptidique Nouveau Et Efficace. *Tetrahedron Letters* **19**, 1269-1272 (1978).
165. Carpino, L. A. & Elfaham, A. Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate - a Rapid Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid-Phase Peptide-Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5401-5402 (1995).
166. Behrendt, R. in *Photoschaltung von Konformation und Bioaktivität cyclischer Modellpeptide; cis/trans-Isomerisierung des Azobenzols als molekularer Schalter cyclischer Peptide* (Technische Universität München, 2000).
167. Ottl, J., Musiol, H.-J. & Moroder, L. Heterotrimeric Collagen Peptides Containing Functional Epitopes. Synthesis of Single-Stranded Collagen Type I Peptides Related to the Collagenase Cleavage Site. *Journal of Peptide Science* **5**, 103-110 (1999).
168. Middendorf, H. D., Hayward, R. L., Parker, S. F., Bradshow, J. & Miller, A. Vibrational Neutron Spectroscopy of Collagen and Model Polypeptides. *Biophys. J.* **69**, 660-673 (1995).

169. Miles, C. A. et al. Identification of an Intermediate State in the Helix-Coil Degradation of Collagen by Ultraviolet Light. *J. Biol. Chem.* **275**, 33014-33020 (2000).
170. Sionkowska, A. Modification of Collagen Films by Ultraviolet Irradiation. *Polym. Degrad. Stabil.* **68**, 147-151 (2000).
171. Danielsen, C. C. Precision Method to Determine Denaturation Temperature of Collagen Using Ultraviolet Difference Spectroscopy. *Coll. Rel. Res.* **2**, 143-150 (1982).
172. Mayo, K. H. Nmr and X-Ray Studies of Collagen Model Peptides. *Peptide Science* **40**, 359-370 (1996).
173. Buevich, A.V., Dai, Q.-H., Liu, X., Brodsky, B. & Baum, J. Site-Specific NMR Monitoring of Cis-Trans Isomerization in the Folding of the Proline-Rich Collagen Triple Helix. *Biochemistry* **39**, 4299-4308 (2000).
174. Consonni, R., Santomo, L., Tenni, R., Longhi, R. & Zetta, L. Conformational Study of a Collagen Peptide by 1H-NMR Spectroscopy: Observation of the 14N-1H Spin-Spin Coupling of the Arg Guanidinium Moiety in the Triple-Helix Structure. *FEBS Letters* **436**, 243-246 (1998).
175. Engel, J., Chen, H.-T., Prockop, D. J. & Klump, H. The Triple Helix Coil Conversion of Collagen-Like Polytripeptides in Aqueous and Nonaqueous Solvents. Comparison of the Thermodynamic Parameters and the Binding of Water to $(L\text{-Pro-L-Pro-Gly})_n$ and $(L\text{-Pro-L-Hyp-Gly})_n$. *Biopolymers* **16**, 601-622 (1977).
176. Bhatnagar, R. S. & Gough, C. A. *Circular Dichroism of Collagen and Related Polypeptides. In: Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (ed. Fasman, G. D.) (Plenum Press, New York, 1996).
177. Melacini, G., Feng, Y. & Goodman, M. Acetyl-Terminated and Template-Assembled Collagen-Based Polypeptides Composed of Gly-Pro-Hyp Sequences. 3. Conformational Analysis by 1H-NMR and Molecular Modeling Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10359-10364 (1996).
178. Brown, III, F. R., di Corato, A., Lorenzi, G. P. & Blout, E. R. Synthesis and Structural Studies of Two Collagen Analogues: Poly (-Prolyl-Seryl-Glycyl) and Poly (-Prolyl-Alanyl-Glycyl). *Journal of Molecular Biology* **63**, 85-99 (1972).
179. Engel, J., Kurtz, J., Katchalski, E. & Berger, A. Polymers of Tripeptides as Collagen Models. 2. Conformational Changes of Poly(L-Prolyl-Glycyl-L-Propyl) in Solution. *J. Mol. Biol.* **17**, 255-272 (1966).
180. Wilkins, D. K. et al. Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient Nmr Techniques. *Biochemistry* **38**, 16424-16431 (1999).
181. Cadamuro, S. Persönliche Mitteilung.

