

**Untersuchungen zur Struktur/Aktivitätsbeziehung  
des humanen CC-Chemokins HCC-2**

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
-Dr. rer. nat.-**

**genehmigte Dissertation**

**von**

**Dipl.-Chem. Sylvia E. Escher  
geboren am 27.09.1972 in Münster**

**1999**

**Referent**

Prof. Dr. T. Scheper

Prof. Dr. Dr. h.c. W. G. Forssmann

**Tag der Promotion** 15.12.1999

**Schlagwörter**

Proteinsynthese, Chemokine, Struktur-Aktivitätsbeziehung

**Keywords**

Protein synthesis, chemokine, structure-function relationship

## Abstract

Chemokines are a superfamily of small, inducible chemotactic proteins (5 to 20 kDa) that are involved in leukocyte function and trafficking. Although over 50 chemokines and 10 chemokine receptors have been identified so far, the molecular basis of the ligand/receptor interactions remains unclear. In addition, HIV employs chemokine receptors for cell entry.

Human CC chemokine HCC-2 is a novel member of the chemokine protein family that induces chemotaxis of monocytes and eosinophils by activation of the CCR-1 and CCR-3 receptors. Three synthetic approaches, Fmoc chemistry, Boc chemistry and fragment condensation by native chemical ligation, were used to synthesize HCC-2 and derivatives. The two or three disulfide bridges of these proteins were introduced by oxidative folding in the presence of the redox system cysteine/cystine or, alternatively, by a semiregioselective and a regioselective approach using a mixed AcM/Trt protection scheme for the cysteine residues. It was shown that HCC-2(48-113) can be synthesized by either native chemical ligation or Fmoc chemistry. Using the optimized Fmoc-synthetic strategy followed by oxidative folding, pure synthetic HCC-2 peptides were obtained within 2-3 weeks in an amount of about 10 mg each..

The NMR-spectroscopical analysis of HCC-2(48-113) confirmed that, in contrast to most other chemokines, subtle structural differences impair dimer formation of this chemokine at a concentration of 2 mM. HCC-2, however, exhibits the same secondary structural elements as other chemokines, i.e. a triple-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet covered by an  $\alpha$ -helix. Structural investigations with HCC-2 derivatives proved that the N-terminal region, substitution of the amino acid Tyr70 by Leu and the lack of the third additional disulfide bond present in wild-type HCC-2 do not influence the tertiary structure of HCC-2. A complete loss of the tertiary structure was observed for the helix-deficient mutant in which Cys104 was replaced by Pro. The C-terminal  $\alpha$ -helix therefore plays a crucial role in the formation of the three-dimensional structure of HCC-2.

The biological activity of HCC-2 and its derivatives was also investigated. HCC-2(48-113) and [Ala64,104]HCC-2(48-113) lacking the third disulfide bridge induced chemotaxis on freshly isolated monocytes and stimulated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -release in THP-1 cells. The third disulfide bridge is consequently not a functional element of the HCC-2 structure. With the exception of HCC-2(22-113), all N-terminally modified HCC-2 derivatives and [Leu70]HCC-2(48-113) caused intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  changes in THP-1 cells. Minor differences in the biological activity of these derivatives indicate that the N-terminal region is involved in the receptor recognition and activation. Corresponding to the absence of any tertiary structural element [Ala64, Pro104]HCC-2(48-113) had no effect on THP-1 cells.

As developed and described in this thesis the synthetic methodology for HCC-2 allows the synthesis of chemokines and other similarly sized pharmacologically relevant proteins. It therefore provides a key tool for a better understanding of the mechanism of the complex interaction of chemokines and chemokine receptors, which is crucial for the design of therapeutically applicable receptor antagonists.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf unterschiedlichste Weise bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper möchte ich für die Übernahme des Referats und die Unterstützung bei der Beantragung des Chemiefondsstipendiums danken.

Beim Fonds der chemischen Industrie möchte ich mich für die Genehmigung des Stipendiums und die dadurch gesicherte Finanzierung dieser Doktorarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Wolf-Georg Forssmann für die Übernahme des Koreferats, das entgegengebrachte Vertrauen und die sehr guten Arbeitsbedingungen am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung (IPF).

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Dr. Knut Adermann für die stete Ansprechbarkeit, die zahlreichen Anregungen und Diskussionen, die diese Arbeit positiv beeinflusst haben, bedanken. Für das gute Arbeitsklima und die Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen anderen Mitgliedern der Abteilung Peptidsynthese bedanken.

Herrn Dr. Heinrich Sticht möchte ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der NMR-Strukturuntersuchung der Chemokine danken. Ein herzlicher Dank gilt ihm auch für das zur Verfügung stellen der Abbildung des Polypeptidrückgrats von IL-8, RANTES und HCC-2. Bei Herrn Dr. Ulf Forssmann bedanke ich mich für die Durchführung der Chemotaxis-Versuche. Bei der Firma PolyPeptide Laboratories (Wolfenbüttel) und ihren Mitarbeitern möchte ich mich für die freundliche Aufnahme, die zahlreichen Erklärungen und das zur Verfügung stellen aller für die Boc-Chemie notwendigen Arbeitsutensilien bedanken.

Dr. Annette Bussmann, Ulrike Opel und Dipl.-Biol. Dirk Motzkus gilt mein Dank für die Einarbeitung in die Geheimnisse der Zellkultur und Zellversuche.

Bei meinen Eltern und Jan möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders bedanken, die mich durch viel Geduld und Liebe während meiner Promotion und bei der Erstellung der Dissertation unterstützt haben.

**Abkürzungen**

Acm	Acetamidomethyl
Boc	ter-Butyloxycarbonyl
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
C-Terminus	carboxyterminale Region
DBU	Diazabizykloundekan
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT <sub>S2</sub>	oxidiertes Dithiothreitol
EDT	Ethandithiol
ES-MS	Electrospray ionisation-mass spectrometry
EST	Expressed Sequence Tags
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
LCMS	Liquid chromatography-mass spectrometry
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
G-Protein	guanylnucleotidbindendes Protein
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
IprOH	Isopropanol
Kbp	Kilobasenpaar
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOE	Nuclear overhauser effect
N-Terminus	aminoternale Region
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
PAM	4-Hydroxymethylphenylacetamidomethyl
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
SEC	Größenausschluß-Chromatographie (size-exclusion chromatography)
TBME	tert-Butylmethylether
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
Trt	Tryl

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	CHEMOKINE	1
1.2	STRUKTUR	4
1.3	STRUKTUR/AKTIVITÄTSBEZIEHUNG	7
1.4	MECHANISMUS DER LEUKOZYTENBEWEGUNG	8
1.5	MECHANISMUS DER SIGNALTRANSDUKTION	10
1.6	DAS HUMANE CC-CHEMOKIN HCC-2	12
1.7	PROTEINSYNTHESE	13
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
3.1	PEPTIDSYNTHESEN	15
3.2	ANALYTISCHE METHODEN	22
3.3	STRUKTURAUFKLÄRUNG	25
3.4	CHARAKTERISIERUNG DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT	27
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
4.1	SYNTHESE VON HCC-2, HCC-1 UND DERIVATEN	29
4.2	HCC-2-DERIVATE ZUR UNTERSUCHUNG DER STRUKTUR/AKTIVITÄTSBEZIEHUNG	39
4.3	EINFÜHREN DER DISULFIDBRÜCKEN	43
4.4	STRUKTURUNTERSUCHUNGEN	52
4.5	BIOLOGISCHE AKTIVITÄT	57
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
5.1	SYNTHESE VON HCC-2 UND VERWANDTEN PROTEINEN	63
5.2	DIE STRUKTUR/AKTIVITÄTSBEZIEHUNG VON HCC-2	66
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>74</b>

# 1 Einleitung

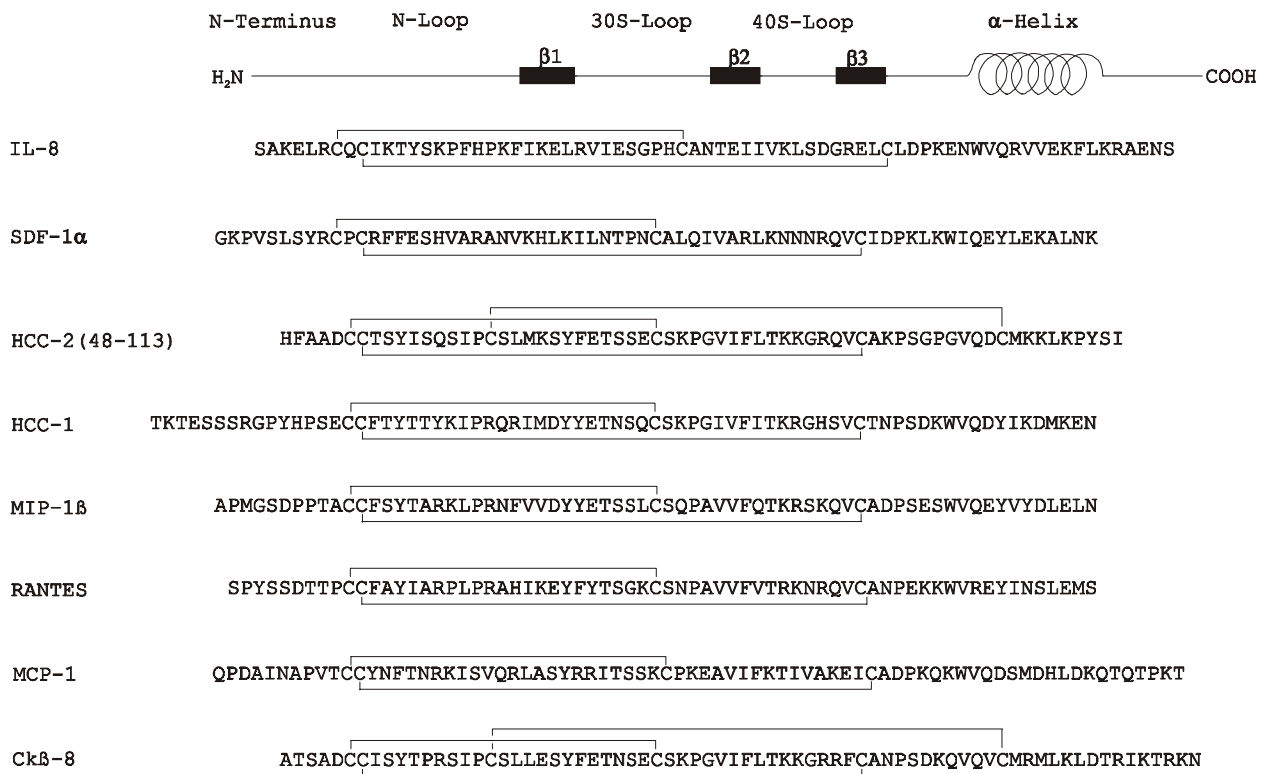
Chemotaktische Cytokine genannt Chemokine spielen eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Entzündungsprozessen. Eine Entzündung entsteht im Gefäßbindegewebe am Ort der Schädigung durch Noxen unterschiedlicher Art, wie z.B. Infektion mit Mikroorganismen oder Giftstoffen. Chemokine sind kleine Proteine (5-20 kDa), die die gerichtete Wanderung von Leukozyten aus dem Knochenmark in das entzündete Gewebe bewirken. Die molekulare Regulierung dieser Immunantwort ist komplex und wird unter anderem durch die temporäre und räumlich begrenzte Expression einer Vielzahl von Chemokinen und Chemokinrezeptoren gesteuert. Chemokine aktivieren im Gegensatz zu anderen chemotaktischen Substanzen selektiv einzelne Leukozytpopulationen, wie z.B. Monozyten, neutrophile oder eosinophile Granulozyten. Aufgrund dieser Spezifität wird vermutet, daß sie die Pathogenese, d.h. den Verlauf der Krankheit über die gezielte Infiltration mit einzelnen Leukozytenfamilien regulieren. Neben der Aktivierung der Leukozyten ist bisher nur wenig über die funktionelle Antwort von Gewebezellen bekannt, die eine große Anzahl verschiedener Chemokinrezeptoren exprimieren. Trotz der wachsenden Zahl von bekannten Chemokinen und ihrer Rezeptoren konnte bisher der Mechanismus der Rezeptorselektion und -aktivierung nicht aufgeklärt werden.

Mit der Entdeckung, daß HIV-Stämme Leukozyten über die Beteiligung von Chemokinrezeptoren infizieren, ist das Interesse an dem Mechanismus der Rezeptoraktivierung durch Chemokine stark gestiegen [1]. Eine positive Rolle spielen Chemokine dagegen bei der Wundheilung, Haematopoiese und Lymphozytentwicklung. Eine gestörte Chemokinexpression hingegen wird mit chronischen Entzündungen wie z.B. Arthritis, Asthma und Atherosklerose in Verbindung gebracht [2, 3].

## 1.1 Chemokine

Bis heute wurden über 50 Chemokine identifiziert. Sie werden durch vier Cysteine in konservierter Sequenzposition charakterisiert. Zwei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen eins und drei sowie zwei und vier stabilisieren die räumliche Peptidstruktur und gewährleisten so die funktionelle Aktivität der Chemokine.

Anhand der Lage der N-terminalen Cysteine werden vier Chemokinfamilien unterschieden. Zuerst wurden die beiden größten Untergruppen, die CXC( $\alpha$ )- und CC( $\beta$ )-Chemokine entdeckt (**Abbildung 1**). Die beiden N-terminalen Cysteine werden hier durch eine beliebige



**Abbildung 1:** Primärstruktur ausgewählter CXC- und CC-Chemokine. Die charakteristischen Sekundärstrukturelemente und die Disulfidbrücken sind angedeutet.

Aminosäure getrennt (CXC) bzw. liegen direkt benachbart vor (CC). Lymphotactin [4] mit nur zwei Cysteinen und das Membranprotein Fractalkin/Neurotactin [5] sind bisher die einzigen bekannten Vertreter der C- bzw. CX<sub>3</sub>C-Chemokine.

Innerhalb einer Chemokinfamilie werden Aminosäuresequenzhomologien von 20-70% beobachtet, während die Identität zwischen allen Chemokinen in einem Bereich von 20-40% liegt. Es ist bemerkenswert, daß die Gene der meisten humanen CC-Chemokine gehäuft auf Chromosom 17q11.2 liegen [6], wohingegen die Gene der CXC-Chemokine vorwiegend auf Chromosom 4q12-20 lokalisiert sind [7].

Bisher wurden Chemokine über biochemische Methoden, wie z.B. Isolierung aus Zellüberständen (IL-8 [8, 9] MCP-2, MCP-3 [10]), Hämofiltrat (HCC-1 [11]) oder durch Genklonierung entdeckt (SDF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\beta$  [12]). Die hohe strukturelle Ähnlichkeit der Chemokine, insbesondere die vier charakteristischen Cysteine in konservierter Position, ermöglicht seit kurzer Zeit die Suche unbekannter Chemokine über EST-Datenbanken. Neue Proteine mit möglichem Bezug auf ihre biologische Aktivität können so identifiziert werden.



Über die EST-gestützte Suche nach Sequenz- und Strukturhomologien wurden z.B. MIP-3 $\alpha$  und MIP-3 $\beta$  [13] entdeckt. Die Identifizierung eines Gens gibt jedoch keinen Aufschluß über posttranslatorische Prozessierungen, wie z.B. Glycosylierung, Amidierung oder Acetylierung. Proteasespaltstellen, die ein Präproprotein in ein funktionelles Peptid konvertieren, können nur vermutet werden, so daß die *in vivo* vorkommende funktionell aktive Peptidform unbekannt bleibt.

Chemokine vermitteln ihre Effekte über G-Protein-gekoppelte, 7-Transmembran-Rezeptoren. Diese bestehen generell aus einem extrazellulären N-Terminus, drei extrazellulären Rezeptorschleifen (Loop), drei intrazellulären Domänen, sieben hydrophoben Transmembranhelices und einem intrazellulären, G-Protein-gebundenen C-Terminus. Im Menschen wurden bisher zehn CC-Chemokin-spezifische und fünf CXC-Chemokin-spezifische Rezeptoren identifiziert. Innerhalb einer Rezeptorfamilie kann ein Rezeptor mehrere Chemokine binden bzw. ein Chemokin mehrere Rezeptoren aktivieren (Tabelle 1). CXC- und CC-Chemokinrezeptoren erkennen jedoch ausschließlich Chemokine der zugehörigen Unterfamilie [14, 15]. Die einzige bisher bekannte Ausnahme bei den Rezeptoren ist der auf Erythrozyten exprimierte Duffy-Antigen-Rezeptor, der sowohl CC- als auch CXC-Chemokine mit hoher Affinität bindet [16]. Das virale CC-Chemokin VMIP-II kann neben einer Reihe von CC-Chemokinrezeptoren auch an den CXCR4-Rezeptor binden [17]. Obwohl *in vitro*-Studien klar belegen, daß eine Vielzahl von Chemokinen überlappende Funktionen haben, scheint *in vivo* die Expression und Funktion der Chemokine fein abgestimmt zu sein. Drei Mechanismen werden hierfür verantwortlich gemacht: (1) Chemokin/Rezeptor Verfügbarkeit, (2) dynamische Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor auf der Zelloberfläche und (3) unterschiedliche Signaltransduktionswege [18, 19].

CXC-Chemokine aktivieren vorwiegend neutrophile Granulozyten. Es hat sich jedoch gezeigt, daß ihre Rezeptoren auch auf einer Vielzahl weiterer Leukozyten, Endothelzellen, Melanozyten und Neuronen expremiert werden. CC-Chemokine haben generell ein breiteres Wirkungsspektrum und aktivieren Monozyten, T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen sowie eosinophile und basophile Granulozyten [20, 21].

**Tabelle 1:** Übersicht über Chemokinrezeptoren, ihre Liganden und wichtigsten Expressionsorte. Entnommen und leicht modifiziert aus Devalaraja, M.N. und Richmond, A. [18].

Rezeptor	Ligand	Expressionsort
<b>CXC-Chemokine</b>		
CXCR1	IL-8, GCP-2	BL, N, NK, T
CXCR2	ERL-CXC-Chemokine	N, EC
CXCR3	IP-10, MIG, I-TAC, SCL	M, NK, Th1, Th2
CXCR4	SDF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\beta$	BL, DC, N, T
CXCR5	BCA	BL
<b>CC-Chemokine</b>		
CCR1	HCC-1, HCC-2, MCP-2/3/4, MIP-1 $\alpha/\delta$ , MIP-5, RANTES,	B, E, DC, M
CCR2	MCP-1/2/3/4/5	B, DC, M
CCR3	HCC-2, Eotaxin, Eotaxin-2, MCP-2/3/4, MIP-5, RANTES	B, DC, E, M, Th2
CCR4	MDC, TARC	DC, NT, Th2, Th1
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , MCP-2, RANTES	DC, EC, NK, Th1
CCR6	MIP-3 $\alpha$	DC, T
CCR7	SLC, MIP-3 $\beta$ , Ck $\beta$ 11 (?)	M, NT
CCR8	I-309, Tarc, MIP-1 $\beta$	T
CCR9	MIP-1 $\alpha/\beta$ , MCP-1/2/3/4, RANTES	DC, T

B, basophile Granulozyten; BCA, B-cell attracting chemokine; BL, B-Lymphozyten; DC, dendritische Zellen; E, eosinophile Granulozyten; EC, Endothelzellen; ERL-CXC-Chemokine, alle CXC-Chemokine mit einem ERL-Motiv am N-Terminus; HCC, humanes CC-Chemokin; IL, Interleukin; IP, interferon-inducible protein; GCP, granulocyte chemotactic protein; N, neutrophile Granulozyten; M, Monozyten; MDC, macrophage-derived chemokine; MIG, induced by  $\gamma$ -interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; NK, natürliche Killerzellen; NT, naive T-Zellen; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; SLC, secondary-lymphoid tissue chemokine; T, T-Lymphozyten; TARC, thymus and activation regulated chemokine; Th1/2, Th1/2 T-Lymphozyten.

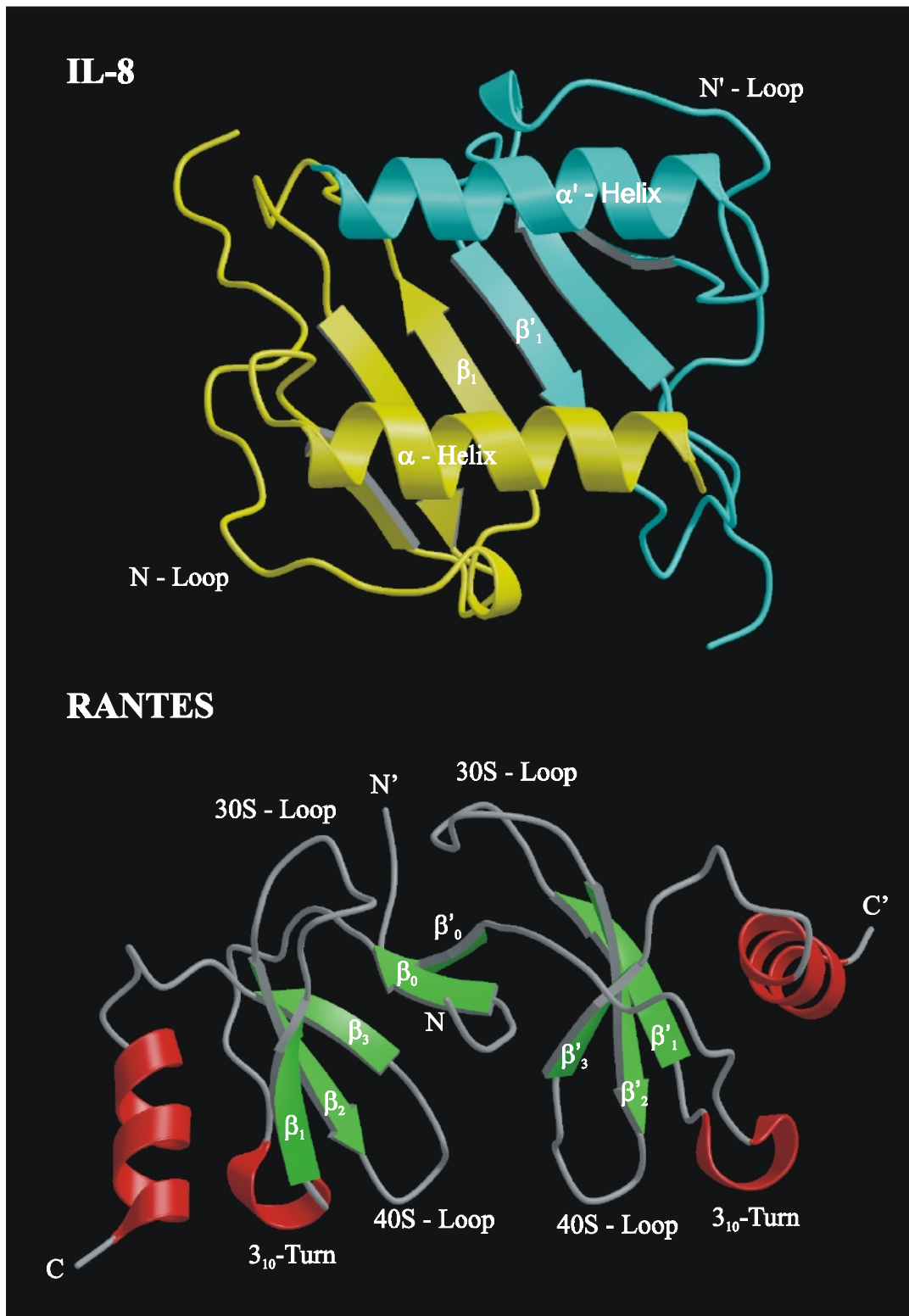
## 1.2 Struktur

In den vergangenen Jahren wurde die räumliche Struktur einer Reihe von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Chemokinen durch NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie bestimmt (IL-8 [22, 23], SDF-1 $\alpha$  [24], RANTES [25, 26], MCP-3 [27, 28], Eotaxin [29], NAP-2 [30]), um die strukturelle Basis der Chemokin/Chemokinrezeptor-Interaktion aufzuklären. Alle Chemokine

besitzen ein ähnliche Sekundärstrukturelemente bzw. eine ähnliche Tertiärstruktur. Ein monomeres Chemokinmolekül setzt sich prinzipiell aus einem ungeordneten N-Terminus, einem dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und einer darauf liegenden C-terminalen  $\alpha$ -Helix zusammen.