182. Barth, D., Milbradt, A. G., Renner, C. & Moroder, L. A (R)- or a (S)-Fluoroproline Residue in Position Xaa of the (Xaa-Yaa-Gly) Collagen Repeat Severely Affects Triple-Helix Formation. *ChemBioChem* **5**, 79-86 (2004).
183. Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W. & Barnes, M. J. Structure of the Integrin Alpha 2 Beta 1-Binding Collagen Peptide. *Journal of Molecular Biology* **335**, 1019-1028 (2004).
184. Okuyama, K. et al. Crystal Structures of Collagen Model Peptides with Pro-Hyp-Gly Repeating Sequence at 1.26 A Resolution: Implications for Proline Ring Puckering. *Biopolymers* **76**, 367-377 (2004).
185. Stetefeld, J. et al. Collagen Stabilization at Atomic Level: Crystal Structure of Designed $(Gly\text{-}Pro\text{-}Pro)_{10}$foldon. *Structure* **11**, 339-346 (2003).
186. Nykvist, P. et al. Distinct Recognition of Collagen Subtypes by Alpha 1beta 1 and Alpha 2beta 1 Integrins. Alpha 1beta 1 Mediates Cell Adhesion to Type XIII Collagen. *J. Biol. Chem.* **275**, 8255-8261 (2000).
187. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **227**, 680-685 (1970).
188. Weber, K. & Osborn, M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412 (1969).
189. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
190. Gekko, K. & Koga, S. Increased Thermal Stability of Collagen in the Presence of Sugars and Polyols. *J Biochem (Tokyo)* **94**, 199-205 (1983).
191. O'Shannessy, D. J., Brighamburke, M., Soneson, K. K., Hensley, P. & Brooks, I. Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods. *Analytical Biochemistry* **212**, 457-468 (1993).
192. Edwards, P. R. et al. Kinetics of Protein-Protein Interactions at the Surface of an Optical Biosensor. *Analytical Biochemistry* **231**, 210-217 (1995).
193. Morton, T. A., Myszka, D. G. & Chaiken, I. M. Interpreting Complex Binding Kinetics from Optical Biosensors: A Comparison of Analysis by Linearization, the Integrated Rate Equation, and Numerical Integration. *Analytical Biochemistry* **227**, 176-185 (1995).
194. Wiltschi, B., Knoll, W. & Sinner, E.-K. Binding Assays with Artificial Tethered Membranes Using Surface Plasmon Resonance. *Methods* **39**, 134-146 (2006).
195. Wessendorf, M. W. & Brelje, T. C. Which Fluorophore Is Brightest? A Comparison of the Staining Obtained Using Fluorescein,

Tetramethylrhodamine, Lissamine Rhodamine, Texas Red, and Cyanine 3.18. *Histochemistry and Cell Biology* **V98**, 81-85 (1992).
196. Sinner, E.-K. & Wiltschi, B. Erleuchtung für Membranproteine garantiert. *Biospektrum* **3**, 275-277 (2003).
197. Sackmann, E. & Tanaka, M. Supported Membranes on Soft Polymer Cushions: Fabrication, Characterization and Applications. *Trends in Biotechnology* **18**, 58-64 (2000).
198. Peters, R. Lateral Mobility of Proteins and Lipids in the Red Cell Membrane and the Activation of Adenylate Cyclase by Beta-Adrenergic Receptors. *FEBS Letters* **234**, 1-7 (1988).
199. Kwon, G., Axelrod, D. & Neubig, R. R. Lateral Mobility of Tetramethylrhodamine (TMR) Labelled G Protein Alpha and Beta Gamma Subunits in Ng 108-15 Cells. *Cellular Signalling* **6**, 663-679 (1994).
200. Wagner, M. L. & Tamm, L. K. Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethylenglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker. *Biophys. J.* **79**, 1400-1414 (2000).
201. Deverall, M. A. et al. Membrane Lateral Mobility Obstructed by Polymer-Tethered Lipids Studied at the Single Molecule Level. *Biophys. J.* **88**, 1875-1886 (2005).
202. Schiller, S. M., Naumann, R., Lovejoy, K., Kunz, H. & Knoll, W. Archaea Analogue Thiolipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ultrasmooth Gold Surfaces. *Angewandte Chemie* **42**, 208-211 (2003).
203. Nagle, J. F. & Tristram-Nagle, S. Lipid Bilayer Structure. *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 474-480 (2000).
204. Luo, B.-H., Springer, T. A. & Takagi, J. High Affinity Ligand Binding by Integrins Does Not Involve Head Separation. *J. Biol. Chem.* **278**, 17185-17189 (2003).
205. Cremer, P.S. & Boxer, S.G. Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports. *J. Phys. Chem. B* **103**, 2554-2559 (1999).
206. Reimhult, E., Hook, F. & Kasemo, B. 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 (2003).
207. Kölchens, S., Ramaswami, V., Birgenheier, J., Nett, L. & O'Brien, D. F. Quasi-Elastic Light Scattering Determination of the Size Distribution of Extruded Vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids* **65**, 1-10 (1993).
208. McBurney, M. W. & Rogers, B. J. Isolation of Male Embryonal Carcinoma Cells and Their Chromosome Replication Patterns. *Dev. Biol.* **89**, 503-508 (1982).

209. Underwood, P. A. & Bennett, F. A. The Effect of Extracellular Matrix Molecules on the in Vitro Behavior of Bovine Endothelial Cells. *Experimental Cell Research* **205**, 311-319 (1993).
210. Zamir, E. et al. Molecular Diversity of Cell-Matrix Adhesions. *J Cell Sci* **112**, 1655-1669 (1999).
211. McAteer, J. A. & Davis, J. M. *Basic Cell Culture Techniques and the Maintenance of Cell Lines. In: Basics Cell Culture* (ed. Davis, J.) (Oxford Press, New York, 2002).
212. Carnegie, J. A. & Cabaca, O. 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**, 287-299 (1993).
213. Vandenberg, P. et al. Characterization of a Type IV Collagen Major Cell Binding Site with Affinity to the Alpha 1 Beta 1 and the Alpha 2 Beta 1 Integrins. *J. Cell Biol.* **113**, 1475-1483 (1991).
214. Grassetti, D. R. & Murray, Jr., J. F. Determination of Sulfhydryl Groups with 2,2'- or 4,4'-Dithiodipyridine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **119**, 41-49 (1967).
215. Saccà, B., Renner, C. & Moroder, L. The Chain Register in Heterotrimeric Collagen Peptides Affects Triple Helix Stability and Folding Kinetics. *Journal of Molecular Biology* **324**, 309-318 (2002).
216. Musiol, H.-J., Siedler, F., Quarzago, D. & Moroder, L. Redox-Active Bis-Cysteinyl Peptides. I. Synthesis of Cyclic Cystinyl Peptides by Conventional Methods in Solution and on Solid Supports. *Biopolymers* **34**, 1553-1562 (1994).
217. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Analytical Biochemistry* **34**, 595-598 (1970).
218. Kaiser, E., Bossinger, C. D., Colescott, R. L. & Olsen, D. B. Color Test for Terminal Prolyl Residues in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Chim. Acta* **118**, 149-151 (1980).
219. Vojkovsky, T. Detection of Secondary Amines on Solid Phase. *Peptide Res.* **8**, 236-237 (1995).
220. Schaegger, H. & von Jagow, G. Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-kDa to 100-kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379 (1987).
221. Schaegger, H., Aquila, H. & von Jagow, G. Coomassie Blue Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide-Gel Electrophooresis for Direct Visualization of Polypeptides During Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **173**, 201-205 (1988).
222. Lindl, T. *Zell- Und Gewebekultur* (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 2000).