Darüberhinaus ist bekannt, daß die meisten Chemokine in Lösung zu einer Bildung definierter Dimere bzw. Oligomere neigen. Die Quartärstrukturen der CXC- und CC-Chemokine unterscheiden sich signifikant voneinander (Abbildung 2). Monomere der CXC-Chemokine dimerisieren über den ersten Strang des  $\beta$ -Faltblattes zu einem nicht kovalent gebundenen Homodimer mit sechssträngigem  $\beta$ -Faltblatt. PF-4 und NAP-2 [30] hingegen bilden Tetramere aus. Die CC-Chemokine MIP-1 $\beta$ , RANTES und MCP-1 hingegen dimerisieren über die Aminosäuren des flexiblen N-Terminus. Dies führt im Gegensatz zum globulären CXC-Dimer zu einer eher zylindrischen Quartärstruktur. SDF-1, SDF-1 $\beta$  [24], MCP-3 [27] und Fractalkin [31] liegen vorwiegend als Monomere vor.

Eine biologische Relevanz der Chemokinoligomerbildung konnte bisher weder *in vivo* noch *in vitro* eindeutig nachgewiesen werden [32, 33, 34, 35]. Zur Strukturbestimmung durch NMR-Spektroskopie werden millimolare Chemokinlösungen eingesetzt. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. vorwiegend nano- bzw. subnanomolaren Konzentrationen, liegen die meisten Chemokine jedoch vermutlich als Monomere vor. Typische Dissoziationskonstanten liegen in einem Bereich zwischen 40 nM (MIP-1 $\beta$ , [36]) und 21  $\mu$ M (IL-8, [37]). Es wurde beobachtet, daß Chemokine über eine schwach affine Wechselwirkung der C-terminale  $\alpha$ -Helix an Proteoglykane (GAG) auf der Oberfläche des Endothels binden [38]. Hier können lokal erhöhte Konzentrationen auftreten, die eine Dimerisierung zulassen. Erste Hinweise aus *in vitro*-Studien belegen, daß RANTES als Monomer die HIV-Infektion von Zellen unterdrückt, die dimere Form dieses Chemokins jedoch die Infektionsrate der Zellen erhöht [39].



**Abbildung 2:** Vergleich der CXC- und CC-Chemokinstrukturen.

Das CXC-Chemokin IL-8 dimerisiert über den ersten Strang des  $\beta$ -Faltblattes ( $\beta_1/\beta'_1$ ). Der direkt hinter den N-terminalen Cysteinen liegende N-Loop ist angedeutet. In dieser Darstellung, entnommen aus Clore *et al.* [22], lässt sich die Lage der C-terminalen  $\alpha$ -Helix auf dem  $\beta$ -Faltblatt gut erkennen. RANTES bildet ein für CC-Chemokine typisches Dimer über den N-Terminus aus. Alle weiteren typischen Strukturelemente wie z.B. die C-terminale  $\alpha$ -Helix, das dreisträngige  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta_1$ -3) sowie die Loop-Regionen 30S und 40S sind angedeutet (entnommen aus Skelton *et al.* [25]).

### 1.3 Struktur/Aktivitätsbeziehung

Die nähere Untersuchung der Funktion charakteristischer Strukturelemente der Chemokine bezüglich ihres Einflusses auf den biologischen Effekt könnte ein gezieltes Design kleiner Chemokinmimetika ermöglichen, die z.B. auch für die Bekämpfung von HIV-Infektionen eingesetzt werden könnten. Neben der Bedeutung einzelner Aminosäuren wurde bisher eingehend die Funktion der Disulfidbrücken, der  $\alpha$ -Helix, des Aminoterminus und des N-Loops untersucht.

Interleukin-8 [IL-8] ist eines der zuerst entdeckten und best erforschtesten Chemokine. Es konnte gezeigt werden, daß beide Disulfidbrücken für die biologische Aktivität notwendig sind [40]. Der Verlust einer Disulfidbrücke führt zu einem Verlust der Struktur und damit der biologischen Aktivität. Die Modifikation der N-terminalen Disulfidbrücke durch Mutation der Cysteine gegen unnatürliche Aminosäuren wie Penicillamin hat keinen Effekt auf die Tertiärstruktur von IL-8, führt jedoch zu einem dramatischen Aktivitätsverlust. Im Gegensatz dazu verändert die analoge Modifikation der C-terminalen Disulfidbrücke die biologische Aktivität von IL-8 kaum [41].

Die Rolle der C-terminalen  $\alpha$ -Helix ist weniger eindeutig beschrieben. Eine Störung der  $\alpha$ -Helix von IL-8, durch gezielte Mutation des konservierten Leu25, führt zu einer verringerten Aktivität, jedoch auch zu einer neu gewonnenen agonistischen Aktivität an CC-Chemokinrezeptoren [42]. Ein IL-8-Derivat, dem die  $\alpha$ -Helix fehlt, ist hingegen ähnlich biologisch aktiv wie IL-8. Ein weiteres von IL-8 abgeleitetes Protein, daß sich aus den C-terminalen Aminosäuren der  $\alpha$ -Helix zusammensetzt, ist inaktiv [43].

Alle CXC-Chemokine, die am N-Terminus ein ERL-Motiv enthalten, aktivieren den für Neutrophile spezifischen CXCR2 Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, daß eine systematische Verkürzung (MDC [44], MCP-3 [57], MCP-1 [45, 46], ENA-78 [47]) bzw. eine Verlängerung (RANTES [48, 49]) des N-terminalen Bereiches einige Chemokine in Antagonisten überführt. Im Gegensatz dazu zeigen N-terminal verkürzte Peptide von Ck $\beta$ 8 eine im Vergleich zum nativen Protein gesteigerte agonistische Aktivität [50]. Die Modulierung der biologischen Aktivität über proteolytische Prozessierung ist ein auch in der Natur weit verbreitetes Prinzip [51, 52, 53]. IL-8 wurde bisher aus verschiedenen Quellen als 77 und 72 Aminosäuren langes Peptid isoliert [54]. Die sukzessive N-terminale Verkürzung bis zum ERL-Motiv resultiert in

einer gesteigerten biologischen Potenz, weitere Verkürzungen führen zum Aktivitätsverlust [55]. Der N-Terminus allein, bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 10, zeigt keine biologische Aktivität [43]. Untersuchungen des N-Loops zeigten, daß er eine von mehreren möglichen Rezeptorbindungsstellen enthält [56, 57].

Basierend auf den bisher durchgeführten Untersuchungen wird angenommen, daß die N-terminale Region, bestehend aus N-Terminus und N-Loop, in die selektive Bindung und Aktivierung des Rezeptors involviert ist. Die N-terminale Disulfidbrücke scheint im Gegensatz zur zweiten charakteristischen Disulfidbrücke direkt in den Prozess der Rezeptoraktivierung einzugreifen. Das Chemokingrundgerüst, bestehend aus  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix, dient durch Ausbildung und Stabilisierung der charakteristischen Tertiärstruktur zur Rezeptorerkennung. Eine detaillierte Darstellung der Bindungs- und Aktivierungsdomänen der Chemokinrezeptoren wird in [58] behandelt. Ein Zweistufenmodell der Rezeptorbindung und -aktivierung wird favorisiert [59]: 1. Liganderkennung; Regionen des Chemokingrundgerüsts, z.B. der N-Loop, binden an den extrazellulären N-Terminus des Chemokinrezeptors [60, 61, 62, 56, 63], wodurch eine Konformationsänderung bzw. Oligomerisierung des Rezeptors initialisiert wird. 2. Rezeptoraktivierung; in einem zweiten Schritt aktiviert der N-Terminus des Chemokins nun zugängliche, extrazelluläre Regionen des Rezeptors [64]. Die relativ starre, durch die beiden Disulfidbrücken stabilisierte Tertiärstruktur des Chemokins garantiert die optimale Ausrichtung des flexiblen N-Terminus zum Rezeptor.

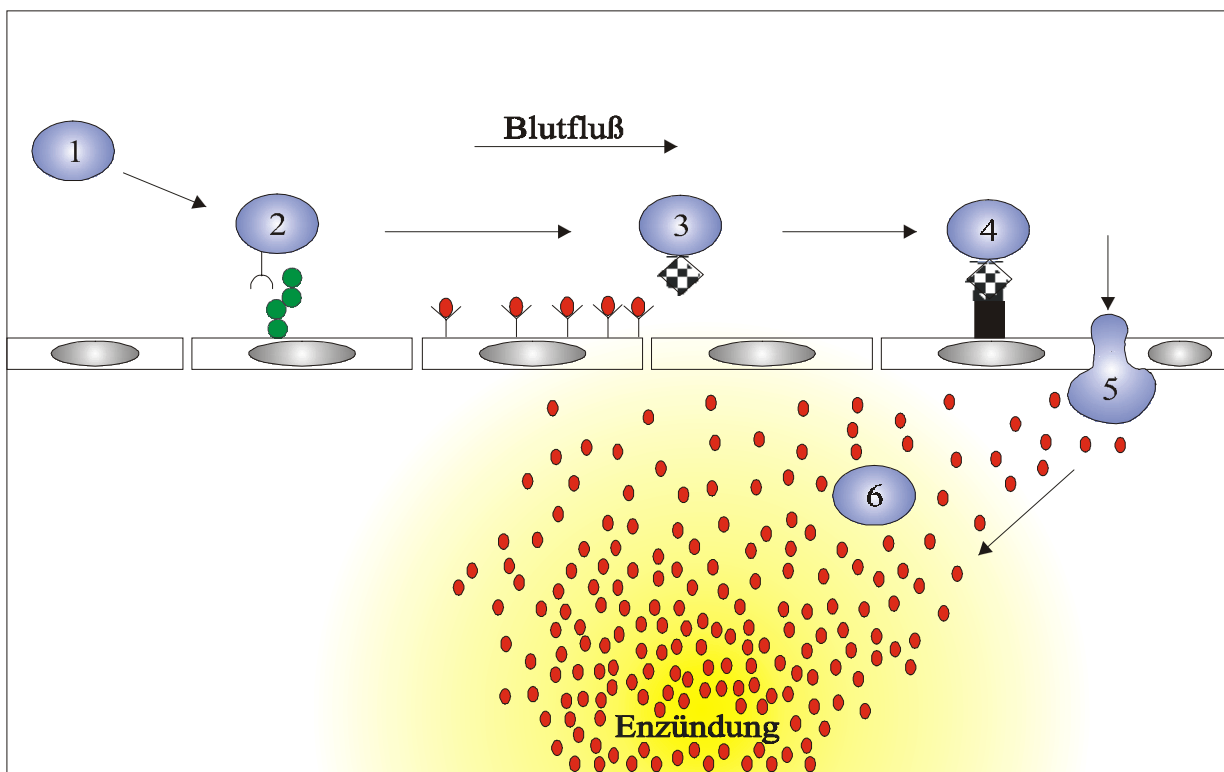
SDF-1 scheint diesem Zweistufenmodell nicht zu gehorchen [65, 66]. Ein Nonapeptid, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren von SDF-1, aktiviert den CXCR4-Rezeptor. Der unstrukturierte N-Terminus von SDF-1 scheint folglich spezifisch an den CXCR4-Rezeptor binden und diesen aktivieren zu können, ohne das eine vorausgehende Konformationsänderung des Rezeptors notwendig ist.

#### **1.4 Mechanismus der Leukozytenbewegung**

Der komplexe Vorgang der Leukozytenwanderung aus dem Knochenmark über den Blutstrom zum Entzündungsort stellt einen entscheidenden Schritt in der Immunabwehr dar. Er wird durch eine Reihe von inflammatorischen Mediatoren wie z.B. Chemokinen, die von extravaskulären und endothelialen Zellen am Entzündungsort produziert werden, vermittelt

[67]. Diese Chemokine induzieren zunächst die Expression von Selektin und CAM (immunoglobulinähnliche Zelloberflächenadhäsionsmoleküle) an der Endotheloberfläche.

Die Infiltration der Leukozyten setzt sich prinzipiell aus vier Adhäsionsschritten zusammen (Abbildung 3): Im ersten Schritt gelangt der Leukozyt aus dem lateralen Blutstrom zur Gefäßwand. Dies ist auf eine schwache Wechselwirkung zwischen den auf den Endothelzellen induzierten Selektinen und den Kohlenhydratlignanden des Leukozyten zurückzuführen. Die entstehende Bindung ist nicht stark genug, um den Scherkräften des Blutstroms zu widerstehen. Die Leukozyten rollen am Endothel entlang [68]. Im zweiten Schritt aktivieren auf dem Endothel immobilisierte Chemokine den rollenden Leukozyten. Hierdurch wird eine Konformationsänderung der an der Oberfläche des Leukozyten exprimierten Integrine initiiert, wodurch diese in eine aktive Form überführt werden.



**Abbildung 3:** Chemokin-Leukozyten-Interaktionen. 1) Frei im Blut zirkulierender Leukozyt; 2) initiale schwache Selektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen lösen das Rollen des Leukozyten auf der Oberfläche der Gefäßwand aus, hierbei werden kontinuierlich neue Bindungen geknüpft und wieder gebrochen; 3) immobilisierte Chemokine aktivieren den Leukozyten, die ausgelöste Signalkaskade führt zur Aktivierung leukozyteigener Oberflächenintegrine; 4) Stopp der Leukozytbewegung durch die feste Bindung der Integrine an CAM; 5) Diapedese durch die Zellwand; 6) Chemotaxis entlang eines Chemokingradienten zum Entzündungsort.

Es wird angenommen, daß die Aktivierung der Integrine kritisch für die optimale Diapedese ist [69, 70]. Im dritten Schritt binden die aktivierten Integrine an CAM, wodurch eine feste Adhäsion der Leukozyten zum Endothel entsteht. Die stabile Bindung zwischen diesen Molekülen beendet die Rollbewegung und ermöglicht den Leukozyten im vierten Schritt zwischen den Endothelzellen hindurchzuwandern (Extravasation). Schließlich gelangen die Leukozyten an einem vom Entzündungsort ausgebildeten Chemokin Konzentrationsgradienten entlang zum Infektionsherd.

Mehrere Chemokineigenschaften sprechen dafür, daß sie maßgeblich an der Regulation der Extravasation beteiligt sind: Nach Entzündung eines Gewebes wird eine Vielzahl unterschiedlicher Chemokine schnell transkribiert und produziert. Chemokine sind induzierbare Substanzen. So kann z.B. das proinflammatorische Chemokin IL-1 eine Kaskade weiterer Chemokinexpressionen auslösen, wohingegen immunsuppressive und antiinflammatorische Substanzen wie z.B. IL-10 die Chemokinproduktion inhibieren. Die Vielzahl der Chemokine mit spezifischen sowie überlappenden Zielzellen ermöglicht eine fein abgestimmte Immunabwehr. Chemokine werden über eine Bindung an GAG auf der Endotheloberfläche immobilisiert [71, 72]. Dies führt zur Ausbildung eines haptotaktischen Chemokingradienten, der *in vivo* eine effektive Präsentation der Chemokine zu den rollenden Leukozyten gewährleistet und eine Verdünnung durch den Blutstrom verhindert [73, 74].

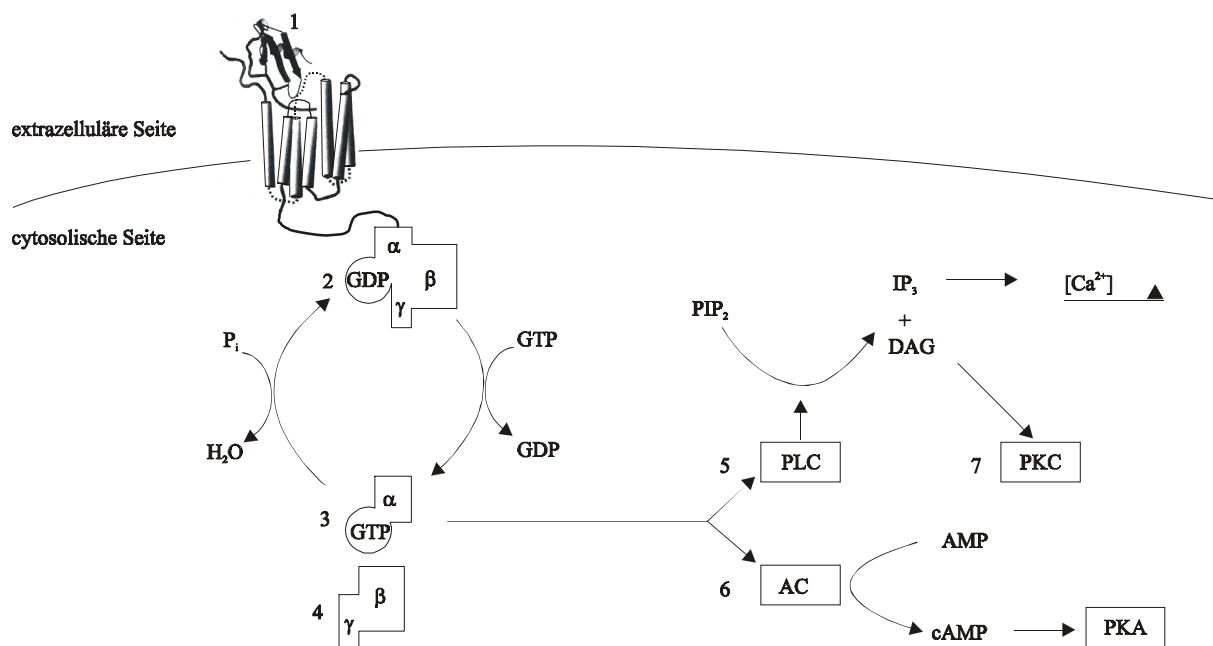
### 1.5 Mechanismus der Signaltransduktion

Die molekulare Basis der Vielzahl unterschiedlicher Effekte, die durch Chemokine in Leukozyten hervorgerufen werden, ist bisher noch nicht im Detail bekannt. Es existiert jedoch eine Modellvorstellung für die Signaltransduktion durch G-Protein gekoppelter, 7-Transmembranrezeptoren (GPCR). Die beiden klassischen Signaltransduktionswege werden über die Adenylatcyklase-C (AC) und Phospholipase-C (PLC) vermittelt. Der Ligand/Rezeptor-Komplex aktiviert hierbei nicht direkt die PLC bzw. AC. Vielmehr stimuliert der aktivierte Rezeptor durch eine Konformationsänderung das gebundene G-Protein, welches das Erregungssignal auf die PLC oder AC überträgt (Abbildung 4).

Die Adenylatcyclase-Kaskade wird über  $G_{\alpha s}$  (G-Protein Typ  $\alpha s$ )-gekoppelte Rezeptoren, die Phosphoinositidkaskade hingegen über  $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren induziert. AC bildet daraufhin zyklisches AMP (cAMP), wohingegen PLC aus Phosphatidylinositol-4,5-



biphosphat (PIP<sub>2</sub>) die intrazellulären Botenstoffe Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) generiert. Zyklisches AMP stimuliert die Phosphorylierung vieler Proteine durch die Protein-Kinase A (PKA). IP<sub>3</sub> öffnet Calciumkanäle, wodurch die rasche Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern, dem endoplasmatischen und dem sarkoplasmatischen Retikulum (Abbildung 4), induziert wird. Ca<sup>2+</sup>-abhängige Enzyme werden dementsprechend aktiviert. DAG aktiviert Ca<sup>2+</sup>-abhängige Proteinkinasen des Typs C (PKC), durch die weitere Proteine phosphoryliert werden können. Darüber hinaus sind Signalwege über MAP-Kinasen (Mitogen aktivierte Proteinkinase), vermittelt durch G-Proteine des G<sub>i</sub>βγ, G<sub>αq</sub>, G<sub>αo</sub>, oder G<sub>αs</sub>-Typs, bekannt [75].



**Abbildung 4:** Postulierter Mechanismus der Signaltransduktion in durch Chemokine aktivierten Leukozyten. Dargestellt sind zwei mögliche G-Protein gekoppelte Signaltransduktionswege über PLC und AC: Aktivierung des Serpentinrezeptors durch ein Chemokin (1). Der Ligand/Rezeptor-Komplex bindet an das bisher inaktive GDP-G-Protein (2). Freisetzung von GDP (Guanindiphosphat) und Bindung von GTP (Guanintriphosphat). Zerfall des heterotrimeren G-Proteins in eine GTP/α (3) und eine βγ-Untereinheit (4). Aktivierung der PLC (5) und AC (6) durch die GTP/α-Untereinheit.

Typische intrazelluläre Antworten nach Chemokinzugabe sind: Mobilisierung von intrazellulärem Calcium, Produktion von Arachidonsäure, Aktivierung von JAKs (Januskinasen) und STATs (signal transducers and activators of transcription) [76]. Es konnte gezeigt werden, daß RANTES in T-Zellen über GPCRs neben G-Protein gekoppelten

Signalwegen auch Tyrosinkinase aktiviert [77]. Es wird deshalb angenommen, daß die Stimulation von GPCR auch eine Aktivierung nicht G-Protein abhängiger Rezeptoren und ihrer Signalkaskaden verursachen kann, ohne daß diese durch einen spezifischen Liganden aktiviert werden [78].