223. Buntrock, R. E. The Acs Style Guide. A Manual for Authors and Editors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **38**, 1254-1255 (1998).
224. International, Union of Pure and Applied Chemistry. Iupac-Iubmb Joint Commission on Biochemical Nomenclature & Nomenclature Committee of Iubmb - Publications List. *http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/jcbn.html*.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu den gebräuchlichen Abkürzungen der SI-Einheiten Standardabkürzungen nach ACS Style Guide: *A manual for Authors and Editors*[223] verwendet. Zur Nomenklatur und gebräuchlichen biochemischen Akürzungen sei außerdem auf die *IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature*[224] verwiesen. Die verwendeten Abkürzungen sind im Folgenden angegeben:

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
Ac	Acetyl
Ac_2O	Essigsäureanhydrid
APS	Ammoniumpersulfat
Äq.	Äquivalente
aq.	wässrig
BIA	bimolekulare Interaktions-Analyse
bidest.	bidestilliert
BLM	Doppellipidmembran (*bimolecular lipid membran*)
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
BSA	bovines Serum Albumin
BSB	Benzamidinlagerungspuffer (*benzamidine storage buffer*)
Bu	n-Butyl
C	Konzentration (*concentration*)
°C	Grad Celsius
CCD	*charge-coupled device*
CD	Circular Dichroismus
Cl/T	Chlor/Tolidin Färbung
cps	*counts per second*

Cy3	Cyanin3 (Fluoreszenzfarbstoff)
Cy5	Cyanin5 (Fluoreszenzfarbstoff)
d	Tag
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
dH_2O	destilliertes Wasser
DIEA	N,N'-Diisopropylethylamin
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMAP	2,4-Dimethylaminopyridin
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMPE	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Mikrokalorimetrie (*differential scanning calorimetry*)
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethanolamin
ECM	extrazelluläre Matrix
E.coli	*Escherichia coli*
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EK	Einzelkette (des Kollagenpeptids)
ESI	Elektro-Spray-Ionisierung
Et	Ethyl
Et_2O	Diethylether
EtOH	Ethanol
f	Brennweite
FA	fokale Adhäsion(skomplexe)
FHSQC	*fast heteronuclear single quantum coherence*
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl

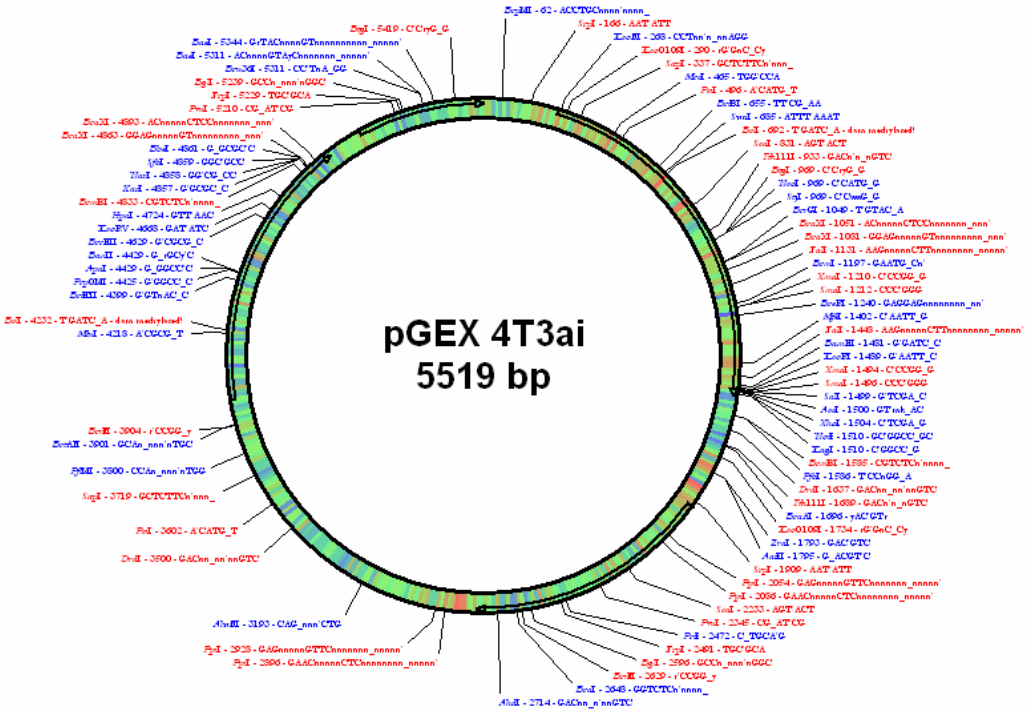
GSH	Glutathion, L-Glutamyl-L-Cysteinyl-L-Glycin
GST	Glutathion-S-Transferase
GSSH	Glutathiondisulfid
GUA	Guanidinium Hydrochlorid
h	Stunde (*hora*)
HBTU	N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphat
HOAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (*High Pressure Liquid Chromatography*)
HV	Hochvakuum
Hyp	Hydroxyprolin
Hz	Hertz
IBP	Integrinbindungspuffer
$IBPo^{2+}$	Integrinbindungspuffer ohne zweiwertige Kationen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
k	Wellenvektor
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Kp	Siedepunkt
LB	*Luria Bertani* Medium
LC-MS	Flüssigchromatografie-gekoppelte Massenspektrometrie
LM	Lösemittel
M	molar
mbar	Millibar
Me	Methyl
MeOH	Methanol