## 1.6 Das humane CC-Chemokin HCC-2

Das humane CC-Chemokin HCC-2, auch Leucotactin [79], MIP-5 [80] und MIP-1 $\delta$  [81] genannt, wurde bei der näheren Genanalyse des schon bekannten CC-Chemokins HCC-1 [82] sowie alternativ über eine EST-Datenbanksuche entdeckt [80]. Bei der Vervollständigung der Sequenz der 5'-Randregion des Gens von HCC-1 wurde 12 kbp stromaufwärts auf Chromosom 17 das benachbarte Gen von HCC-2 gefunden. Es besteht im Gegensatz zu den Genen der meisten CC-Chemokine, die eine 3 Exon/2 Intron Genstruktur besitzen, aus 4 Exons und 3 Introns. Neben monocistronischen Transkripten für HCC-1 und -2 wurde auch eine bicistronische mRNA identifiziert. Dies ist von besonderem Interesse, da bicistronische mRNAs bisher vorwiegend in Bakterien und Viren beobachtet wurden, in Säugern jedoch sehr selten sind. Die Expression von HCC-2 wurde über Northern-Blotting im Darm und in der Leber detektiert. Die Familie der CC-Chemokine läßt sich aufgrund von Sequenz- und Genlokalisationshomologien in zwei Gruppen, die MCP-ähnlichen und die MIP-1 $\alpha$ /RANTES-ähnlichen Chemokine, unterteilen. HCC-2 und HCC-1 gehören zur zweiten Gruppe.

Das Gen von HCC-2 kodiert für ein 113 Aminosäuren langes Präpropeptid, in welchem die N-terminalen 21 Aminosäuren charakteristisch für ein sekretorisches Signalpeptid sind. Das Proprotein besteht daher vermutlich aus 92 Aminosäuren. Es wurden jedoch unterschiedlich N-terminal prozessierte Proteine nach Expression von HCC-2 in *Pichia pastoris* (66 Aminosäuren, Position 48-113, [82]), *Escherichia coli* (92 Aminosäuren, Position 22-113, [79]), Insektenzellen (68 Aminosäuren, Position 46-113, 92 Aminosäuren, [79]) und humanen embryonalen Nierenzellen (ca. 8 kDa, [81]) isoliert. Daher bleibt die posttranslationale Prozessierung von HCC-2 *in vivo* und damit die Länge des natürlich vorkommenden, funktionellen Proteins unbekannt. Alle drei erhaltenen HCC-2-Derivate sind biologisch aktiv. Ähnlich wie MIP-1 $\alpha$  stimuliert HCC-2 Chemotaxis und eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung in Monozyten und eosinophile Granulozyten. Lymphozyten wurden durch HCC-2 im Gegensatz zu MIP-1 $\alpha$  nur schwach aktiviert. Kreuzdesensitivierungsstudien mit MIP-1 $\alpha$  und MCP-1 an Monozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten zeigen, daß HCC-2(48-

113) vorwiegend den CCR1-Rezeptor, jedoch nicht den CCR2- und CCR3-Rezeptor aktiviert. HCC-2(22-113) und HCC-2(46-113) hingegen aktivieren auch den CCR3-Rezeptor. Obwohl HCC-2 einen Teil der Rezeptoren von MIP-1 $\alpha$  und RANTES aktiviert, deutet die klar abgegrenzte Expression in Leber und Darm darauf hin, daß das temporäre und räumlich begrenzte Vorkommen von HCC-2 *in vivo* eine nicht überlappende Funktion dieser Chemokine gewährleistet.

Eine strukturelle Besonderheit stellt die von HCC-2 ausgebildete, dritte Disulfidbrücke dar, die den C-Terminus mit dem Kern des Chemokins verbindet (**Abbildung 1**). Unter den humanen CC-Chemokinen wird diese Disulfidbrücke in konservierter Position nur noch bei Ck $\beta$ 8 und Ck $\beta$ 8-1 beobachtet [83].

## 1.7 Proteinsynthese

Komplexe biologische Prozesse, wie z.B. der Mechanismus der Ligand/Rezeptorinteraktion können durch Mutagenesestudien des Rezeptors oder des Liganden im Detail untersucht werden. Die Kenntnis funktioneller Strukturelemente beider Komponenten ermöglicht die Entwicklung von Substanzen, die diesen Prozess gezielt beeinflussen können und so wertvolle therapeutische Zielmoleküle darstellen.

Eine Voraussetzung für die Durchführung von Mutagenesestudien ist die Verfügbarkeit gezielt modifizierter Proteine. Diese müssen sich schnell, in ausreichender Reinheit und Menge darstellen lassen. Chemisch synthetische Methoden, wie die Festphasenpeptidsynthese, und die rekombinante Expression der Proteine in Wirtszellen eignen sich hierzu. Rekombinant exprimierte Proteine können im optimalen Fall direkt aus dem Zellüberstand in gefalteter Form gewonnen werden. Häufig wird jedoch die Bildung unlöslicher Proteinaggregate bzw. die Modifikation der Proteine durch posttranslationale Prozessierungen beobachtet [84, 85]. Während sich die rekombinante Expression vorwiegend auf die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren beschränkt, können bei Mutagenesestudien chemisch erzeugter Proteine eine Vielzahl speziell modifizierter Aminosäurebausteine eingesetzt werden. Eine Reihe cysteinreicher Proteine (60–238 Aminosäuren) wurde bisher erfolgreich über schrittweise Festphasenpeptidsynthesen [86, 87, 88, 89] bzw. durch Segmentkopplungsverfahren [90, 91, 92, 93] dargestellt.

## 2 Problemstellung

Bis heute wurden über 50 Chemokine entdeckt, denen ca. 11 Chemokinrezeptoren gegenüberstehen. Der molekulare Mechanismus der Chemokin-Rezeptor-Interaktion, insbesondere die Selektivität der Rezeptorerkennung und –aktivierung, ist jedoch bisher weitestgehend unbekannt. Eine genaue Kenntnis funktioneller Strukturelemente der Chemokine bzw. der Chemokinrezeptoren ist eine notwendige Voraussetzung für das Design effizienter Chemokinmimetika bzw. Antagonisten, die bei einer Reihe von Erkrankungen, wie z.B. der Therapie von HIV-Infektionen, eingesetzt werden könnten [49].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Analyse der Struktur/Aktivitätsbeziehung des humanen CC-Chemokins HCC-2. Durch Punktmutationen und N-terminale Modifikationen soll die Funktion charakteristischer Strukturelemente von HCC-2 bzw. der Chemokine im Hinblick auf die Tertiärstruktur und damit die biologische Aktivität aufgeklärt werden. Anhand der zu erzeugenden HCC-2-Derivate soll der Einfluß der ungewöhnlichen dritten Disulfidbrücke, des Aminoterminus, der bei den CC-Chemokinen konservierten Sequenzposition Tyr70 (Numerierung bezogen auf präpro-HCC-2) sowie der potentiell vorhandenen C-terminalen  $\alpha$ -Helix näher untersucht werden. Die Verfügbarkeit der betreffenden HCC-2-Derivate ist für die Aufklärung der Struktur/Aktivitätsbeziehung essentiell. Es soll daher zunächst ein chemisches Syntheseverfahren etabliert werden, das die schnelle und effiziente Darstellung dieser cysteinreichen Proteine in ausreichender Reinheit und Menge erlaubt. Insbesondere sollen so die bei der rekombinanten Expression von HCC-2 in *Pichia Pastoris*, *Escherichia coli* und Insektenzellen beobachteten unvorhergesehenen Modifikationen durch posttranslatorische Prozessierungen umgangen werden [79, 81, 82].

### 3 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden in *pro analysi* Qualität oder einem vergleichbaren Reinheitsgrad eingesetzt. Die Lösungsmittel wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Fmoc-geschützte L-Aminosäuren wurden von den Firmen Orpegen oder PerSeptive Biosystems mit folgenden Seitenkettenschutzgruppen erworben: Arg(Pbf), Asp(OtBu), Glu(OtBu), Gln(Trt), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc), Tyr(tBu), Cys(Acm), Cys(Trt). Alle TentaGel-Harze wurden von Rapp Polymere (Tübingen) hergestellt. Boc-geschützte L-Aminosäuren von der Firma Orpegen wurden mit folgenden Seitenkettenschutzgruppen eingesetzt: Arg(Tos), Asp(OBzl), Glu(OBzl), Gln(Xan), His(Tos), Lys(2-Cl-Cbz), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(2-Br-Cbz), Cys(Mob). Für die manuelle Boc-Synthese wurden ein BOC-Ile-Merrifield-Harz und ein MBHA-Harz (Senn Chemicals, Schweiz) verwendet.

#### 3.1 Peptidsynthesen

Für alle C18-HPLC-Messungen wurden zwei wässrige Elutionsmittel eingesetzt: Eluens A, 0,07-0,1% TFA; Eluens B, 0,05-0,06% TFA in MECN/H<sub>2</sub>O 80:20. Die UV-Detektion erfolgte bei 215 oder 230 nm. Analytische C18-HPLC Messungen wurden auf einer Vydac C18-Säule (The Separations Group, 4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Flußrate 0,8 ml/min) durchgeführt.

##### 3.1.1 Fmoc-Chemie

Die automatisierte Fmoc-Peptidsynthese der Peptide 1, 3-11 wurde auf einem 433-A Peptidsynthesizer (Perkin-Elmer/ABI) in Maßstäben von 0,1 und 0,5 mmol mit Syntheseyklen des Herstellers (*FastMoc 0,1 und 1 mmol Ω MonPrevPeak*) unter Verwendung von HBTU/HOBt (0,45 M in DMF) und einer frisch angesetzten Acetylierungslösung (10% Essigsäureanhydrid, 5% DIPEA, NMP) in NMP durchgeführt. Die Aminosäuren wurden in 10-fachem (Maßstab 0,1 mmol) bzw. 4-fachem (Maßstab 0,5 mmol) Überschuß eingesetzt. Bei Synthesen im Maßstab von 0,1 mmol wurde die Dauer der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe von 2,9 min auf 4,9 min verlängert. Die manuelle Fmoc-Peptidsynthese wurde analog zu dem in Tabelle 2 abgebildeten Syntheseprotokoll durchgeführt. Zur Synthese wurden TentaGel-S/R-Trt-Ile-Fmoc- (Belegungsgrad 0,13-0,21

mmol/g), TentaGel-R-Trt-Gln(Trt)-Fmoc- (Belegungsgrad 0,16 mmol/g) und TentaGel-R-Trt-Asn(Trt)-Fmoc-Harze (Belegungsgrad 0,17 mmol/g) eingesetzt.

**Tabelle 2:** Syntheseprotokoll der manuellen Fmoc-Synthese.

Syntheseschritt	Zugegebene Reagenzien	Zeit/Durchführung
Abspaltung der Fmoc-Gruppe	20% Piperidin in NMP	15 min, rühren
Waschen	1. NMP, 2. iPrOH, 3. NMP	pro Lösungsmittel 2 x 3 min
Kopplung der Aminosäure	aktivierte Aminosäure*	30-45 min, rühren
Waschen	1. NMP, 2. iPrOH, 3. NMP	pro Lösungsmittel 2 x 3 min
Kopplungswiederholung der Aminosäure	aktivierte Aminosäure*	40-60 min, rühren
Acetylierung	10% Essigsäuranhydrid, 5% DIPEA in NMP	15 min, rühren
Waschen	1. NMP, 2. iPrOH, 3. NMP	pro Lösungsmittel 2 x 3 min

\*Voraktivierung der Fmoc-Aminosäure: Strategie 1 für [Ala<sup>64,104</sup>, Cys(Acm)<sup>53,77</sup>]HCC-2(48-113) (Ansatz 0,5 mmol): 4 eq Aminosäure in 9 eq einer 1 M DIPEA-Lösung (im NMP) und 0,5 eq HOBt (0,5 M in NMP) lösen. 4,5 eq TBTU (0,25 M in NMP) zugeben. Die Aminosäure 2-3 min voraktivieren.

Strategie 2 für HCC-1, Kopplung von Lys<sup>61</sup>(Ansatz: 0,1mmol): Zu einer Lösung aus Fmoc-Lys(Boc)-OH (5 mmol in 2-5 ml DCM/wenig DMF) wird DCC (Dicyclohexylcarbodiimid; 2,375 mmol in DCM) gegeben. Nach 10 bis 15 min wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Präzipitat in wenig DMF aufgenommen. Der Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat, das das symmetrische Anhydrid der Aminosäure Fmoc-Lys(Boc)-OH enthält, direkt eingesetzt (erste Kopplung 4 h, zweite Kopplung 15 h).

### Entblockierung und Abspaltung vom Harz

Nach beendeter Peptidsynthese wurden alle Harz je zweimal mit NMP, Isopropanol, NMP und TBME gewaschen und kurz unter einem N<sub>2</sub>-Strom oder Luft getrocknet. Im Anschluß wurden die Harze der HCC-2-Derivate in einer frisch angesetzten Lösung aus TFA, H<sub>2</sub>O, EDT und Phenol (88:5:5:2, v,v,v,w) für 2-4 h unter kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur abgespalten (1 g Harz/30 ml). Beim HCC-1-Harz wurde im Gegensatz zu HCC-2 das beste Ergebnis mit einer Abspalllösung bestehend aus TFA:EDT:H<sub>2</sub>O:Benzymercaptan (85:5:5:5, v:v:v:v) erzielt (1 g/30 ml). Anschließend wurden

die Abspalllösungen separat filtriert und das Peptid durch Tropfen in eisgekühlten TBME ausgefällt. Das resultierende Rohpeptid wurde durch Zentrifugieren isoliert, zweimal mit TBME gewaschen und über Nacht im Excikator getrocknet.

Alle Rohpeptide waren in H<sub>2</sub>O unlöslich. Zur weiteren Reinigung wurden sie in TFA gelöst und mit MeCN (1:1) verdünnt. Die resultierende Lösung wurde weiter mit H<sub>2</sub>O (1:1) verdünnt und direkt auf einer präparativen C18 Vydac-Säule (47 x 300 mm, 300 Å, 15-20 µm, Flußrate 50 ml/min; Gradient: 35-45-60%B in 0-10-40 min) gereinigt. Fraktionen die das reduzierte Peptid enthielten (bestimmt durch ESMS und analytische C18-HPLC, Gradient: 20-60% B in 30 min), wurden vereinigt und lyophilisiert.

Das bei der Segmentkopplung *native chemical ligation* eingesetzte Peptid A wurde mit einer Lösung aus TFA:H<sub>2</sub>O:EDT (90:5:5, v:v:v) für 1 h seitenkettenentschützt. Die Suspension wurde anschließend in eisgekühltem TBME ausgefällt, das Harz abfiltriert und im Exzikator getrocknet. Die Qualität des harzgebundenen Peptids wurde durch eine Testabspaltung überprüft. Eine kleine Harzmenge (ca. 100 µg) wurde mit 1 M NaOH (2-3 ml) bei RT abgespalten, nach 1 bis 3 min mit TFA vorsichtig angesäuert und lyophilisiert. Die Qualität des Rohprodukts wurde durch analytische C18-HPLC (Gradient: 5-70% B in 50 min) und ES-MS analysiert.

### 3.1.2 Boc-Chemie

Die manuelle Peptidsynthese basierend auf Boc-Chemie wurde in einer sonderangefertigten Glasfritte, durch die wahlweise von unten abgesaugt oder Stickstoff zur Durchmischung eingeleitet werden konnte, analog zu dem in Tabelle 3 dargestellten Syntheseprotokoll durchgeführt. Die Kopplungseffizienz jeder Aminosäure wurde qualitativ durch einen Ninhydrintest verfolgt. Bei unvollständiger Acylierung wurde die Kopplung nach 1 h wiederholt. Es wurde ein BOC-Ile-OH-PAM-Harz (0,5 mmol/g) und ein MBHA-Harz (0,27 mmol/g) eingesetzt.

Die Peptide A-D (Abbildung 10, Abbildung 11) wurden über eine *in situ*-Neutralisation [94] analog zu dem in Tabelle 4 beschriebenen Syntheseprotokoll dargestellt. Es wurden TentaGel-S-SH oder TentaGel-S-S-Trt-Harze (Belegungsgrad 0,26 bzw. 0,22 mmol/g) eingesetzt. Das TentaGel-S-S-Trt-Harz wurde direkt vor der ersten Aminosäurekopplung entschützt, um eine

mögliche Oxidation des Thiolinkers zu vermeiden. Hierzu wurde das Harz für 2 h mit einer Lösung aus TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1:1):Phenol:Anisol:H<sub>2</sub>O (92,5:2,5:2,5:2,5, v:w:v:v) bei RT geschüttelt. Nach 1 h wurde die gelbe Suspension durch Titrieren mit Triethylsilan entfärbt. Anschließend wurde das Harz je sechsmal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und dem in der Kopplung eingesetzten Lösungsmittel NMP gewaschen.

**Tabelle 3:** Syntheseprotokoll für die manuelle Boc-Synthese von HCC-2(48-113)

Syntheseschritt	Zugegebene Reagenzien	Zeit/Durchführung
Abspaltung der BOC-Gruppe	60% TFA/0,5%Anisol (v:v) in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30 min, rühren
Waschen	1. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 2. iPrOH	pro Lösungsmittel 2 x 5 min
Neutralisieren des Harzes	10% TEA in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 min
Neutralisieren des Harzes	10% TEA in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9 min, rühren
Harzprobe entnehmen		
Kopplung der Aminosäure	aktivierte Aminosäure*	60 min, rühren
Waschen	1. DMF, 2. MeOH, 3. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	pro Lösungsmittel 2 x 5 min
Ninhydrintest**		
Kopplungswiederholung der Aminosäure	aktivierte Aminosäure*	60-120 min, rühren
Acetylierung	30% Essigsäureanhydrid, 5-10% DIPEA in NMP	15 min, rühren
Ninhydrintest**		
Waschen	1. MeOH, 2. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	pro Lösungsmittel 2 x 5 min

\*Voraktivierung der Boc-Aminosäure (Ansatz: 2,5 mmol): 2 eq Aminosäure in 4eq DIPEA und 0,5 eq HOBt (0,5 M in DMF) lösen. 2 eq HBTU (0,5 M in DMF) zugeben. Die Aminosäure 2-3 min voraktivieren.

\*\*Ninhydrintest [95]



**Tabelle 4:** Protokoll für die manuelle Synthese von HCC-2-Derivaten durch *in situ*-Neutralisation.

Syntheseschritt	Zugegebene Reagenzien	Zeit/Durchführung
Abspaltung der BOC-Gruppe	60% TFA/0,5% Anisol (v:v) in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10 min, rühren
Waschen	1. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 2. iPrOH, 3. NMP	pro Lösungsmittel 2 x 3 min
Kopplung der Aminosäure	aktivierte Aminosäure* DIPEA	40 min, rühren
Waschen	1. NMP, 2. iPrOH, 3. NMP	pro Lösungsmittel 2 x 3 min
Kopplungswiederholung der Aminosäure	aktivierte Aminosäure* DIPEA	40-60 min, rühren
Acetylierung	10% Essigsäuranhydrid, 5% DIPEA in NMP	15 min, rühren
Waschen	1. NMP, 2. iPrOH, 3. NMP	pro Lösungsmittel 2 x 3 min

\*Voraktivierung der Boc-Aminosäure (Ansatz: 0,25 und 0,39 mmol): Strategie 1: 5 eq Aminosäure direkt in 10 eq DIPEA und 5 eq HBTU/HOBt (0,45 M in DMF) lösen, die Aminosäure 2-3 min voraktivieren.

Strategie 2: 2 eq Aminosäure direkt in 4 eq DIPEA und 2eq HBTU/HOBt (0,45 M in DMF) lösen, die Aminosäure 2-3 min voraktivieren. 2 eq DIPEA zur Neutralisation des Harzes zugeben. Die Aminosäure wird 20 min umgesetzt, keine Kopplungswiederholung.

#### Entblockierung und Abspaltung vom Harz

Die nach den Boc-Synthesen erhaltenen Harze wurden im Vakuum mit flüssiger Flußsäure (5-10% Anisol) für 60-75 min bei ca. 0 °C entschützt (3 g Harz/30 ml HF). Anschließend wurde die Flußsäure umkondensiert. Das Peptid/Harz-Gemisch wurde in 100 ml wasserfreiem Diethylether aufgenommen, filtriert, mehrmals mit Diethylether gewaschen und an Luft getrocknet. Zur Extraktion des vom Harz abgespaltenen Peptids wurde der entstandene Feststoff in 5% Essigsäure aufgenommen (2 g/200 ml) und ca. 60 min gerührt. Das Harz wurde abfiltriert und die Peptidlösung gefriergetrocknet. Die entstandenen Rohprodukte wurde nach der Totalsynthese von HCC-1 und HCC-2 durch LCMS analysiert.

Die Qualität der seitenkettenentschützten Rohprodukte von PeptidA/B-[COS]-S-TentaGel wurde durch eine Testabspaltung überprüft. Eine kleine Harzmenge (ca. 100 µg) wurde mit 1 M NaOH (2-3 ml) bei RT abgespalten, nach 1 bis 3 min mit TFA vorsichtig angesäuert und lyophilisiert. Die Qualität der Rohprodukte wurde durch analytische C18-HPLC (Gradient, soweit nicht anders angegeben: 20-60-100% B in 0-40-50 min) und ES-MS analysiert.

### 3.1.3 Intermolekulare, indirekte *native chemical ligation* am Harz

Die Peptidthioester A bzw. B (0,01 mmol) wurde mit Peptid C oder D (0,01 mmol) in 3-4 ml eines frisch mit Helium entgasten Puffers, bestehend aus 6 M GdnHCl/0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:2% Thiophenol:1% Benzylmercaptan (v:v:v, pH=7,5), bei RT unter Luftausschluß umgesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde durch analytische C18-HPLC (Gradient: 20-60-100% B in 0-40-50 min) und LCMS verfolgt. Nach 24 h wurde die Reaktion durch Ansäuern mit TFA gestoppt. Das Harz wurde abzentrifugiert, die Lösung nochmals filtriert und mit einer 6 M GdnHCl/0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung auf eine präparative Vydac C18-Säule (20 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Flußrate 7 ml/min) aufgetragen und getrennt (Gradient: 10-60-100% in 0-50-60 min). Fraktionen, die Ligationsprodukte enthielten, nachgewiesen durch ESMS und analytische C18-HPLC, wurden vereinigt und lyophilisiert.

### 3.1.4 Oxidative Faltung linearer Chemokine

Der Verlauf der oxidativen Proteinfaltung wurde in Gegenwart von Luft oder einem Redoxsystem in Phosphatpuffer (Puffer1; 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 mM EDTA; pH = 7,4) bei 4 °C, 20 °C und 37 °C untersucht. Als Redoxsysteme wurden GSH/GSSG; Cys/Cys<sub>2</sub> oder DTT/DTT<sub>ox</sub> mit einer resultierenden Konzentration von 0,2 mM:0,1 mM; 0,3 mM:0,15 mM oder 0,2 mM:0,1 mM in dem mit Helium frisch entgasten Puffer eingesetzt. Das beste Faltungsergebnis wurde in Gegenwart des Redoxsystems Cys/Cys<sub>2</sub> erzielt.

Bei analytischen Ansätzen (100 µg Peptid) wurde das reduzierte Peptid direkt in dem Phosphatpuffer gelöst (0,05 µg/µl) und unter Luftausschluß für mehrere Tage gerührt. Bei präparativen Ansätzen (ca. 20 mg) wurde das Edukt zunächst in 1-2 ml eines zweiten Phosphatpuffers (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 mM EDTA), der mit TFA auf einen pH-Wert von ca. 2 eingestellt worden war, gelöst. Die entstandene Lösung wurde anschließend langsam mit Puffer 1 verdünnt (0,1 µg/µl) und unter Luftausschluß für zwei Tage gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde über die Veränderung des C18-HPLC-Profiles (Nucleosil PPN, Macherey & Nagel, 2 x 250 mm, 100 Å, 5 µm; Gradient: 35-45% B in 30 min) verfolgt. Bei

der Faltung von HCC-2(52-113), daß durch Boc-Chemie dargestellt wurde, wurde ein leicht modifizierter Gradient (30-50% B in 40 min) eingesetzt. Die Identität des resultierenden Produktes wurde im Fall von Peptid 1 durch eine HPLC-Koelution mit rekombinant erzeugtem HCC-2(48-113) und bei Peptid 2 durch HPLC-Koelution mit synthetisch dargestelltem [Ala64,104]HCC-2(48-113) verifiziert. Präparative Mengen des Produktes wurden nach Ansäuern der Reaktionslösung mit TFA über eine C18 Vydac-Säule (20 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Flußrate 7 ml/min; Gradient: 30-50% B in 50 min) gereinigt, durch ES-MS identifiziert und lyophilisiert.

Bei Peptid 4 wurde eine andere Faltungstaktik gewählt: Das Rohpeptid der Fmoc-Synthese wurde direkt bei RT in 8 M GdnHCl (pH=7-7,5) gelöst und nach 30 min bei 0 °C mit H<sub>2</sub>O auf eine GdnHCl-Konzentration von 2 M verdünnt. Nach weiteren 2 h wurde die Lösung auf 0,2 M GdnHCl verdünnt und über Nacht gerührt. Im Anschluß wurde das gefaltete Produkt durch drei RP-Chromatographien (C18 Vydac-Säulen) gereinigt.

### 3.1.5 Oxidation freier Cysteine durch Luft, DMSO oder Luft/Aktivkohle

Das Peptid wurde in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (10 mM, pH=7,8) in einer Konzentration von 0,5 µg/µl gelöst. Freie Thiolseitenketten wurden alternativ durch Luft, durch Luft/Aktivkohle (Aktivkohle:Peptid 1:1, w:w, [96]) oder durch DMSO (20%, 97) oxidiert. Die resultierende Lösung bzw. Suspension wurde für mehrere Stunden bei RT intensiv gerührt und der Fortschritt der Reaktion durch analytische C18-HPLC (Gradient: 20-60% B in 30 min) verfolgt. Nach beendeter Oxidation (Luft, 2-4 d; Luft/Aktivkohle, 4 h; DMSO, 4 h) wurde die Lösung mit TFA angesäuert, gegebenenfalls filtriert und 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Das monozyklische Peptid wurde über eine präparative C18 Vydac-Säule (20 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Flußrate 7 ml/min; Gradient: 20-35-50% B in 0-15-40 min) gereinigt, durch ES-MS identifiziert und lyophilisiert..

### 3.1.6 Iodoxidation Acm-geschützter Cysteine

Zur Abspaltung zweier Acm-Schutzgruppen unter Bildung einer Disulfidbrücke wurde eine 0,05 M Iodlösung in Essigsäure vorbereitet. Pro Acm-Schutzgruppe wurden 20 eq Iod mit dem Peptid in einer Lösung aus 0,1 M HCl:Eisessig (1:4, v:v) zur Reaktion gebracht (Peptidkonzentration: 0,5 µg/µl). Der Fortschritt der Reaktion wurde durch analytische C18-HPLC (Gradient: 20-70-100% B in 0-30-35 min) verfolgt und die Reaktion nach 1-2 h durch Zugabe von Ascorbinsäure (0,1 M) beendet. Im Anschluß wurde die Reaktionslösung mit

H<sub>2</sub>O verdünnt (1:1) und direkt auf einer präparativen C18 Vydac-Säule (20 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Flußrate 7 ml/min; Gradient: 20-35-50-80% B in 0-10-40-50 min) gereinigt. Fraktionen die das oxidierte Produkt enthielten, nachgewiesen durch ESMS und analytische C18-HPLC (Gradient: 20-60% B in 30 min), wurden vereinigt und lyophilisiert.

### 3.1.7 Reduktion von Disulfidbrücken

Die Disulfidbrücken wurden mit Dithiotreitol (DTT) reduziert. Hierzu wurde das Peptid in einem 0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer (0,5 µg/µl, pH=8,3) gelöst und bei 60 °C für 1,5 h mit einem großen Überschuß DTT (100-300eq) reduziert. Anschließend wurde die Lösung mit TFA angesäuert und das Produkt über eine präparative C18 Vydac-Säule (10 x 250 mm, 300 Å, 5 µm, Flußrate 3 ml/min; Gradient: 35-50-100% B in 0-30-40 min) isoliert und lyophilisiert.

## **3.2 Analytische Methoden**

### 3.2.1 Massenspektrometrie

Die Molekulargewichte aller Peptide und Peptidfraktionen wurde mit einem Elektrospray-Massenspektrometer (Perkin Elmer, Sciex API 100) bestimmt. Zur Analyse komplexer Reaktionsmischungen wurden LCMS-Messungen an demselben Gerät durchgeführt.

Für ES-MS-Messungen wurde das salzfreie, lyophilisierte Peptid in 50 bis 100 µl eines Puffers, bestehend aus H<sub>2</sub>O:MeCN (1:1, 0,2% HCOOH ), aufgenommen und mit einer Flußrate von 0,03 ml/min in die Elektrospray-Ionenquelle eingebracht. Die Orifice-Spannung lag in einem Bereich zwischen 100 und 180 V. Während der Messung wurden Scans von 400 bis 2900 Atommasseneinheiten (Da) mit dem Programm LC2 Tune 1.2 des Herstellers aufgenommen. Die resultierenden Massenspektren wurden mit dem Programm BioMultiview 1.2 ausgewertet.

LCMS-Messungen wurden mit dem Programm Sample Control 1.2 ausgeführt. Hierbei wurden die Peptide einer Peptidlösung (20 µl) durch eine C18 Nucleosil 100 Säule (1 x 250 mm, 120 Å, 3 µm, Flußrate 20 µl/min; Gradient, soweit nicht anders angegeben: 10-80-100% B in 0-65-70 min) getrennt und direkt im API 100 analysiert. Die Einstellungen am API 100 wurden analog zur ES-MS Messung gewählt.

### 3.2.2 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Die Reinheit der Syntheseprodukte wurde durch eine Kapillarzonenelektrophorese (P/ACE System 2100, Beckmann) überprüft. Hierzu wurde eine unbeschichtete, 47 cm lange *Fused Silica*-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  eingesetzt. Die Peptide wurden durch eine Druckinjektion in die Kapillare eingebracht und bei einem konstantem Stromfluß von 120 A für 20 min in einem Phosphatpuffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /0,02% Hydroxymethylpropylcellulose, pH=2,5) im elektrischen Feld getrennt. Die UV-Detektion erfolgte bei 200 bzw. 214 nm.

### 3.2.3 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wurden Tricin-Gele (Quervernetzungsgrad 16%) in Elektrophoresekammern von BioRad eingesetzt [98]. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 1,5 bis 2 h. Die Gele wurden anschließend für 2-4 h durch den Farbstoff Comassie (1% Comassie brilliant blue:25% Isopropanol:7% Eisessig in  $\text{H}_2\text{O}$ , w:v:v:v) angefärbt. Im Anschluß wurde überschüssiger Farbstoff mit einer Lösung aus  $\text{H}_2\text{O}$ :Essigsäure:Methanol (70:30:10) innerhalb von ca. 1 h entfernt und das resultierende Gel in 5% Essigsäure konserviert.

### 3.2.4 Größenausschluß-Chromatographie

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes bzw. des Oligomerisierungszustandes der HCC-2-Derivate Peptid 1,2 und 4 wurde eine Größenausschluß-Chromatographie unter Verwendung einer Superdex 75 Säule (Pharmacia, Freiburg) auf einem Smart-System (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt (Tabelle 5). Die UV-Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 214 nm. Da der Oligomerisierungsgrad der Peptide durch vielfältige Faktoren wie z.B. die Salz- und Ionenstärke und den pH-Wert des Puffers beeinflusst wird, wurde ein dem Blut ähnlicher Puffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ /50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH=7,4) eingesetzt. Zur Eichung der Säule wurde ein Eichsatz bestehend aus folgenden Proteinen verwendet: Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsin A (24 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa). Zusätzlich wurde Ubiquitin (8,5 kDa) zur näheren Eichung des unteren Molekularbereichs eingesetzt. Anhand der resultierenden Eichgerade kann das Molekulargewicht (MW) der zu untersuchenden Probe bestimmt werden, da der Verteilungskoeffizient ( $K_{av}$ ) direkt

proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes der Probe ist. Der Verteilungskoeffizient wird mit folgender Gleichung bestimmt:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

mit  $K_{av}$  Verteilungskoeffizient  
 $V_e$  Elutionsvolumen (Retentionszeit x Flußrate)  
 $V_t$  Säulenvolumen  
 $V_0$  Ausschlußvolumen

Das Ausschlußvolumen des Systems wurde bei der Firma Pharmacia erfragt:  $V_0=0,8$  ml. Es wurde folgende Eichgerade bestimmt:

$$K_{av} = 0,71405 - 0,31223 \times \log(MW).$$

**Tabelle 5:** Molekulargewichtsbestimmung durch Größenausschluß-Chromatographie

Substanz	Retentionszeit (min)	Elutionsvolumen (ml)	Verteilungskoeffizient ( $K_{av}$ )	MW (Da)	MW <sub>theoretisch</sub> (Da)
Peptid 4	34,2	1,378	0,375	11.499	10.157
Peptid 1	36,5	1,460	0,430	9.658	7.206
Peptid 2	36,6	1,464	0,433	9.074	7.142

### 3.2.5 Aminosäureanalyse

Der Aminosäuregehalt der Produkte wurde durch eine automatisierte Aminosäureanalyse (ASA) an einem Aminoquant 1090L Analysator (Hewlett-Packard, Waldbronn) bestimmt. Das Peptid wurde hierbei einer sauren Hydrolyse (6 M HCl, 1,5 h bei 150 °C) unterworfen. Nach der Hydrolyse wurden die Aminosäuren durch o-Phtalaldehyd zu fluoreszierenden Isoindol-derivaten umgesetzt. Durch den Vergleich der Retentionszeiten der Isoindolderivate mit einem internen Standard, bestehend aus Norvalin und Sarcosin, konnte die Art und Menge der Aminosäurederivate durch eine analytische C18-HPLC-Analyse (AminoQuant RP C18, 2,1 x 200 mm, Flußrate 0,45 ml/min, Gradient 0-60% B in 17 min, UV-Detektion bei 338 nm) bestimmt werden.

### 3.2.6 Sequenzierung durch Edman-Abbau

Die Sequenzanalyse wurde auf einem Gasphasen-Protein-Sequenzer Modell 473A (Perkin-Elmer/ABI) durchgeführt. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mittels der Modell 610A Data Analysis Software (Version 1.2.1, ABI). Die N-terminalen Aminosäuren wurden schrittweise durch eine Reaktion mit Phenylisothiocyanat (PITC) unter Bildung von Phenylthiohydantion(PTH)-Derivaten abgebaut [99]. Das in H<sub>2</sub>O gelöste Peptid wurde hierzu auf eine Polybrene-beschichtete Glasfasermembran aufgetragen. Die Analyse der PTH-Derivate erfolgte über ein C18-HPLC-System. Durch einen Vergleich mit dem Elutionsprofil eines PTH-Aminosäurestandardgemisches wurden die abgebauten Aminosäuren identifiziert.

### 3.2.7 Enzymatische Spaltung synthetischer Peptide durch Trypsin

Peptide wurden nach einer Vorschrift des Herstellers mit Trypsin verdaut. Das Enzym wurde in 1 mM HCl, die Proteine in einem Verdaupuffer bestehend aus 100mM Tris-HCl (pH=8,5) gelöst. Das Enzym wurde zur Peptidlösung zugegeben (Enzym:Peptid, 1:20, w:w) und die Lösung für 3-5 h bei RT inkubiert. Die entstehenden Fragmente wurden durch eine analytische C18-HPLC getrennt (Gradient: 20-60-100% B in 0-30-40 min) und durch ES-MS analysiert.

## **3.3 Strukturaufklärung**

Die Strukturuntersuchungen wurden von Dr. H. Sticht, Lehrstuhl für Biopolymere, Arbeitskreis Prof. P. Rösch an der Universität Bayreuth durchgeführt. Die Details der Durchführung der NMR-Messungen und die Strukturberechnungen von HCC-2 und Mutanten wurden bereits veröffentlicht [100].

### 3.3.1 NMR-Spektroskopie

Ein- und zweidimensionale homonukleare NMR-Spektren wurden auf einem Bruker DRX Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 600 MHz, einer spektralen Weite von 7201,6 Hz und mit 1024-2048 bzw. 256-512 komplexen Datenpunkten in F2 und F1 aufgenommen. Die Peptide wurden in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1 (v/v, pH=3) oder D<sub>2</sub>O (99,9%) gelöst, so daß eine Peptidkonzentration von 0,4 mM-0,9 mM (1D-NMR) bzw. 1,3-2 mM (TOCSY, NOESY, COSY) resultierte. Es wurden TOCSY-Experimente mit 80 ms Mischzeit sowie ein doppelquantengefiltertes (DQF)-COSY aufgenommen. NOESY-Spektren wurden mit 120

und 200 ms Mischzeit aufgenommen. Experimente in D<sub>2</sub>O wurden an einem Bruker AMX400 Spektrometer gemessen. Langsam in D<sub>2</sub>O austauschende Amidprotonen wurden aus einer Serie kurzer TOCSY-Spektren (ca. 4 h) identifiziert. Zusätzlich wurde ein NOESY-Spektrum (80 ms Mischzeit) und ein COSY45-Spektrum (Pulswinkel 45°) aufgenommen. Der Einfluß der Salzkonzentration des Lösungsmittels auf die Struktur von HCC-2 wurde durch eine schrittweise Erhöhung der NaCl-Konzentration bis zu 700 mM untersucht. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programmpaket NDee (SpinUp, Dortmund).

### 3.3.2 Strukturberechnung

Die NOE-Kreuzresonanzen wurden gemäß ihrer Stärke in drei Distanzklassen eingeteilt, denen bestimmte Distanzintervalle zugewiesen wurden: stark ( $d < 2.7 \text{ \AA}$ ), mittel ( $d < 3.5 \text{ \AA}$ ) und schwach ( $d < 5.0 \text{ \AA}$ ) [101]. Kopplungskonstanten zwischen dem Amid- und dem C $\alpha$ -Proton von  $< 6 \text{ Hz}$  oder  $> 8 \text{ Hz}$  wurden gemäß der Karplusbeziehung in  $\phi$ -Winkel konvertiert [102].  $\chi^1$ -Torsionswinkel wurden aus der Kopplungskonstanten zwischen dem C $\alpha$ -Proton und den C $\beta$ -Protonen abgeleitet [103]. Wasserstoffbrücken wurden in der letzten Runde der Strukturberechnung berücksichtigt, wenn sowohl ein langsamer Austausch des entsprechenden Amidprotons als auch die Geometrie zwischen Donor- und Akzeptorgruppe für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke sprachen [102]. Die Berechnung der endgültigen Strukturen basierte auf 776 Abstandsinformationen aus NOE-Daten, 53 Beschränkungen der dihedralen Winkel, sowie 21 Wasserstoffbrücken.

Die Strukturberechnung erfolgte mit dem Programmpaket X-PLOR 3.851 [104] nach der Strategie des Simulated Annealing. Das verwendete Protokoll [105, 106] besteht aus einer Hochtemperatur-Simulation (40 ps Moleküldynamik bei 2000 K), die dem Absuchen des Konformationsraums dient, sowie einer Abkühlungsphase zum Auffinden des Energieminimums (45 ps Moleküldynamik mit schrittweisem Abkühlen von 2000 K auf 100 K). Besonderheiten des Protokolls beinhalten eine automatische Zuordnung von prochiralen Gruppen [107], sowie eine vereinfachte Repräsentation der nichtkovalenten Wechselwirkungen in der Hochtemperaturphase [108], die die Konvergenz des Algorithmus erhöht. Von den 100 im letzten Lauf berechneten Strukturen wurden die 30 Strukturen, die die niedrigste Energie und die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten aufwiesen, für die weitere Analyse ausgewählt.



### 3.4 Charakterisierung der biologischen Aktivität

#### 3.4.1 Zellkultur

Die Suspensionszelllinie THP-1 (DMSZ, Braunschweig) wurde in einem Medium bestehend aus 20% fötalem Kälberserum (Bio Whittaker, Belgien) in RPMI-Medium 1640 (PAA, Hannover) gehalten. Zusätzlich wurde dem Medium L-Glutamin (1%, Bio Whittaker, Belgien) und das Antibiotikum Penicillin/Streptomycin (1%, PAA, Hannover) zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank bei einer CO<sub>2</sub>-Luftkonzentration von ca. 5% und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 80% gehalten und in regelmäßigen Abständen (ca. 10<sup>7</sup> Zellen/ml) passagiert.

#### 3.4.2 Chemotaxis

Die Chemotaxisversuche wurden von Dr. U. Forssmann am Theodor-Koch-Institut in Bern durchgeführt. Monozyten wurden analog zu Standardprotokollen aus Blut isoliert [20]. Chemotaxisversuche wurden auf einer 48-Well Kammer (Neuroprobe, Cabin John, MD) an eine polyvinylpyrrolidonfreien Polycarbonatmembran (PFPV-Membran, 5 µm Porengröße) durchgeführt. Pro Well wurden 5 x 10<sup>4</sup> Zellen in RPMI-Medium (0,1% BSA) eingesetzt. Alle Versuche wurden in Triplika ausgeführt. Die migrierten Zellen wurden nach 1 h Inkubation bei 37 °C auf der Membran mit DIFF-Quick<sup>®</sup> analog zu einem Protokoll des Herstellers (Dade Diagnostika) angefärbt. Pro Well wurden fünf Augenfelder mit einer 1000-fachen Vergrößerung ausgezählt.

#### 3.4.3 Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung

Die Veränderung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels wurde in THP-1 Zellen auf einem FLPR<sup>96</sup>-System (Fluorometric Imaging Plate Reader) bei einer Laserintensität von 0,4 bis 0,8 W gemessen. Die THP-1 Zellen wurden mit Fluo-4 für 30 min bei 37 °C beladen. Hierfür wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen in einer Lösung bestehend aus 9,5 µl Fluo-4 (5 µg Fluo-4 in je 22 µl DMSO/Pluronic F127) in 21 ml HBSS/20 mM Hepespuffer (2% FCS, 2% Hepes, 1% Probenicid [0,7 g in je 5 ml H<sub>2</sub>O/1 M NaOH]; pH=7,4) inkubiert. In Abständen von 10 min wurden abgesetzte Zellen vorsichtig resuspendiert. Im Anschluß wurden die Zellen 5 min abzentrifugiert (500 x g), zweimal mit einem Puffer bestehend aus HBSS/20 mM Hepes (1% Hepes, 1% Probenicid) gewaschen und in 30 ml dieses Puffers resuspendiert. Die Zellen wurden auf schwarzen 96-Well-Platten (Costar) mit 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well (150 µl)

ausplattiert, 3 min zentrifugiert (300 x g) und vor der Messung für 10 bis 15 min bei 37 °C inkubiert.

Die Verdünnungsreihen der Chemokine wurden in einer 96-Well-Applikationsplatte (50 µl ± 5 µl pro Messung/Probe) vorbereitet. Die Nullfluoreszenz der beladenen Zellen lag zwischen 10.000 und 15.000 Zählern (Anregungszeit 0,2 sec).

Die Fluoreszenzänderung innerhalb der Zellen wurde binnen 4,5 min verfolgt, wobei Datenpunkte zunächst alle 6 sec (Scan 1-10), jede Sekunde (Scan 11-100) und schließlich wieder alle 6 sec (Scan 101-120) aufgenommen wurden. Nach Scan 12 erfolgte die Zugabe der Chemokinlösung mit einer Geschwindigkeit von 30 µl/sec. Als Positivkontrolle wurde ATP (Adenosintri-phosphat) eingesetzt. Die erhaltenen Daten wurden mit der FLPIR-Control Software Version 1.12 ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Synthese von HCC-2, HCC-1 und Derivaten

Voraussetzung für die Untersuchung der Struktur/Aktivitätsbeziehung von HCC-2 ist die Verfügbarkeit der zu charakterisierenden Substanzen. Aus diesem Grund sollte eine effiziente, chemische Totalsynthese von HCC-2 am Beispiel von HCC-2(48-113) und [Ala64,104]HCC-2(48-113) entwickelt werden, die die bei der rekombinanten Expression auftretenden Modifikationen durch posttranslationale Prozessierungen umgeht [79, 81, 82]. Da die cysteinreichen Chemokine „schwierige“ synthetische Zielmoleküle darstellen, mußte die Synthese jedes Proteins individuell optimiert werden. Aus diesem Grund wurde HCC-2 über Fmoc-Chemie, Boc-Chemie und durch eine konvergente Strategie, die seitenkettenentschützte Segemente verwendet (*native chemical ligation*, [109]), synthetisiert.