MIDAS	Metallionen abhängige Adhäsionsseite *(metal-ion dependent adhesion site)*
min	Minute(n)
mM	millimolar
MPG	Max Planck Gesellschaft
MQ-H_2O	MilliQ-aufbereitetes (speziell gefiltertes) Wasser
M_r	Molgewicht
MS	Massenspektrometrie
MTB	Methyl-tert-butyl-ether
mTOF	*micro Time of Flight*
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgröße (*molecular weight cut off*)
MWD	Vielfach-Wellenlängen-Detektor *(Multi Wavelength Detector)*
n	Brechungsindex
nM	nanomolar
NMP	N-Methyl-pyrollidon
NMR	Kernmagnetresonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*)
NOE	*nuclear Overhauser effect*
OD	optische Dichte
P19	19mer Lamininpeptid bzw. Zelllinie aus einem Mäuse Teratocarcinom
p.a.	analysenrein (*pro analysi*)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (*phosphate buffered saline*)
PBST	PBS-Puffer mit Triton-X 100
PC	L-α-Phosphatidylcholin
PDA	Photodioden-Array
PDB	Proteindatenbank *(Protein Data Bank)*
PE	Petrolether
PG	Propylenglykol

pH	*potential hydrogenii*
Ph	Phenyl
Pip	Piperidin
QCM	Quartzkristall Mikrowaagen Messung
quant	quantitativ
R	Reflexion
R_f	Retentionsfaktor in der Dünnschichtchromatographie
RP	*Reversed Phase*
RP-HPLC	*Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography*
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rpn	Verhältnis der positiven Peakintensität zur negativen Peakintensität *(ratio of positive peak intensity over negative peak intensity)*
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfonat
sec	Sekunde
SFB	Sonderforschungsbereich
SPFS	Oberflächenplasmonen-Floureszenzspektroskopie (*surface plasmon fluorescence enhanced spectroscopy*)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptid synthesis*)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
SPS	Oberflächenplasmonenspektroskopie
S*t*Bu	tert-Butylthio
t	Zeit
T	Trimer (Kollagenpeptid)
Tab.	Tabelle
tBLM	hier: thiopeptidunterstützte Lipidmembran
TBTU	O-(1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate
*t*Bu	tert-Butyl