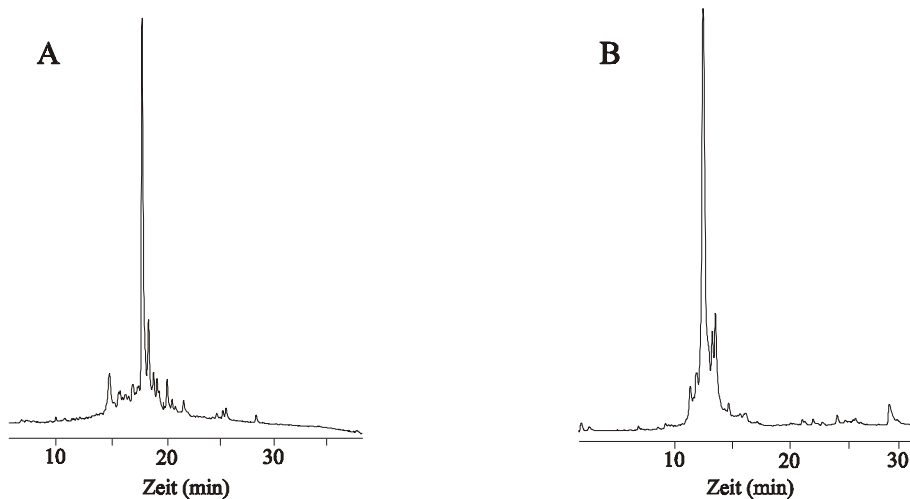
#### 4.1.1 Fmoc-Schutzgruppentaktik

HCC-2(48-113) wurde durch Fmoc-Chemie mit HBTU-Aktivierung und Trt-geschützten Cysteinen durch Doppelkopplungszyklen dargestellt. Das resultierende Rohprodukt wurde in TFA gelöst und mit ES-MS und C18-HPLC analysiert. Es zeigte sich, daß bei der Synthese nur geringe Mengen des Produkt, aber ein breites Spektrum von Nebenprodukten gebildet wurde. Die Qualität des Rohproduktes war so minderwertig, daß das gewünschte Produkt HCC-2(48-113) nicht isoliert werden konnte. In cysteinreichen Polypeptiden kann es nach der Abspaltung vom Harz zu einer unspezifischen Aggregation des Rohpeptids durch ungeschützter Thiolgruppen kommen. Dies kann durch eine Blockierung der Cysteinseitenketten mit abspaltbaren Schutzgruppen unterbunden werden [110, 111]. In weiteren Syntheseversuchen wurden daher alle sechs Cysteine mit Acn- und alternativ mit tert-Buthylthio-Schutzgruppen geschützt. Die Qualität des nach der Abspaltung vom Harz erhaltenen Rohpeptids verbesserte sich dadurch jedoch nicht.

Um einen ersten Hinweis auf Sequenzbereiche zu erhalten, in denen es vermehrt zu unvollständigen Acylierungen kommt, wurden der N-Terminus (Sequenzposition 48-76) und der C-Terminus (Sequenzposition 77-113) von HCC-2 einzeln synthetisiert. ES-MS und HPLC-Analysen der entsprechenden Rohprodukte zeigten, daß die Hauptpeaks den erwarteten Produkten entsprechen (Abbildung 5). Es konnten eine Reihe von Fehlsequenzen

und Abbruchpeptiden eindeutig identifiziert werden. Während der Totalsynthese von HCC-2(48-113) akkumulieren offensichtlich diese Nebenprodukte, so daß ein Rohpeptid minderer Qualität entsteht. Bei der Synthese des N-Terminus wurden nicht umgesetzte Aminogruppen nach jeder Kopplung zusätzlich durch einen Acetylierungsschritt mit Essigsäureanhydrid blockiert. Hierbei entstanden neben dem Produkt fast ausschließlich N-terminal acetylierte Abbruchsequenzen, die im Gegensatz zu Fehlsequenzen schnell und eindeutig durch ES-MS charakterisiert und chromatographisch abgetrennt werden konnten.

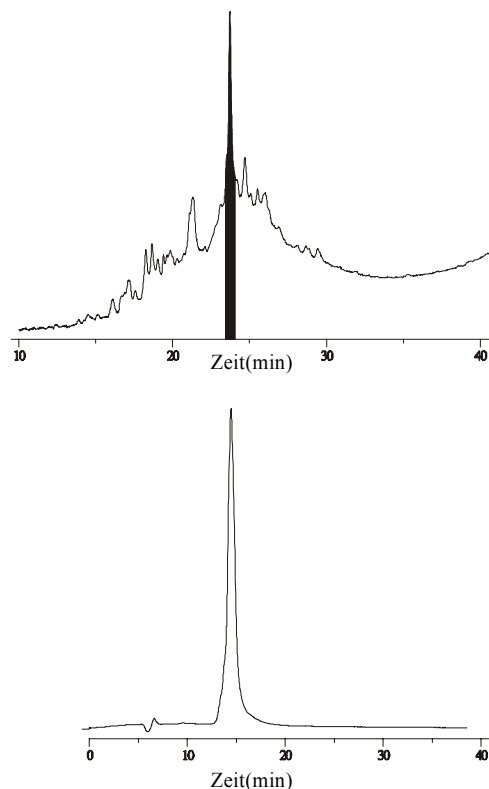
Um das Auftreten von Fehlsequenzen zu verringern, wurde [Ala64,104]HCC-2(48-113) mit einem kontinuierlichen Acetylierungsschritt nach jeder Kopplung dargestellt. Die LCMS- und ES-MS-Analysen des erhaltenen Rohpeptids zeigten, daß acetylierte Abbruchpeptide vorwiegend in den beiden Regionen von Gln60 bis Tyr70 und Cys77 bis Arg90 auftreten. Diese „schwierigen“ Bereiche werden wahrscheinlich durch die Bildung von Sekundärstrukturen verursacht.



**Abbildung 5:** Analytisches C18-HPLC-Profil des Rohprodukts der Synthese von (A) [Ala64]HCC-2(48-76) und (B) HCC-2(77-113).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde folgende optimierte Synthesestrategie für HCC-2 und seine Derivate etabliert: Alle Cysteine werden Trt-geschützt eingesetzt. Die Aminosäuren von Gln60 bis Tyr70 und Cys77 bis Arg90 werden doppelt gekoppelt. Die zweite Kopplung der Aminosäuren Ser64 und Arg90, die beide sehr unvollständig umgesetzt wurden, wird um 2 h verlängert. Nach jeder Acylierung werden alle nicht umgesetzten Aminogruppen durch eine Acetylierung mit Essigsäureanhydrid blockiert.

Durch die optimierte Fmoc-Synthesestrategie wurden Rohpeptide von HCC-2 und der HCC-2-Derivate erhalten, aus denen die linearen Peptide in ausreichender Menge und Reinheit chromatographisch isoliert werden konnten (Abbildung 2, Tabelle 1).



**Abbildung 6:** Analytisches C18-HPLC-Profil eines durch die optimierte Fmoc-Synthese dargestellten reduzierten Peptids am Beispiel von HCC-2(48-113). Oben: Rohpeptid direkt nach der Abspaltung vom Harz. Die produktenthaltende Fraktion ist schwarz unterlegt. Unten: chromatographisch gereinigtes HCC-2(48-113). Zur Einführung der Disulfidbrücken wurden Peptide dieser oder ähnlicher chromatographischer Reinheit eingesetzt.

Im Anschluß wurde anhand eines zweiten Chemokins, HCC-1(25-93), untersucht, in wieweit die systematische Optimierungstaktik der HCC-2 Synthese auf andere Proteine angewendet werden kann. Analog zu HCC-2 wurde zunächst der C-Terminus von HCC-1 (Aminosäuren Gln58-Asn93) mit HBTU-Aktivierung, Trt-geschützten Cysteinen und einem kontinuierlichen Acetylierungsschritt nach jeder Einzelkopplung durch Fmoc-Chemie dargestellt. Durch eine LCMS-Analyse des Rohpeptides konnten unvollständig koppelnde Sequenzbereiche des C-Terminus identifiziert werden. Eine Totalsynthese von HCC-1(25-93) mit Doppelkopplung der schwierigen C-terminalen Sequenzabschnitte zeigte, daß es nach Pro62 trotz einer um 2 h verlängerten Doppelkopplung von Lys61 zu einem fast vollständigem Kettenabbruch kommt.

Um dieses Problem zu umgehen wurde der C-Terminus, jedoch nur bis zur kritischen Aminosäure Pro62, erneut dargestellt. Die LCMS-Analyse einer Testabspaltung zeigte, daß die Fmoc-Schutzgruppe nach Pro62 nur unvollständig, d.h. sehr langsam, abgespalten wird. Nach einer erneuten manuellen Fmoc-Abspaltung mit Piperidin wurde Lys61 durch Aktivierung mit HATU und alternativ als symmetrisches Anhydrid gekoppelt. Das bessere Kopplungsergebnis wurde mit dem symmetrischen Anhydrid erzielt. Die Synthese wurde anschließend maschinell mit Doppelkopplungen nach jedem weiteren Prolin bis zur kompletten Sequenz von HCC-1(25-93) fortgeführt.

Basierend auf den Ergebnissen der Synthese und der ES-MS-Analyse der acetylierten Nebenprodukte resultierte folgende optimierte Synthesestrategie für HCC-1(25-93): Alle Cysteine werden Trt-geschützt eingesetzt. Die Synthese wird nach Pro62 unterbrochen. Lys61 wird nach erneuter Abspaltung der Fmoc-Gruppe manuell über ein symmetrisches Anhydrid gekoppelt. Anschließend wird die Synthese am automatischen Peptidsynthesizer fortgesetzt. Die Aminosäuren Ser25, Gly28, His31, Lys43, Ile44, Ser57 bis Ile64, Thr68, Asn77 und Val83 bis Asp85 werden doppelt gekoppelt. Die Aminosäure Ser60 wird vierfach gekoppelt. Die Kopplungszeit der zweiten Acylierung von Gly28, His31, Lys43, Ile44, Ser57 bis Lys61 und Asn77 wird um 2 h (bei Cys59 um 1 h) verlängert.

Durch diese optimierte Synthesestrategie wurde HCC-1(25-93) erfolgreich dargestellt. Die LCMS-Analyse zeigte, daß der Hauptpeak des Rohpeptids dem erwarteten Produkt entspricht. Das reduzierte Peptid konnte durch einen chromatographischen Reinigungsschritt in befriedigender Menge und Reinheit isoliert werden (Tabelle 1).

Die Ergebnisse der Fmoc-Synthesen zeigen, daß Proteine bestehend aus bis zu 70 Aminosäuren durch eine systematische Optimierung der Fmoc-Chemie schnell und zuverlässig dargestellt werden können. Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, zunächst die schwierigen Sequenzbereiche der ersten ca. 30 Aminosäuren zu untersuchen und darauf aufbauend die Totalsynthese des Proteins zu etablieren. Entscheidend für die eindeutige Identifikation schwieriger Sequenzbereiche über MS-Techniken und eine Isolierung des Rohpeptids ist ein Acetylierungsschritt nach jeder Kopplung. Basierend auf der Analyse schwieriger Sequenzbereiche kann eine effiziente schrittweise Peptidsynthese durch eine Verbesserung der Acylierungseffizienz unvollständig koppelnder Aminosäuren etabliert

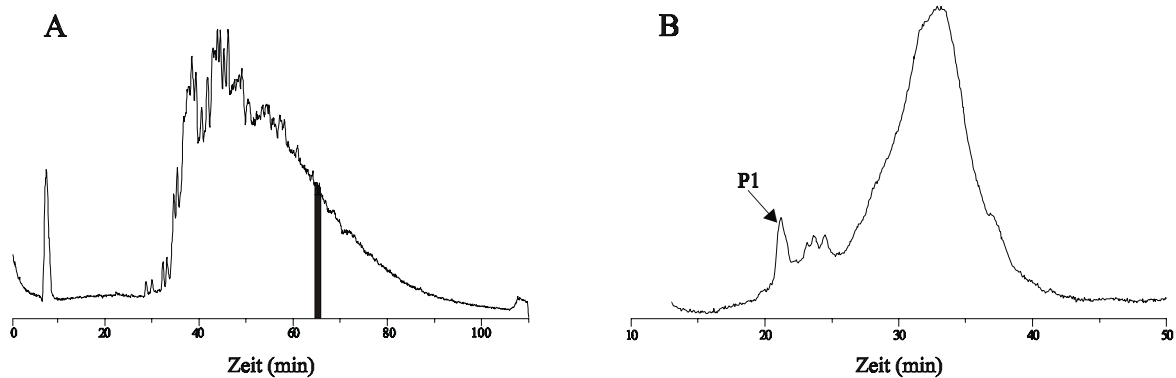
werden. Hierzu können Doppelkopplungszyklen oder eine alternative Aktivierung der Aminosäure eingesetzt werden.

#### 4.1.2 Boc-Schutzgruppentaktik

HCC-2(52-113) und HCC-1(25-93) wurden manuell durch Anwendung der Boc-Chemie mit HBTU-Aktivierung und Mob-geschützten Cysteinen dargestellt. Der Verlauf der Acylierung jeder Aminosäure wurde durch einen qualitativen Ninhydrintest kontrolliert. Nach 1 h wurde abhängig vom Ergebnis des Tests eine zweite Kopplung durchgeführt, deren Verlauf regelmäßig durch weitere Ninhydrintests verfolgt wurde. Verließ die Acylierung nur langsam, wurde die Aminosäure über Nacht weitergekoppelt. Nicht umgesetzte Aminogruppen des Harzes wurden anschließend mit Essigsäureanhydrid blockiert. Der Verlauf der Synthese wurde durch Testabspaltungen kleiner Harzmengen nach je 20 Aminosäuren überprüft.

Nach der Abspaltung vom Harz mit HF und Extraktion der Peptide zeigte eine Analyse der Rohprodukte durch HPLC, Gelelektrophorese und LCMS ein breites Spektrum unterschiedlicher Produkte, wie Fehlsequenzen, Abbruchsequenzen und Schutzgruppenaddukten. HCC-1(25-93) und HCC-2(52-113) konnten nur als Nebenprodukte der Synthese identifiziert werden (Abbildung 7). Das Rohprodukt aus der Synthese von HCC-2(52-113) wurde anschließend direkt oxidativ gefaltet (siehe 4.3). Nach einem chromatographischen Reinigungsschritt und einer ES-MS-Analyse der Fraktionen konnten ca. 200 µg des zyklischen Produkts isoliert werden.

Trotz der qualitativen Kontrolle der Acylierungseffizienz der Aminosäuren, können die angestrebten Proteine über Boc-Chemie bisher nicht in ausreichender Menge und Reinheit dargestellt werden. Der Ninhydrintest ist demnach kein eindeutiger Nachweis für eine vollständige Umsetzung freier Aminogruppen am Harz. Ein Teil der Nebenprodukte ist vermutlich auf die Standardabspaltung des Peptids mit Flußsäure zurückzuführen. Analog zur systematischen Optimierung der auf Fmoc-Chemie basierten Synthesestrategie müßten die einzelnen Abschnitte der Boc-Synthese in Zukunft eingehender untersucht werden, um die Proteine HCC-1 und HCC-2 auf diesem Weg darstellen zu können. Die zeitaufwendige Optimierung dieser zweiten schrittweisen Peptidsynthese wurde nicht weiter verfolgt.



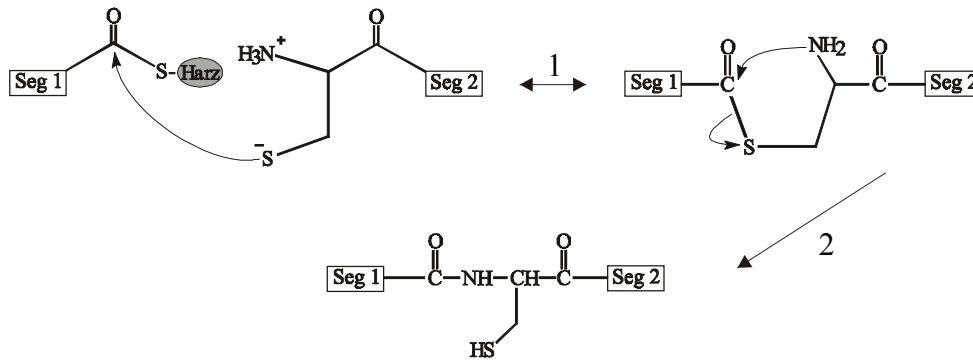
**Abbildung 7:** Verlauf der Boc-Synthese von HCC-2(52-113). (A) LCMS-Analyse des reduzierten Rohpeptids (Gradient: 10-60% B in 100 min). Die das Produkt enthaltene Fraktion ist grau unterlegt. (B) C18-HPLC-Analyse der oxidativen Faltung des Rohpeptids. Neben oxidierten Nebenprodukten bildet sich innerhalb eines Tages das korrekt verbrückte Produkt (P1, Gradient: 30-50% B in 40 min).

#### 4.1.3 Die Segmentkopplung *native chemical ligation*

Eine alternative Synthesestrategie zum Aufbau großer Peptide ist die *native chemical ligation*, die anhand der von der HCC-2 Sequenz abgeleiteten Modellpeptide A-D untersucht wurde (Abbildung 10, Abbildung 11). Die Ligation der beiden seitenkettenentschützten Peptidsegmente wurde direkt am Harz durchgeführt (Abbildung 8, [112]). Hierbei spaltet die Cysteinkomponente (Peptid C/D, Seg2) nukleophil das harzgebundene Thioestersegment (Peptid A/B, Seg1) ab. Durch eine sich anschließende 5-Ring-Umlagerungsreaktion wird eine native Peptidbindung zwischen beiden Segmenten gebildet, ohne die Chiralität der beteiligten Aminosäuren zu beeinflussen [109]. Da das Thioesterpeptid (Seg1) direkt in der Ligation eingesetzt wird, ist die Darstellung eines qualitativ hochwertigen Edukts entscheidend.

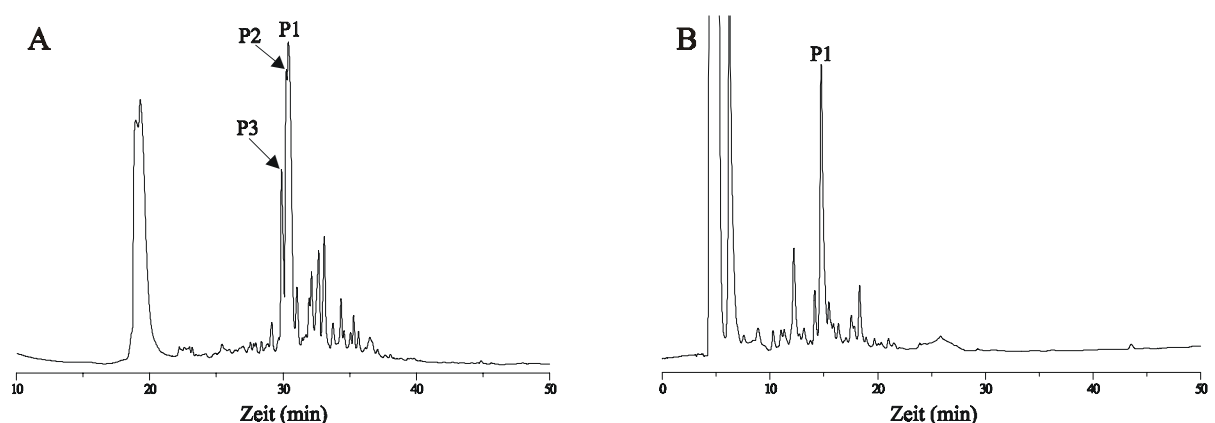
Das Thioesterpeptid der Ligation wird über einen Thiolinker an das Harz gebunden, der vor der Peptidsynthese separat synthetisiert, charakterisiert und am Harz fixiert werden mußte. Es sind mehrere Methoden zur Darstellung Boc-kompatibler Thiolinker bekannt [112, 113]. Im Gegensatz dazu, wurde in dieser Arbeit ein schon über einer Thiolinker funktionalisiertes, in der Segmentkopplung jedoch unerprobtes TentaGel-S-SH/TentaGel-S-S-Trt-Harz eingesetzt. Zunächst wurde untersucht, mit welcher Schutzgruppenchemie sich die N-terminalen Modellpeptide A und B am TentaGel-S-SH-Harz am günstigsten darstellen lassen.





**Abbildung 8:** Mechanismus der *native chemical ligation*. (1) Zuerst greift das N-terminale Cystein des wasserlöslichen, C-terminalen Segments (Seg2) nukleophil die Thioestergruppe des harzgebundenen N-terminalen Segments (Seg1) an und spaltet so das Thioesterpeptid vom Harz ab. (2) Anschließend wird durch eine spontane 5-Ring-Umlagerungsreaktion eine native Peptidbindung zwischen beiden Segmenten geknüpft.

Peptid A wurde im Peptidsynthesizer durch Fmoc-Chemie (Peptid A1) und manuell über *in situ*-Neutralisation (Peptid A2, [94]) dargestellt. Die Seitenkettenschutzgruppen wurden abgespalten und die Qualität der Rohprodukte durch die Abspaltung einer kleinen Harzmenge mit Natronlauge überprüft. Die HPLC- und ES-MS-Analyse beider Peptide zeigte, daß sowohl mit Fmoc- als auch mit Boc-Chemie neben dem gewünschten Produkt C-terminal verkürzte Peptidfragmente entstehen (Abbildung 9). Peptid A1 enthält neben dem erwarteten Produkt zwei weitere Hauptprodukte, die um zwei bzw. drei Aminosäuren C-terminal verkürzt sind. Bei der Boc-Synthese entsteht ein Hauptprodukt mit der molekularen Masse des erwarteten Produkts.



**Abbildung 9:** Analytisches HPLC-Profil des Rohpeptids A: (A) Fmoc-Chemie. Neben dem Produkt (P1) entstehen zwei weitere Hauptprodukte, die um zwei bzw. drei Aminosäuren C-terminal verkürzt sind (P2, P3). (B) Boc-Chemie. Der Hauptpeak (P1) enthält das reduzierte Peptid A.

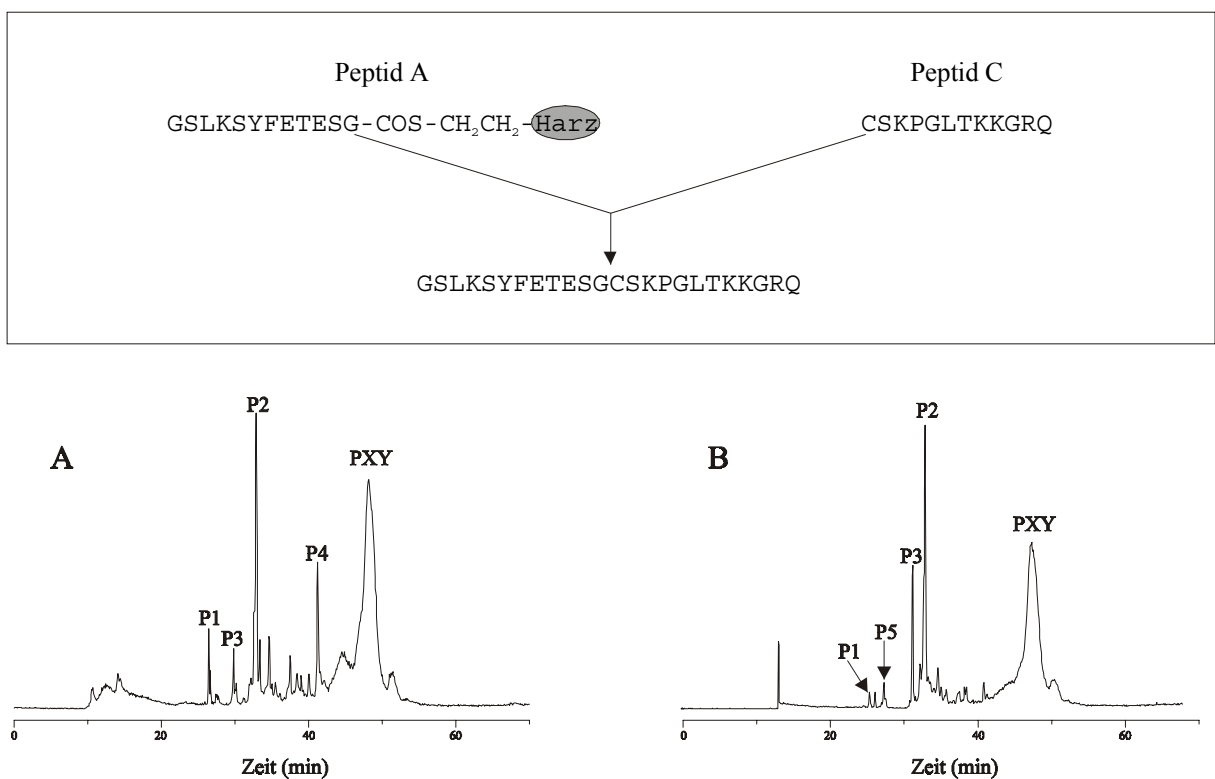
Durch eine nukleophile Abspaltung des Thioesterpeptids vom Harz und einer nachfolgenden Kopplung einer aktivierten Aminosäure an den nun erneut freien Thiolinker können im Laufe der Synthese C-terminal verkürzte Peptidfragmente am Harz aufgebaut werden. Als Nukleophile können die bei der Acylierung im Überschuß eingesetzten Aminosäuren oder die in der Fmoc-Synthese eingesetzte Base Piperidin agieren. Es wurde daher überprüft, welchen Einfluß der Aminosäureüberschuß und die Kopplungszeit auf die Bildung C-terminal verkürzter Fragmente haben. Hierzu wurde Peptid B mit Strategie 2 (siehe 3.1.2) durch *in situ*-Neutralisation dargestellt. Durch HPLC- und ES-MS-Analyse des Rohpeptids konnte gezeigt werden, daß trotz einer kurzen Kopplungszeit und einem geringen Aminosäureüberschuß C-terminal verkürzte Fragmente entstehen. Gleichzeitig wurden N-terminal acetylierte Fragmente identifiziert, die ca. 50% des Rohpeptids ausmachen.

Diese ersten methodischen Untersuchungen verdeutlichen, daß sich thiofunktionalisierte TentaGel-S-Harze zur Darstellung von Thioesterpeptiden eignen, wodurch die zeitraubende Synthese eines Thiolinkers entfällt. Jedoch kann die Bildung C-terminal verkürzter Peptidfragmente nicht verhindert werden. Bei der Synthese muß ein Kompromiß zwischen einem Produktverlust bedingt durch eine unvollständige Acylierung oder durch eine C-terminale Verkürzung eingegangen werden. Die bei der Fmoc-Chemie eingesetzte nukleophile Base Piperidin führt vermutlich zusätzlich zu C-terminal verkürzten Produkten, so daß die Boc-Chemie zur Darstellung des N-terminalen Segments geeigneter erscheint. Anhand weiterer Untersuchungen muß verifiziert werden, ob die Fmoc-Synthese durch den Einsatz einer nicht nukleophilen Base wie z.B. DBU oder durch eine Verkürzung des Abspaltungsschritts mit Piperidin verbessert werden kann.

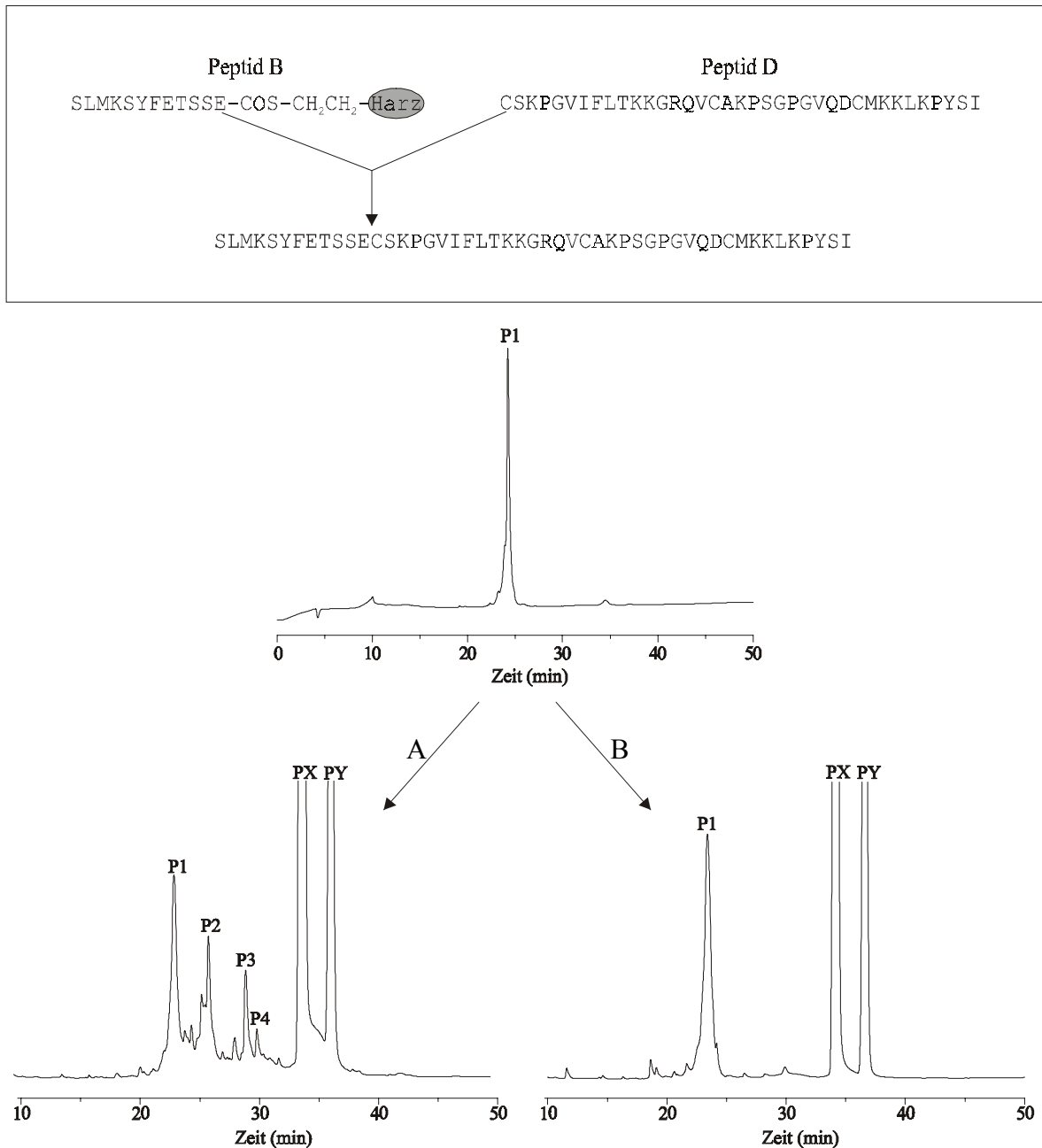
Das N-terminale Segment der Ligation wurde am Peptidsynthesizer über Fmoc-Chemie mit HBTU Aktivierung dargestellt. Die Segmentkopplung am Harz wurde indirekt in Gegenwart von Thiophenol und Benzylmercaptan in einem GdnHCl-Puffer (pH=7,4) unter Luftausschluß durchgeführt und der Verlauf der Ligation über C18-HPLC und LCMS verfolgt. Im Laufe der Ligation der beiden kurzen Modellpeptide A und C bildet sich innerhalb von 24 h das erwartete Produkt (P2, Abbildung 10). Nach 5 h ist deutlich ein Zwischenprodukt zu erkennen, daß durch die nukleophile Abspaltung von Peptid A durch Thiophenol entsteht. Die Präsenz des Peptidylphenylthioesters deutet darauf hin, daß dieser Thioester und nicht das direkt am Harz gebundene Peptid das reaktive Ligationsedukt ist. Ein aktives Zwischenprodukt bestehend aus einem Peptidylbenzylthioesters konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere

Produkte, die aus der Ligation C-terminal verkürzter Peptidfragmente mit Peptid C resultieren, wurden ebenfalls identifiziert. Nach einer chromatographischen Reinigung wurde das Ligationsprodukt der Peptide A und C mit einer Ausbeute von etwa 39% erhalten. In Gegenwart von Luft wurde die Homodimerisierung des löslichen C-terminalen Peptidsegments beobachtet.

Anschließend wurde die Segmentkopplung zwischen HCC-2(65-76) (Peptid B) und HCC-2(96-113) (Peptid D) untersucht (Abbildung 11). Im Laufe von 24 h war die Ligation dieser Peptide in GdnHCl-Puffer nahezu vollständig. Ohne Zusatz des chaotropen Salzes GdnHCl erfolgt keine Reaktion.



**Abbildung 10:** Oben: Schematische Darstellung der bei der Ligation eingesetzten Edukte Modellpeptide A und C und des entstehenden Produkts. Unten: LCMS-Analyse der Segmentkopplung; (A) nach 5 h ist aus dem Dodekapeptid C (P1) und dem harzgebundenen Peptid A das gewünschte Produkt, bestehend aus 24 Aminosäuren (P2) entstanden. Zusätzlich wurde ein Ligationsergebnis, hervorgegangen aus der Ligation eines C-terminal verkürzten Thioester mit Peptid C, identifiziert (P3): GSLKSY-CSKPGLTKKGRQ. Der bei der Ligation aktive Thioester (P4) wird durch die Abspaltung von Peptid A mit Thiophenol gebildet. (B) Nach 24 h ist die Reaktion beendet. Neben P2 und P3 hat sich ein weiteres Ligationsergebnis (P5) aus einem C-terminal verkürzten Thioester und Peptid C gebildet: GSLKS-CSKPGLTKKGRQ. Benzylmercaptan und Thiophenol eluieren zuletzt (PXY).



**Abbildung 11:** Oben: Schematische Darstellung der bei der Ligation eingesetzten Edukte Modellpeptid B und D und des entstehenden Produkts HCC-2(65-113). Darunter: Analytisches C18-HPLC-Profil der Segmentkopplung; oberes Chromatogramm: Peptid D in Lösung (P1). Untere Chromatogramme: Reaktionsweg A; Ligation in GdnHCl/Phosphatpuffer; nach 30 h haben sich das Ligationsprodukt (P2), ein Mercaptophenoladdukt des Ligationsprodukts (P3) und das Thiophenylzwischenprodukt von Peptid B (P4) gebildet. Reaktionsweg B; Ligation in Phosphatpuffer; nach 30 h ist kein Produkt entstanden. Benzylmercaptan und Thiophenol eluieren zuletzt (PX, PY).

Das aus 49 Aminosäuren bestehende Produkt degradiert im Verlauf der folgenden 2-4 Tage, indem es Addukte mit den in hohem Überschuß vorhandenen Thiolen Benzylmercaptan und

Thiophenol bildet. Eine chromatographische Reinigung der Ligationsprodukte sofort nach beendeter Reaktion ist daher grundsätzlich angebracht.

Diese ersten Versuche zur *native chemical ligation* zeigen, daß das Cystein des C-terminalen Segments nicht nur Peptidthioester, die über Glycin an das Harz gebunden sind, angreifen kann sondern auch die sterisch anspruchsvolleren Aminosäuren Tyrosin, Serin und Glutaminsäure. Auf diesem Weg wurde HCC-2(65-113), d.h. 74% der Sequenz von HCC-2(48-113), im analytischen Maßstab schnell und einfach dargestellt.

#### 4.2 HCC-2-Derivate zur Untersuchung der Struktur/Aktivitätsbeziehung

Zur Analyse der Struktur/Aktivitätsbeziehung von HCC-2 wurden zehn Derivate dargestellt, in denen charakteristische Strukturelemente der Chemokine durch Punktmutation bzw. N-terminale Verkürzungen modifiziert wurden (Abbildung 12).

In Peptid 2 und 3 wurden die Cysteine 64 und 104 durch die sterisch ähnliche Aminosäure Alanin bzw. durch Asparaginsäure substituiert, um den Einfluß der dritten Disulfidbrücke auf die Struktur und Aktivität zu untersuchen. Beide Peptide enthalten die für alle Chemokine typischen vier Cysteine in konservierter Position. Bei Peptid 3 können durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen an der Stelle der Disulfidbrücke gezielt negative Ladungen erzeugt werden, die zu einer Abstoßung der ehemals verbrückten Peptidregionen um Position 64 und 104 führen. N-terminal modifizierte HCC-2 Derivate (Peptid 4-9) wurden dargestellt, um in Folgearbeiten den Mechanismus der Rezeptoraktivierung durch HCC-2 näher charakterisieren zu können. Basierend auf dem Zweistufenbindungsmodell der Chemokine, wird angenommen, daß eine sukzessive Verkürzung des Aminoterminus zu einem Verlust der Rezeptoraktivierung, jedoch nicht der Rezeptorbindung führt. In Peptid 10 wurde das bei allen CC-Chemokinen konservierte Tyr70 gegen das in dieser Position bei den CXC-Chemokinen konserviert vorliegende Leucin ausgetauscht. Hierdurch sollte untersucht werden, ob diese Aminosäure eine entscheidende Rolle bei der Rezeptorselektivität der CC- und CXC-Chemokine spielt. Um die Funktion der C-terminalen  $\alpha$ -Helix eingehender zu untersuchen, wurde Peptid 11 dargestellt. Cys104 wurde durch ein Prolin ersetzt. Da die Seitenkette des Prolins eine Ringstruktur bildet, indem sie sowohl mit dem Stickstoffatom als auch mit dem  $\alpha$ -Kohlenstoff verbunden ist, ist diese Aminosäure mit der Bildung einer  $\alpha$ -Helix inkompatibel.

Über die optimierte Fmoc-Synthesestrategie wurden mit Ausnahme der Peptide 2 und 4 alle Derivate von HCC-2(48-113) am Peptidsynthesizer dargestellt (Tabelle 1). Die Peptide 1, 3, 4, 8, 10 und 11 wurden jeweils im Maßstab von 0,1 mmol, die N-terminal modifizierten Peptide 5, 6, 7 und 9 wurden in einem Ansatz von 0,5 mmol dargestellt. Nach Erreichen der gewünschten Peptidlänge wurde jeweils 0,1 mmol des Harzes aus dem Reaktor entnommen und separat weiterverarbeitet. Peptid 2 wurde ebenfalls durch die optimierte Fmoc-Synthesestrategie manuell in einem Maßstab von 0,5 mmol synthetisiert. Da es anschließend für die regioselektive Synthese der beiden Disulfidbrücken eingesetzt wurde, lagen die Cysteine 53 und 77 Acm-geschützt vor (siehe 4.3). Peptid 4 wurde in einem Maßstab von 0,1 mmol unter Durchlauf von Doppelkopplungszyklen aller Aminosäuren ohne einen Acetylierungsschritt maschinell aufgebaut und direkt aus dem resultierenden Rohpeptid oxidativ mit Luft in Gegenwart von GdnHCl gefaltet.

3. Disulfidbrücke	2 [Ala64,104]HCC-2(48-113)	HFAADCCTSYISQSIPASLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDAMKCLKPYSI
	3 [Asp64,104]HCC-2(48-113)	HFAADCCTSYISQSIPDLSMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDDMKCLKPYSI
	4 HCC-2(22-113)	SFHFAADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKCLKPYSI QFTNDAETELMMSKLPLENPVVLN
	5 HCC-2(46-113)	SFHFAADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKCLKPYSI
Rezeptoraktivierung	1 HCC-2(48-113)	HFAADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKCLKPYSI
	6 HCC-2(49-113)	FAADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKCLKPYSI
	7 HCC-2(50-113)	AADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKCLKPYSI
	8 HCC-2(51-113)	ADCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKCLKPYSI
	9 HCC-2(52-113)	DCCTSYISQSIPCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKCLKPYSI
Rezeptorselektivität	10 [Leu70]HCC-2(48-113)	HFAADCCTSYISQSIPCSLMKSLFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKCLKPYSI
$\alpha$ - Helix	11 [Ala64,Pro104]HCC-2(48-113)	HFAADCCTSYISQSIPASLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDEMKCLKPYSI

**Abbildung 12:** Sequenz und Numerierung der durch Fmoc-Chemie dargestellten HCC-2 Derivate zur Untersuchung der Struktur/Aktivitätsbeziehung. Die Derivate sind in Gruppen nach Art der Mutation angeordnet. Der Einfluß der dritten Disulfidbrücke (Peptid 2, 3) und der  $\alpha$ -Helix (Peptid 11) soll untersucht werden. Weiterhin soll die Rezeptorselektivität (Peptid 10) und Rezeptoraktivierung (Peptid 4-9) anhand einer Einzelmutation und durch Veränderung der Länge des N-Terminus charakterisiert werden.

**Tabelle 6:** Ausbeute und Charakterisierung aller über die optimierte Fmoc-Chemie dargestellten und anschließend gefalteten Proteine.

Nr.	Peptid	Ausbeute des linearen Peptids	Anzahl der Isomere nach der Faltung	Menge /Ausbeute	Endprodukt			
					Reinheit (%) [durch CZE]	Peptidgehalt (%)	MW (Da)	MW <sub>calc.</sub> (Da)
	HCC-1(25-93)	131	1	2,34 mg /12%	90	X	8128	8127
1	HCC-2(48-113)	72	1	4,9 mg /24%	96	68,1	7206	7206
2	[Ala64,104]HCC-2(48-113)	nicht präparativ	1	nicht präparativ	X	X	7145	7144
3	[Asp64,104]HCC-2(48-113)	71	3	Isomer 1+2: 5,6 mg /28% Isomer 3: 5,85 mg /29%	50** 90	X X	7232 7232	7232 7232
4	HCC-2(22-113)	X	1	ca. 0,5 mg	81	X	10157	10157
5	HCC-2(46-113)	58	1	3,04 mg /15%	98	59,7	7441	7441
6	HCC-2(49-113)	35	1	10,69 mg /54%	92	67,6	7069	7069
7	HCC-2(50-113)	57	1	4,94 mg /25% 6 mg /30%*	96	73,3	6922	6922
8	HCC-2(51-113)	72	1	10 mg /50%*	98	71,8	6850	6851
9	HCC2(52-113)	31	1	4,97 mg /25%	98	63,7	6780	6780
10	[Leu70]HCC-2(48-113)	82	1	6,52 mg /33%*	97	79,2	7157	7156
11	[Ala64,Pro104]HCC-2(48-113)	92	3	Isomer 1: 1,29 mg /7% Isomer 2: 1,59 mg /8%	~50** ~60**	X X	7171 7171	7170 7170

Die Ausbeute der oxidativen Faltung bezieht sich auf 20 mg reduziertes Peptid. \*Die Faltungen wurden mit der präparativen Faltungsmethode (siehe 3.1.4) durchgeführt. Der Peptidgehalt wurde durch eine ASA bestimmt. \*\*Reinheitsgrad der Endprodukte  $\pm$  5%.



### 4.3 Einführen der Disulfidbrücken

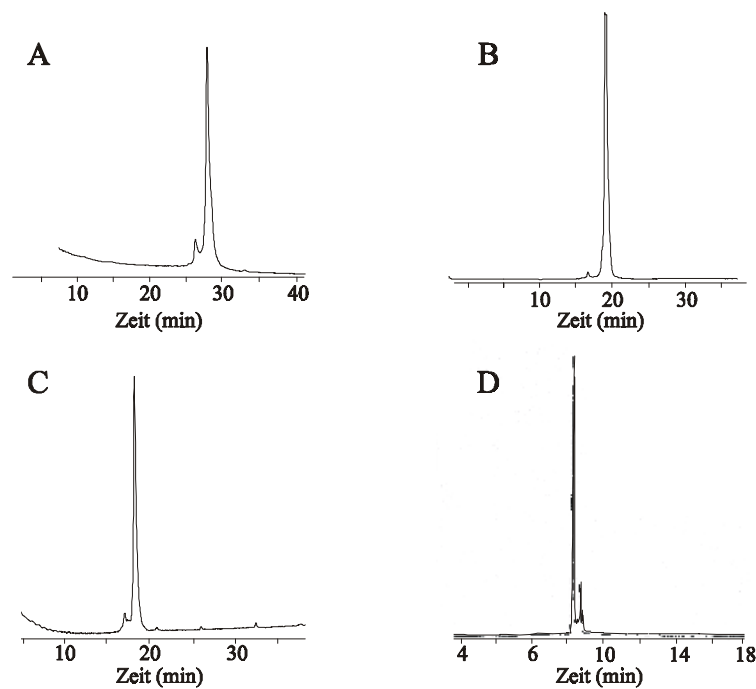
Disulfidbrücken stabilisieren die Faltung des Peptidrückgrats und damit die räumliche Struktur des Proteins. Hierdurch wird die biologische Aktivität gewährleistet. HCC-2 sowie die HCC-2 Derivate enthalten bis zu sechs Cysteine, die drei Disulfidbrücken ausbilden (Cystein 53-77, Cystein 54-93 und Cystein 64-104). Die Disulfidbrücken wurden abhängig von der Zahl der Cysteine regioselektiv (4 Cysteine), semiregioselektiv (6 Cysteine) oder über eine oxidative Faltung (4 und 6 Cysteine) eingeführt. Von besonderem Interesse ist hierbei, in wieweit sich die Sequenzmodifikationen der HCC-2 Derivate auf das Faltungsverhalten auswirken, da hierbei Peptide mit 6 bzw. 4 Cysteinen theoretisch 15 bzw. 3 Disulfidisomere ausbilden können.