t-BuOH	*tert*-Butanol
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFFH	Fluoro-N,N,N',N'-tetramethylformamidiniumhexafluoro-phosphat
TIPS	Triisopropylsilan
T_m	Schmelztemperatur
TOCSY	*Total Correlation Spectroscopy*
TOF	*Time of Flight*
t_R	Retentionszeit in der analytischen HPLC
Tricin®	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton B	Benzyl-trimethyl-ammonim-hydroxid
Triton X	Polyoxyethylenalkylether (Mischung verschiedener Ether)
U	Einheit *(unit)*
UV/Vis	Ultraviolet/*Visible*
V	Volt
Vol%	Volumenprozent
W	Watt
Xaa	Platzhalter für beliebige Aminosäure
Yaa	Platzhalter für beliebige Aminosäure
Δ	Differenz
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
θ	Winkel
θ_i	bestimmter Einfallswinkel
μM	mikromolar
υ	Frequenz
Θ	molare Elliptizität

7.2 Plasmidkarte des verwendeten Konstrukts der alpha 1 I-Domäne



7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Kollagen-Tripelhelix

Abb. 2: Anordnung einer beliebeigen Aminosäure Xaa in einer Peptidkette mit der entsprechenden Nomenklatur der charateristischen Torsionswinkel

Abb. 3: Teilausschnitt der Kollagenstruktur mit Gly-Pro-Hyp-Sequenzabfolge, der die Lage der Aminosäurereste veranschaulicht

Abb. 4: Auswahl templatverknüpfter Kollagen-Modellpeptide

Abb. 5: Struktureigenschaften von Integrinen mit α- und β-Untereinheiten

Abb. 6: Schematische Darstellung zum Aufbau der α- und β-Untereinheiten der Integrinrezeptoren

Abb. 7: Schematische Darstellung einer denkbaren und realisierten Modellmembranarchitektur einer tBLM

Abb. 8: Schematische Darstellung der Anregung von Oberflächenplasmonen in der Kretschmann-Konfiguration

Abb. 9: Schematische Darstellung plasmonenspektroskopischer Messungen

Abb. 10: Synthetisierte Kollagenmodellpeptid-Einzelketten (A) und –Homotrimere (B)

Abb. 11: HPLC Chromatogramme des Reduktionsansatzes für das Peptid **EK2** mit $P(C_4H_9)$.

Abb. 12: Massenspektrum des Kollagentrimers **T1***

Abb. 13: CD-Spektren der Kollagenpeptide **T1**, **T1*, EK2** und **EK2***

Abb. 14: A: DSC-Entfaltungskurve des sebstassoziierten Kollagenpeptids **EK3**; B: CD-Schmelzkurve der selbstassoziierten Kollagenpeptide **EK1** und **EK3**

Abb. 15: DSC Entfaltungskurven; A: selbstassoziierte Einzelkette **EK2***; B: Kollagentrimer **T1**

Abb. 16: CD-Schmelzkurven; A: selbstassoziierte Einzelkette **EK2**; B: Kollagentrimer **T1**

Abb. 17: A: Ausschnitt 2D-NOESY-Spektrum **EK2***; B: 2D-^{1}H-^{15}N-FHSQC-Spektrum **EK2***; C: 2D-^{1}H-^{15}N-FHSQC-Spektrum von **T1***

Abb. 18: 2D-^{1}H-^{15}N-FHSQC-Spektrum von **T1*** und **EK2***

Abb. 19: SDS-PAGE der Aufreinigung der α1 I-Domäne

Abb. 20: CD-Spektrum der isolierten α1 I-Domäne nach der Aufkonzentrierung in PBS

Abb. 21: Darstellung des experimentellen BIAcore Versuchsaufbaus

Abb. 22: Interaktionsmessung des synthetischen Kollagenpeptid **T1** mit der rekombinanten α1 I-Domäne

Abb. 23: Anordnung des verwendeten SPFS-Messaufbaus

Abb. 24: A: Prisma-Küvetten Goldträger „Sandwich“; B: Kretschmann-Konfiguration mit Durchflussküvette

Abb. 25: SPFS-Küvetten; A: bisher verwendete Glasküvetten; B: Sylgard-Silikonküvetten mit Schläuchen für Zu- und Ablauf