#### 4.3.1 Regioselektive Verbrückung

Im Fall von [Ala64,104](HCC-2(48-113)) reduziert sich das Problem der Disulfidverbrückung auf vier Cysteine. Hier wurde ein regioselektiver Ansatz unter Verwendung der beiden orthogonalen Schutzgruppen Trt (Cystein 54, 93) und Acn (Cystein 53, 77) gewählt (Abbildung 13). Dieser Ansatz gewährleistet eine definierte Verbrückung der Cysteine [114, 115] und erspart so die aufwendige Analyse und chromatographische Abtrennung unspezifisch gebildeter Disulfidisomere.

[Ala64,104;Cys(Acn)53,77]HCC-2(48-113) wurde mit der optimierten Fmoc-Chemie synthetisiert, vom Harz abgespalten und über einen chromatographischen Schritt gereinigt [Ausbeute: ca. 70 mg; MW: 7290 Da; MW<sub>calc.</sub>: 7289 Da]. Anschließend wurden die beiden freien Thiolgruppen in drei unterschiedlichen Reaktionen, mit Luft, DMSO und Luft/Aktivkohle [116] oxidiert. Der Verlauf der Oxidation wurde durch analytische C18-HPLC verfolgt. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidationen ist sehr unterschiedlich. Während die durch Aktivkohle katalysierte Luftoxidation und die Oxidation mit DMSO schon nach ca. 4 h beendet waren, dauerte die Luftoxidation ca. ein bis zwei Tage. Neben der Produktbildung wird bei allen drei Ansätzen zu einem geringen Teil eine Überoxidation der Methionine beobachtet. Eine Erhöhung des Aktivkohleanteils um den Faktor 100 führte innerhalb weniger Stunden zu einer Degradation des Peptids. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden präparative Peptidmengen mit DMSO oxidiert, da es hier im Gegensatz zu der mit Aktivkohle katalysierten Reaktion nicht zu einem Substanzverlust durch

Adsorption des Peptids an Aktivkohle kommt. Das monozyklische [Ala64,104;Cys(Acm)53,77]HCC-2(48-113) wurde durch C18-HPLC-Analyse der Fraktionen isoliert [Ausbeute: 65%; MW: 7287 Da; MW<sub>calc.</sub>: 7287 Da]. In einem zweiten Schritt wurden anschließend die Acm-Schutzgruppen innerhalb 1 h mit Iod abgespalten und das bizaikliche Produkt chromatographisch isoliert [Ausbeute: 60%; Peptidgehalt: 65%; MW: 7145 Da; MW<sub>calc.</sub>: 7144 Da].



**Abbildung 13:** Regioselektive Synthese von [Ala64,104;Cys(Acm)53,77]HCC-2(48-113) (Peptid 2). Analytische C18-HPLC-Profile: (A) einmal chromatographisch reines lineares Peptid 2; (B) gereinigtes monozyklisches Peptid 2; (C) zweifach verbrücktes Peptid 2 direkt aus der Reaktionsmischung. (D) CZE-Analyse des gereinigten zweifach verbrückten Peptids 2 (Reinheit 88%). Die nur über CZE detektierbaren Verunreinigungen lassen sich auf kleine Mengen von Fehlsequenzen und Disulfidisomeren zurückführen.

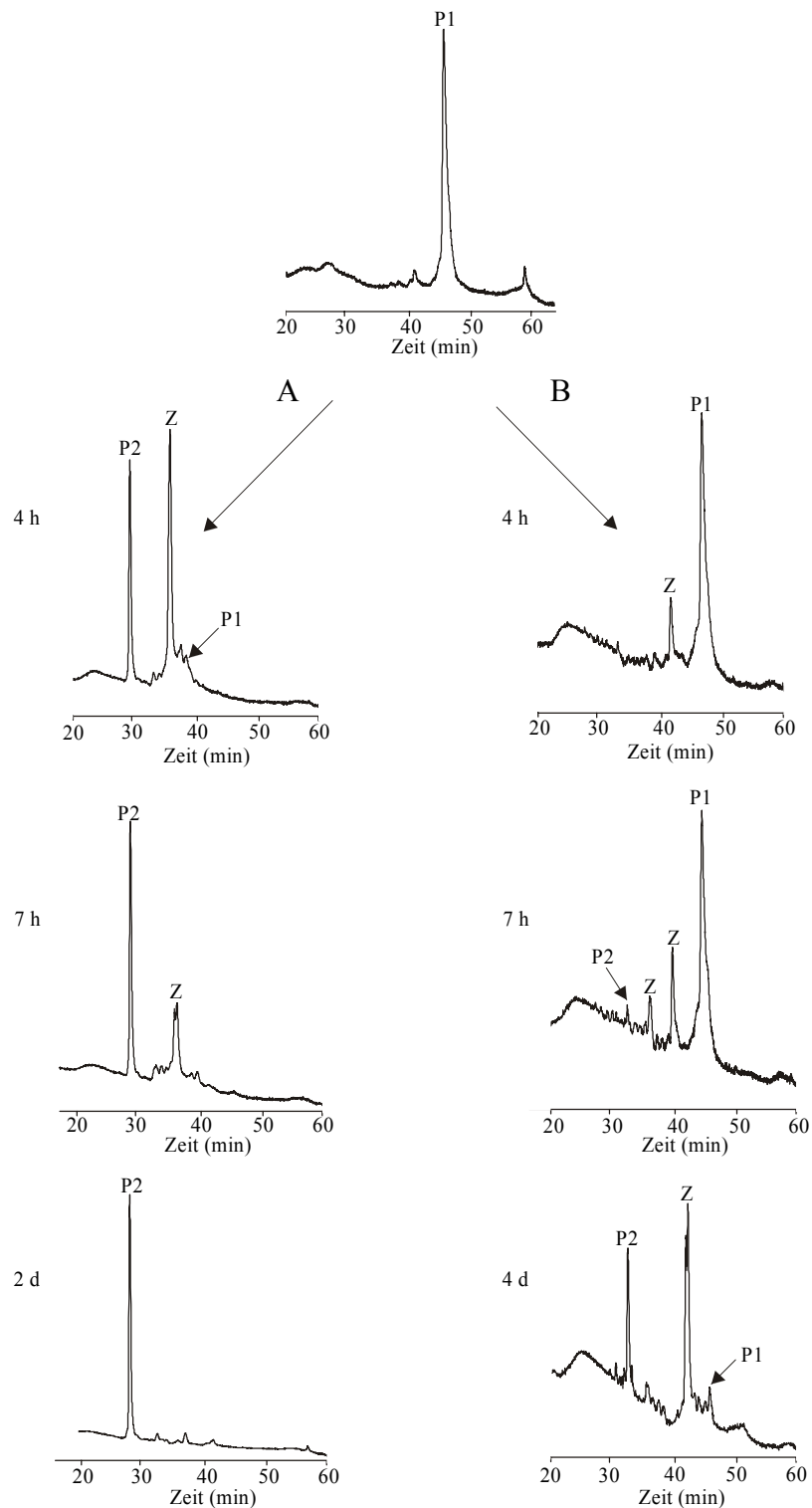
#### 4.3.2 Oxidative Faltung

Die drei Disulfidbrücken von HCC-2(48-113) wurden durch eine oxidative Faltung der Cysteine eingeführt. Hierbei können prinzipiell 15 unterschiedliche Disulfidisomere entstehen. Unter optimalen Faltungsbedingungen sollte sich selektiv, bedingt durch

vorwiegend hydrophobe Wechselwirkungen der Peptidkette, das thermodynamisch stabilste und damit biologisch aktive Disulfidisomer bilden [117, 118].

Eine analytische Menge von HCC-2(48-113) (100µg) wurde mit Luft bzw. alternativ mit einem Redoxsystem bestehend aus Cystein und Cystin (Cys/Cys<sub>2</sub>, 119) bei 4 °C in entgastem Phosphatpuffer oxidiert und der Verlauf der Faltung über C18-HPLC verfolgt. In Gegenwart des Redoxsystems entsteht innerhalb von 1 bis 2 d selektiv ein homogenes Produkt. Durch eine C18-HPLC-Koelution, mit rekombinantem in *Pichia pastoris* expremierten HCC-2(48-113) [82], konnte es als das korrekt verbrückte Isomer identifiziert werden. Die Luftoxidation dagegen verläuft wesentlich langsamer und unvollständig. Nach 4 d hat sich nur ein Teil des Eduktes zum korrekt verbrückten Isomer umgesetzt.

Die sechs Cysteine von HCC-2(48-113) können demnach unter optimierten Bedingungen zu dem thermodynamisch stabilsten Isomer falten. Nach der präparativen, durch Cys/Cys<sub>2</sub> katalysierten Faltung von HCC-2(48-113) wird das dreifach verbrückte Endprodukt schon nach nur einem chromatographischen Reinigungsschritt mit einer Reinheit von ca. 96% erhalten. Analog zu Peptid 1 entsteht bei der Faltung der Peptide 5-10, sowie bei HCC-1 in Gegenwart des Redoxpuffers ausschließlich ein korrekt verbrücktes, homogenes Produkt (Tabelle 6). Peptid 4 faltet ebenfalls zum korrekt verbrückten Isomer, obwohl diese Faltung nicht in Gegenwart eines Redoxsystems durchgeführt wurde. Die unterschiedliche Länge des N-Terminus und die Substitution von Tyr70 gegen Leucin haben keinen Einfluß auf den Verlauf der Oxidation. Die unterschiedlichen Ausbeuten hängen entscheidend von der Vorreinigung des reduzierten Peptids ab.



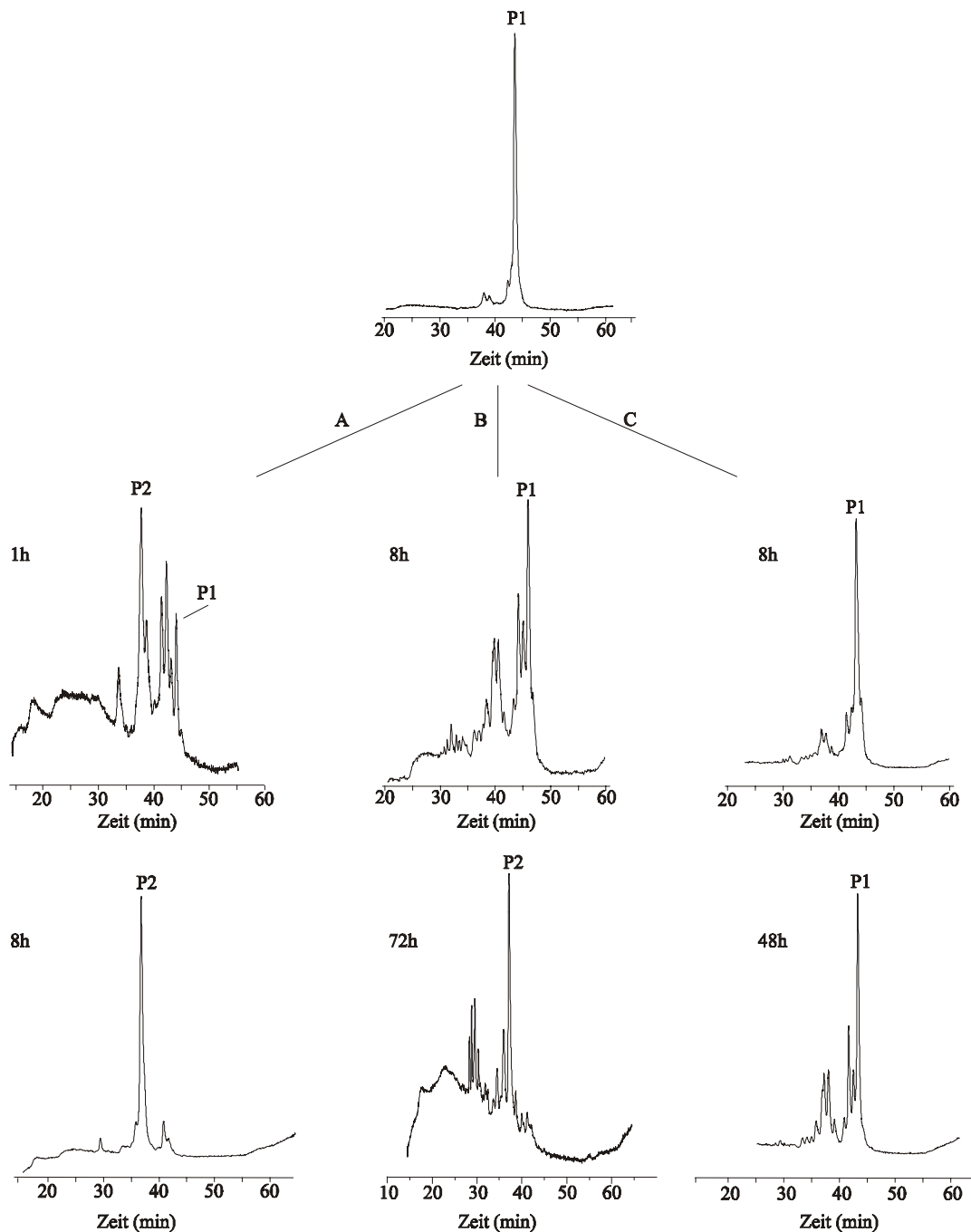
**Abbildung 14:** C18-HPLC-Profil der oxidativen Faltung von HCC-2(48-113). Reaktionsweg A: Bei der durch Cys/Cys<sub>2</sub> katalysierten Reaktion bildet sich aus dem Edukt (P1) über verschiedene Zwischenprodukte (Z) selektiv das korrekt verbrückte Isomer (P2). Reaktionsweg B: In Gegenwart von Luft erfolgt die Oxidation wesentlich langsamer. Nach 4 d hat sich nur ein Teil des Eduktes (P1) zum erwarteten Produkt umgesetzt (P2).

### Der Einfluß der dritten Disulfidbrücke auf die oxidative Faltung

Der Einfluß der dritten Disulfidbrücke auf die Faltungseigenschaften von HCC-2 wurde an Peptid 2 und 3 untersucht. Um Peptid 2 bei einer oxidativen Faltung einsetzen zu können, wurden zunächst die Acm-Schutzgruppen des vorgereinigten [Ala64,104;Cys(Acm)53,77]-HCC-2(48-113) mit Iod abgespalten. Im Laufe von zwei Stunden bildeten sich zwei Produkte, die die Masse monozyklischer und bizyklischer Oxidationsprodukte enthielten. Nach der Isolierung der oxidierten Produkte über C18-HPLC wurden diese mit Dithiothreitol (DTT) reduziert. Das lineare Peptid wurde chromatographisch isoliert, zur Faltung eingesetzt und der Verlauf der Reaktion durch C18-HPLC verfolgt (Abbildung 15). Analog zur Faltung von Peptid 1 bildet sich in Gegenwart des Redoxsystems Cys/Cys<sub>2</sub> bei 4 °C innerhalb weniger Stunden ausschließlich ein homogenes, korrekt verbrücktes Produkt, dessen Identität durch eine HPLC-Koinjektion mit regioselektiv erzeugtem Peptid 2 nachgewiesen wurde. Eine alternativ durchgeführte Luftoxidation bei 37 °C erzeugt innerhalb von 3 d ebenfalls das gewünschte Produkt. Es wurden jedoch Anfänge von Degradation beobachtet. Bei 4 °C kommt es innerhalb von 2 d zu keiner nennenswerten Produktbildung.

Die oxidative Faltung der verbleibenden vier Cysteine von Peptid 3 wurde in Gegenwart des Redoxsystems Cys/Cys<sub>2</sub> und mit Luft bei jeweils 4 °C bzw. 37 °C durchgeführt und über C18-HPLC verfolgt. Ohne Beteiligung eines Redoxsystems kommt es zu keiner Reaktion. Mit Cys/Cys<sub>2</sub> hingegen wird im Laufe von einem Tag die Bildung von zwei Hauptprodukten beobachtet. Durch eine CZE-Analyse und einen anschließenden enzymatischen Verdau beider Produkte mit Trypsin konnte gezeigt werden, daß das zuerst eluierende Produkt (P1) zwei zweifach verbrückte Isomere enthält. Die beiden Isomere konnten nicht durch chromatographische Methoden getrennt werden, und wurden daher in allen folgenden Versuchen in Mischung eingesetzt (Isomer 1:Isomer 2, ≈1:1). Im zweiten Produkt (P2) wurde eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 77 und 93 nachgewiesen (Abbildung 16). Da die beiden direkt benachbarten Cysteine 53 und 54 aufgrund des ungünstigen Winkels zwischen den beiden Thiolgruppen keine Disulfidbrücke ausbilden können, handelt es sich hierbei um ein monozyklisches Produkt.

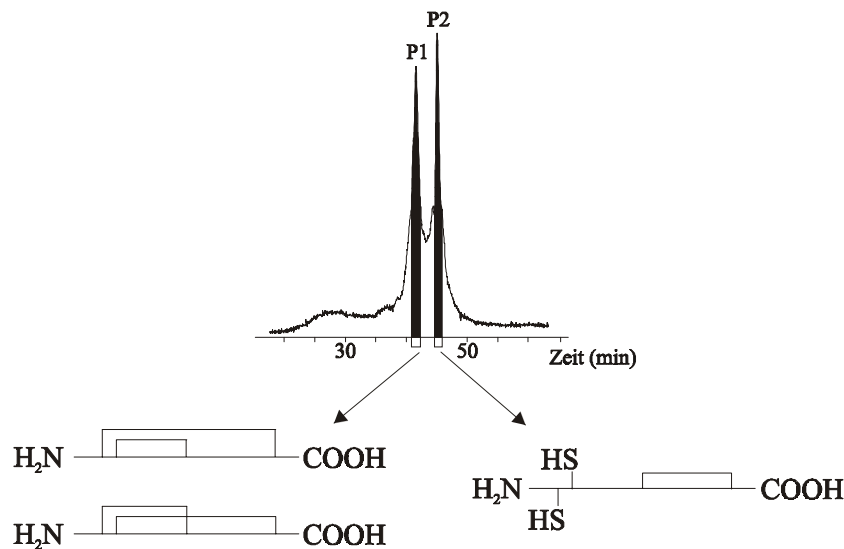
Unter thermodynamisch kontrollierten Reaktionsbedingungen faltet Peptid 2 analog zu Peptid 1 ausschließlich zum korrekt verbrückten Protein. Die vier für alle Chemokine charakteristischen Cysteine reichen folglich für die Selektivität der Faltung aus.



**Abbildung 15:** C18 HPLC-Profil der oxidativen Faltung von [Ala64,104]HCC-2(48-113): (A) bei 4 °C in Gegenwart des Redoxpuffers Cys/Cys<sub>2</sub>; (B) mit Luft bei 37 °C; (C) mit Luft bei 4 °C.

Der Ersatz der Cysteine 64 und 104 durch zwei unter den Reaktionsbedingungen der oxidativen Faltung negativ geladenen Aminosäuren führt zu einem Selektivitätsverlust. Alle drei prinzipiell möglichen Produkte konnten identifiziert werden. Obwohl die dritte Disulfidbrücke nicht zur Faltung des Peptids notwendig ist, scheinen sich die Peptidbereiche

um Cystein 64 und 104 während der Faltung nahe kommen zu müssen, damit selektiv das korrekt verbrückte Isomer gebildet wird.



**Abbildung 16:** HPLC-Profil der oxidativen Faltung von Peptid 3 bei 37 °C in Gegenwart von Cys/Cys<sub>2</sub>. Die Verbrückung der resultierenden Produkte ist schematisch angedeutet.

#### Der Einfluß der $\alpha$ -Helix auf die oxidative Faltung

Der Einfluß der  $\alpha$ -Helix auf den Verlauf der oxidativen Faltung wurde anhand von Peptid 11 studiert. Mit Luft bei 37 °C bzw. in Gegenwart des Redoxsystems Cys/Cys<sub>2</sub> bei 4 °C oder 25 °C bilden sich innerhalb von drei Tagen zwei Hauptprodukte (ähnlich zu Peptid 3, Abbildung 16). Das Verhältnis beider Hauptprodukte wird durch die Reaktionsbedingungen beeinflusst. Bei 37 °C entstehen Produkt 1 (früher eluierendes Produkt) zu Produkt 2 in einem Verhältnis von 1:2, bei 4 °C mit Cys/Cys<sub>2</sub> im Verhältnis 2:1. Analog zu der unspezifischen Faltung von Peptid 3 konnte auch hier durch eine CZE-Analyse und einen anschließenden enzymatischen Verdau mit Trypsin gezeigt werden, daß das zuerst eluierende Produkt zwei zweifach verbrückte Isomere enthält. Im zweiten Produkt hingegen konnte nur eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 77 und 93 nachgewiesen werden.

Das Fehlen der  $\alpha$ -Helix führt demnach zu einem Selektivitätsverlust der oxidativen Faltung. Es wurden ähnlich zur oxidativen Faltung von Peptid 3 alle drei möglichen Faltungsprodukte erhalten. Das monozyklische Produkt mit einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 77 und 93 wird bei allen bisher beobachteten unspezifischen Faltungen bevorzugt gebildet. Es scheint energetisch wesentlich stabiler zu sein als die beiden zweifach verbrückten Disulfidisomere.