Abb. 26: Schematische Darstellung der zunächst geplanten experimentellen SPFS-Messung

Abb. 27: Schematische Darstellung der durchgeführten experimentellen SPFS-Messung

Abb. 28: DLS-Messung von PC-Vesikeln in PBS-Puffer

Abb. 29: Zeitliche Abfolge des artifiziellen Membranaufbaus in einer plasmonenspektroskopischen Kinetikmessung

Abb. 30: SPFS Bindungsmessungen der Cy5-fluoreszenzmarkierten Kollagenpeptide an α1β1-Integrin-funktionalisierte Membranschicht

Abb. 31: Schematische Darstellung der artifiziellen Membran mit inkorporiertem Kollagenmodellpeptid **T2** und adhärenten Zellen

Abb. 32: Zweikomponentensilikkon-Stempel für Mikrostrukturierung und ausgewählte Muster; A: Matrize für Stempel; B: Zweikomponentensilikon-Stempel; C: Matrize in Vergrößerung; D: Stempelabdruck Laminin auf Gold

Abb. 33: Kultivierung von *P19*-Zellen. A: runde Geometrie der Zellen deutet auf nicht-adhärent wachsende Zellen hin; B: adhärent wachsende Zellen bilden lang gezogene Netzwerke aus

Abb. 34 A: Membranaufbau auf Goldträger mit Pipetten-Tropfen-Technik; B: Goldträger in beschichteter Petrischale mit Kulturmedium; C: obere Hälfte: Zellen auf unmodifizierter Lipidschicht adhärieren nicht, untere Hälfte: Positivkontrolle (reine Goldschicht) adhärente Zellen

Abb. 35: Adhäsion der *P19*-Zellen auf linearer mikrostrukturierten Oberflächen

Abb. 36: Positive Fluoreszenz bestätigt Bindung von fluoreszenzmarkiertem Kollagenpeptid **T1-Cy3** und *P19*-Zellen

}

7.4 Lebenslauf : Leslie Christina BARTH

Geburtsdatum/-ort :	26.08.1976 inTamsweg, Österreich
Familienstand :	verheiratet (geb. HÖTZER) zwei Kinder : Marlon Linus, * 09.03.2006 Zoe Amelie, * 02.03.2007
Nationalität :	österreichisch

Ausbildung :

Sep. 1987 – Jun. 1996	Theresien-Gymnasium München
1996	Abitur am Theresien Gymnasium München
Nov. 1996 - Sep. 2002	Studiengang Diplom Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
Mär. 2002 – Sep. 2002	Diplomarbeit an Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Schweiz, Institut für molekulare Chemie und Biologie Prof. Dr. Kay Severin Thema : « *Modelle für hydrolytische Zinkenzyme durch Molekulares Prägen* »
Jan. 2003 – Okt. 2007	Promotion am Max Planck Institut für Biochemie (MPIB), Martinsried, Abteilungen Membranbiochemie und Bioorganische Chemie, Dr. Eva-Kathrin Sinner, Prof. Dr. Dieter Oesterhelt und Prof. Dr. Luis Moroder Thema : *« Selektive Bindung synthetischer Kollagenmodell-peptide mit Adhäsionsmotiv und Integrin an funktionalisierten Oberflächen und artifiziellen Membransystemen »*
Mär. – Apr. 1999	Praktikum am Genzentrum München, Abteilung Prof. Michael Famulok Thema : « *In vitro Selektion von Michael-Addition-katalysierenden RNA-Aptameren"*
Jan. - Jun. 2000	Praktikum an der Paul Sabatier Université de Toulouse, Frankreich, Arbeitsgruppe von Dr. Isabell Rico-Lattes Thema: *„Epoxidierung von ß-Ionon in fluorhaltigen und –freien Lösemitteln"*
Jun. - Sep. 2000	Praktikum an der Eidgenössischen Hochschule Zürich (ETHZ), Schweiz, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Fussenegger Thema: „*Identifizierung und Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren der Cardiomyocyten- Differenzierung*"