### 4.3.3 Semiregioselektive Synthese

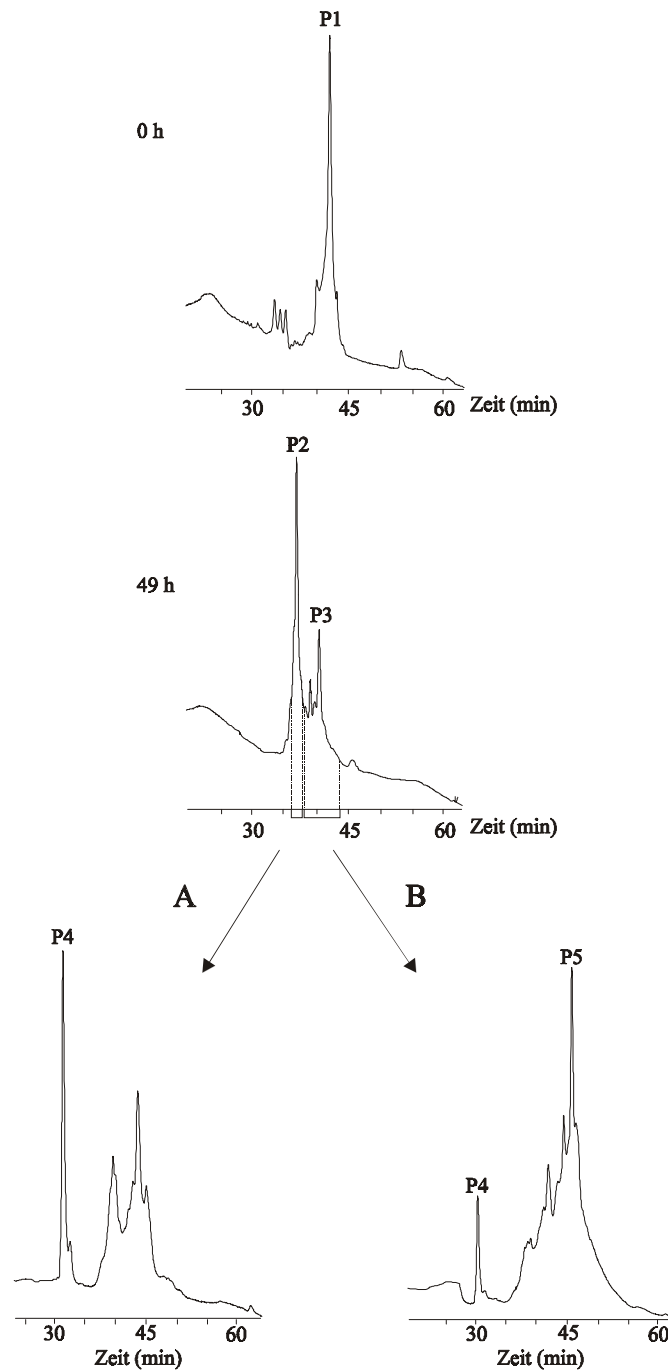
Die drei Disulfidbrücken von HCC-2(48-113) wurden alternativ über eine semiregioselektive Methode der oxidativen Faltung/Iodoxidation eingeführt [120, 121]. Die vier konservierten Cysteine aller Chemokine (Cys53, 54, 77, 93) wurden Trt-geschützt eingesetzt, während die beiden zusätzlichen Cysteine AcM-geschützt vorlagen. [Cys(AcM)64,104]HCC-2(48-113) wurde mit der optimierten Fmoc-Synthesestrategie dargestellt und vom Harz abgespalten [Ausbeute: 40 mg; MW: 7354 Da; MW<sub>calc.</sub>: 7352 Da]. Nach der chromatographischen Reinigung des reduzierten Peptids wurden im ersten Schritt die vier ungeschützten Thiolgruppen unter verschiedenen Bedingungen oxidativ gefaltet. Die mit AcM-geschützten Cysteine wurden anschließend selektiv mit Iod verbrückt. Dieser semiregioselektive Ansatz reduziert die Anzahl aller möglichen Disulfidisomere von 15 auf 3.

In Gegenwart von Luft oder dem Redoxsystem DTT/DTT<sub>S2</sub> [122] wird innerhalb von 48 h bei 37 °C keine Oxidation des Tetrathioledukts beobachtet. In Gegenwart der Redoxsysteme GSH/GSSG [123] und Cys/Cys<sub>2</sub> bilden sich zwei Hauptprodukte mit identischer molekularer Masse (Abbildung 17, P2 und P3). Unabhängig vom eingesetzten Redoxsystem bilden sich Produkt 1 und 2 in einem Verhältnis von 2:1. Bei der durch GSH/GSSG katalysierten Faltung tritt bei 4 °C, 25 °C und 37 °C nach 29 h, 8 h bzw. 4 h eine Degradation der Produkte ein. Die Cys/Cys<sub>2</sub> vermittelte Faltung ist bei 4 °C/25 °C nach 24 h/48 h beendet. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit, hat aber keinen Einfluß auf das Verhältnis der gebildeten Isomere. Unter Luftausschluß bei 4 °C wird die Bildung von Produkt 1 weiter favorisiert (P2:P3, 3:1).

In der Literatur wird eine Vielzahl von Reagenzien beschrieben, die in einzelnen Fällen die Faltungselektivität von Proteinen beeinflussen [84]. Der Zusatz des chaotropen Salzes GdnHCl [124] verlangsamt die Oxidation, beeinflusst aber weder das Isomerenverhältnis der Produkte, noch die Degradation in Gegenwart von GSH/GSSG. Bei einer Konzentration von GdnHCl  $\geq 2$  M kommt es zu einem Oxidationsstopp. Kein Effekt wird bei der Zugabe von Glycerin (10%) und L-Arginin (500 mM) beobachtet. Um zu überprüfen, welches der beiden Faltungshauptprodukte die Chemokin-spezifische Verbrückung aufweist, wurde das Faltungsprodukt in zwei Hauptfraktionen getrennt und mit Iod oxidiert (Abbildung 17). Die Identität des korrekt verbrückten Produktes (P4), das aus der ersten Fraktion entsteht (Reaktionsweg A), wurde durch eine C18-HPLC-Koelution mit rekombinant erzeugtem



HCC-2(48-113) nachgewiesen. Die Iodoxidation der zweiten Fraktion (Reaktionsweg B) resultiert vorwiegend in der Bildung eines mißgefalteten Produkts (P5).



**Abbildung 17:** C18-HPLC-Analyse der semiregioselektiven Darstellung von HCC-2(48-113). Bei der oxidativen Faltung von [Cys(Acm)<sub>64,104</sub>]HCC-2(48-113) (P1) bilden sich in Gegenwart des Redoxsystems Cys/Cys<sub>2</sub> im Laufe von 49 h zwei Hauptprodukte, mit der molekularen Masse des erwarteten Produkts (P2, P3). P2 und P3 wurden chromatographisch getrennt und mit Iod oxidiert. Die Iodoxidation von P2 (Reaktionsweg A) resultiert in der Bildung des korrekt verbrückten HCC-2(48-113) (P4), während die Oxidation von P3 hauptsächlich zur Bildung eines mißgefalteten Produkts (P5) führt.

Die Selektivität der oxidativen Faltung der vier konservierten Cysteine aller Chemokine wird durch die beiden Acm-Schutzgruppen der Cysteine 64 und 104 beeinflusst. Ähnlich wie bei Peptid 3 läßt sich vermuten, daß die sterische Hinderung der relativ großen Acm-Schutzgruppen einen zur Faltung notwendigen Kontakt der Peptidomänen um Cystein 64 und 104 stört. Ein sterisch wenig anspruchsvolles Alanin an Position 64 und 104 (Peptid 2) beeinflusst diese essentielle Wechselwirkung nicht.

#### 4.4 Strukturuntersuchungen

Die Struktur von HCC-2(48-113) und seiner Derivate wurde über NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Es war von besonderem Interesse, in wieweit sich die Mutation einzelner Sequenzabschnitte auf die dreidimensionale Struktur der Proteine auswirkt.

##### 4.4.1 Größenausschluß-Chromatographie

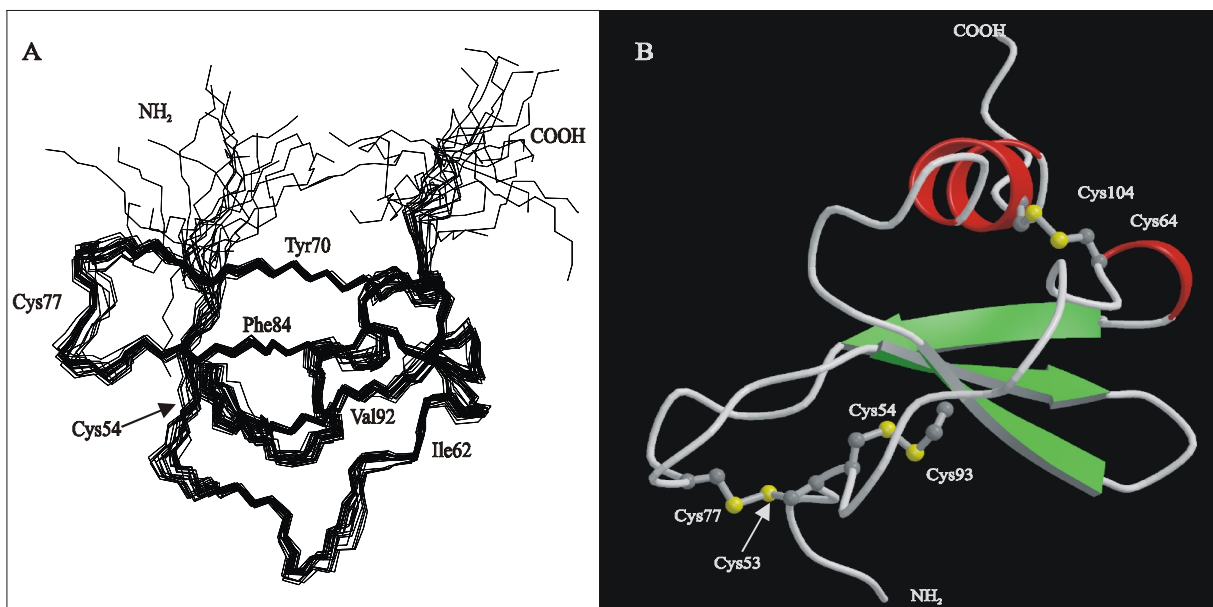
Der Oligomerisierungsgrad der Peptide 1, 2 und 4 wurde durch eine Größenausschluß-Chromatographie bestimmt. Die Peptide eluieren von einer Superdex G75 Säule bei einer Peptidkonzentration von ca.  $7 \times 10^{-3}$  M als symmetrische Peaks. Durch den Vergleich der Retentionszeiten der Peptide mit der durch fünf Proteine festgelegten Eichgeraden konnte das Molekulargewicht der Peptide ermittelt werden, daß auf die jeweiligen Monomere schließen läßt. Da keine früher eluierenden Peaks beobachtet wurden, scheinen die Proteine bei dieser Konzentration in Lösung weder Dimere noch höhere Oligomere auszubilden.

##### 4.4.2 Strukturbestimmung von HCC-2(48-113)

Bei der Strukturuntersuchung von HCC-2 wurde rekombinant in *Pichia pastoris* exprimiertes HCC-2(48-113) eingesetzt [82]. Homonukleare zweidimensionale NMR-Spektren von HCC-2(48-113) zeigten eine weite Dispersion der Amid- bzw.  $C_{\alpha}$ -Protonenresonanz in einem Bereich von 7,14 bis 9,75 p.p.m bzw. 3,36 bis 5,66 p.p.m. Dies deutet auf eine gut definierte Struktur des Chemokins in Lösung hin. Die Struktur des Proteins wurde mit Standardmethoden (siehe 3.3.2) berechnet (Abbildung 18).

Die Tertiärstruktur von HCC-2 wird durch eine kurze C-terminale  $\alpha$ -Helix sowie ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt dominiert. Der Aminoterminus des Proteins, dessen ersten vier Aminosäuren unstrukturiert vorliegen, enthält die ersten beiden chemokin-

typischen Cysteine (Position 53, 54), die Disulfidbrücken mit den Cysteinen 77 und 93 ausbilden. Der Bereich zwischen Thr55 bis Cys64 formt ein Reihe von Krümmungen und Drehungen und endet in einer einzelnen  $3_{10}$ -helikalen Drehung (Position 64 bis 67). Hieran schließen sich der erste Strang des  $\beta$ -Faltblatts (Met67 bis Glu72) und ein wenig strukturierter Loop (Ser74-Gly81) an. Der zweite und dritte  $\beta$ -Strang (Val82-Thr86; Arg90-Ala94) werden durch eine  $\beta$ -Schleife verbunden. Die C-terminale  $\alpha$ -Helix (Val101-Lys107) wird schließlich über zwei  $\beta$ -Schleifen (Lys95-Gly98, Gly98-Val101) an den dritten  $\beta$ -Strang gebunden, wodurch gleichzeitig eine dichte Packung der  $\alpha$ -Helix auf das  $\beta$ -Faltblatt hervorgerufen wird. Die vier C-terminalen Aminosäuren liegen unstrukturiert vor.



**Abbildung 18:** (A) Überlagerung des Polypeptidrückgrats einer Gruppe der 20 energieärmsten HCC-2 Strukturen. Die flexiblen Bereiche des N-Terminus und C-Terminus sind gut von der definierten Chemokinstruktur zu unterscheiden. (B) Schematische Darstellung des energiearmen Polypeptidrückgrats von HCC-2(48-113). Die Abbildung wurde mit Molscript [125] und Raster3D [126] erstellt.

Zusätzlich zu den drei Disulfidbrücken wird die Tertiärstruktur von HCC-2 wesentlich durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt und der  $\alpha$ -Helix stabilisiert. Der größte Teil der hier involvierten Aminosäuren ist bei allen Chemokinen konserviert. Es ist auffällig, daß HCC-2 ebenso wie das dreifach verbrückte Ck $\beta$ -8 [127] an Position 100 ein Glycin anstelle des hoch konservierten Tryptophan enthält. Die Strukturanalyse von HCC-2 zeigt deutlich, daß diese Substitution auf einen sterischen Effekt zurückzuführen ist. Gly100

liegt direkt neben den Cysteinen der zusätzlichen Disulfidbrücke, so daß kein Raum für sterisch aufwendigere Seitenketten wie z.B. von Tryptophan bleibt.

Die Struktur des Monomers von HCC-2 ist der anderer Chemokine, wie z.B. RANTES und MIP-1 $\beta$  sehr ähnlich. Die dritte Disulfidbrücke führt zu keiner wesentlichen Veränderung der chemokin-typischen Tertiärstruktur. Kleinere strukturelle Veränderungen wurden jedoch vor allem im N-Terminus (His48-Met67) und der zweiten Loopregion (Ser74-Gly81) identifiziert. Diese Regionen zeigten die höchste Flexibilität in der HCC-2-Struktur und sind auch innerhalb der Chemokinfamilie nur wenig konserviert [25]. Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit des HCC-2-Monomers mit anderen Chemokinen wurde unter den hier vorgenommenen Meßbedingungen keine dimere Quartärstruktur nachgewiesen [128]. Es ist bekannt, daß die Länge des N-Terminus und die Salzkonzentration der Lösung die Oligomerisierungseigenschaften der CC-Chemokine wie z.B. MIP-1 $\beta$  wesentlich verändern [35]. Erhöhte Salzkonzentrationen von bis zu 700 mM NaCl induzieren jedoch keine Oligomerisierung von HCC-2. Über Größenausschluß-Chromatographie konnte nachgewiesen werden, daß weder HCC-2(48-113), noch das N-terminal um 26 Aminosäuren verlängerte HCC-2(22-113) Dimere oder höhere Oligomere bildeten. Diese Beobachtung wurde durch die Analyse der eindimensionalen NMR-Spektren von HCC-2(48-113) bestätigt. Die Peakbreite der hochfeldverschobenen Methylprotonen (Abbildung 19) liegt in einem Bereich von 8–10 Hz. Bei dimeren Chemokinen wie z.B. RANTES wird aufgrund von Austauschphänomenen eine Peakbreite von 16-18 Hz beobachtet. Erst vor kurzem wurden für die Chemokine RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  zwei Aminosäuren identifiziert, die für die Aggregation dieser Chemokine verantwortlich sind [39]. Alle drei CC-Chemokine weisen an Position 69 und 109 (Numerierung bezogen auf HCC-2) je eine saure Aminosäure (Glu bzw. Asp) auf. Es konnte gezeigt werden, daß durch Substitution einer dieser Aminosäuren durch Alanin oder Serin die Dimerisierungsneigung dieser drei Chemokine drastisch vermindert bzw. unterbunden wird. HCC-2 hingegen enthält weder an an Position 69 noch 109 eine saure Aminosäure.

Diese Ergebnisse legen nahe, daß geringfügige Sequenzunterschiede für die fehlende Dimerisierungsneigung von HCC-2 verantwortlich sein könnten: Position 55 (Thr anstelle aromatischer Aminosäuren), Position 48 (His anstelle einer sauren oder neutralen Aminosäure), Position 69 und 109 (Serin und Lys anstelle von Glu oder Asp).

#### 4.4.3 Strukturuntersuchungen der HCC-2-Derivate

Die Struktur der Peptide 4-9 wurde nicht explizit bestimmt. Eine Verkürzung des unstrukturierten N-Terminus führte bei anderen Chemokinen zum Verlust der Dimerisierungsneigung [35], beeinflusste jedoch nicht die Tertiärstruktur. Da bei Peptid 4 und Peptid 1 keine Dimerisierung auftrat, ist dies auch für die Peptide 5-9 auszuschließen. Die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren von Peptid 10 zeigten keine wesentlichen Veränderung der Protonenresonanz. Die Substitution von Tyr70 gegen Leucin führt demnach nicht zu einer Beeinflussung der Proteinstruktur.

#### Der Einfluß der dritten Disulfidbrücke

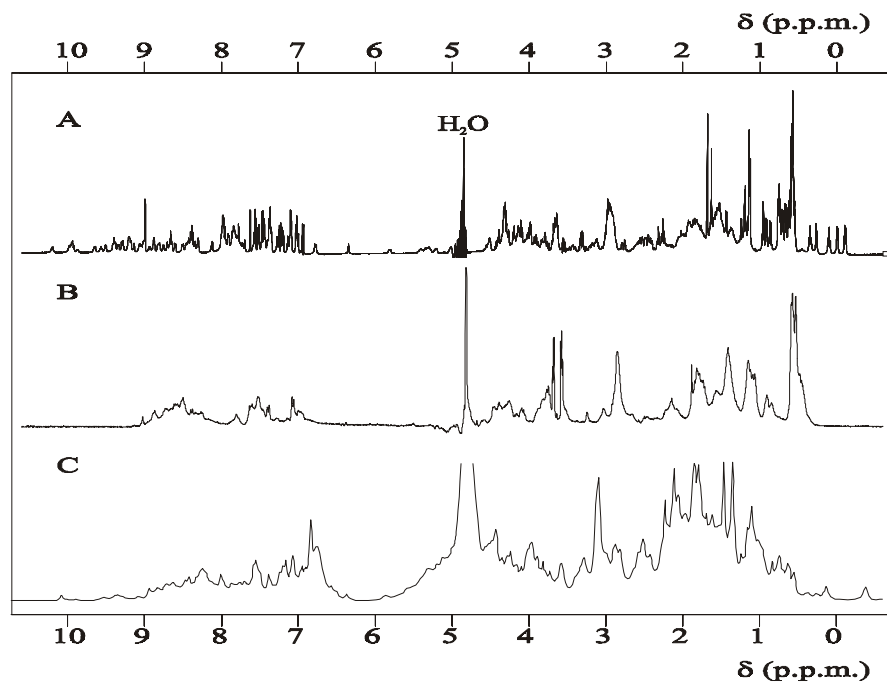
Trotz der bei HCC-2(48-113) auftretenden außergewöhnlichen dritten Disulfidbrücke, konnten keine signifikanten Veränderungen der monomeren Struktur von HCC-2 im Vergleich zu RANTES oder MIP-1 $\beta$  festgestellt werden [100]. Es stellt sich die Frage, welche Rolle diese Disulfidbrücke in der Struktur von HCC-2 spielt. Eine mögliche Hypothese ist, daß die zusätzliche Disulfidbrücke die Lage der  $\alpha$ -Helix relativ zum  $\beta$ -Faltblatt festlegt.

Die NOE-Daten von Peptid 2 zeigten keine Veränderung der Kontakte der  $\alpha$ -Helix und des  $\beta$ -Faltblatts im Vergleich zum nativen Peptid. Einzig bei der Aminosäure Ile72, wurde eine Veränderung in der Orientierung der Seitenketten nachgewiesen. Die dritte Disulfidbrücke hat demnach keinen Einfluß auf die Ausbildung der chemokin-typischen Tertiärstruktur. Es wird angenommen, daß die zusätzliche Disulfidbrücke im wesentlichen die Orientierung der N-terminalen Aminosäuren in Position 62 bis 67 festlegt. In den zweifach verbrückten Chemokinen wird diese Region durch das konservierte Trp100 stabilisiert. Dieses Tryptophan fehlt in HCC-2, so daß seine Funktion wahrscheinlich durch die dritte Disulfidbrücke übernommen wird.

Eindimensionale NMR-Spektren der zweifach verbrückten Isomere von Peptid 3 zeigten eine signifikant verringerte Aufspaltung der Amid- bzw.  $C_{\alpha}$ - Protonenresonanzen. Die für die dreidimensionale Struktur von HCC-2 charakteristischen hochfeldverschobenen Methylgruppen bei ca. 0,5-0,3 p.p.m. wurden nicht identifiziert. Obwohl die zweifach verbrückten Isomere in Mischung getestet wurden (Reinheit ca. 50%, Verhältnis 1:1), scheint die Mutation der Cysteine 64 und 104 gegen die negativ geladene Aminosäure Asparaginsäure zu einem Verlust der definierten Tertiärstruktur zu führen.

### Der Einfluß der $\alpha$ -Helix

Homonukleare eindimensionale  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Isomere 1 und 2 von Peptid 11 zeigten keine Dispersion der  $\beta$ -Faltblatt-typischen Amidprotonenresonanzen im Bereich von 7,5–9,7 p.p.m. (Abbildung 19). Die vom Wassersignal aus tieffeldverschobene  $\text{C}_\alpha$ -Protonenresonanzen im Bereich von 4,8–5,5 p.p.m., die gut erkennbar in Peptid 1 vorliegen, sind bei Peptid 11 nicht zu erkennen. Zusätzlich fehlen in Peptid 11 die fünf hochfeldverschobenen Methylgruppen (0,5–0,3 p.p.m., Peptid 1), was darauf hinweist, daß dieses Protein in Lösung keine stabile Tertiärstruktur ausbildet. Die NMR-Analyse von Peptid 11 im Vergleich zu Peptid 1 beweist, daß die Substitution von Cys106 gegen Prolin nicht wie angenommen zu nur einer Störung der  $\alpha$ -Helix, sondern sogar zum völligen Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur führt. Die dreidimensionale Struktur von HCC-2 kann sich folglich nur ausbilden, wenn die  $\alpha$ -Helix intakt ist.



**Abbildung 19:** Vergleich der eindimensionalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Peptid 1 (A), Peptid 11 (B) und HCC-1(25-93) (C).

#### 4.4.4 Strukturuntersuchung von HCC-1

Es wurden eindimensionale NMR-Spektren von HCC-1(25-93) und aus Hämofiltrat isolierten HCC-1(20-93) [11] aufgenommen. Im Gegensatz zu HCC-2 zeigen die Spektren von HCC-1 eine wesentlich geringere Dispersion und erhöhte Linienbreiten (Abbildung 19). Das zu HCC-

2 verwandte HCC-1 bildet unter millimolaren Konzentrationen in Lösung vermutlich entweder die für Chemokine typischen Oligomere oder unspezifische Aggregate.

#### 4.5 Biologische Aktivität

Die biologische Aktivität von HCC-2 und seiner Derivate wurde an frisch aus Blut isolierten Monozyten und der leukämischen, monozytären Suspensionszelllinie THP-1 getestet. Monozyten sind *in vivo* Zielzellen der CC-Chemokine und exprimieren die CC-Chemokinrezeptoren 1, 2, 3 und 7 (Tabelle 1). Es wurde angenommen, daß die monozytäre Krebszelllinie THP-1 trotz der Immortalisierung weiterhin die typischen CC-Chemokinrezeptoren der Monozyten exprimiert und deren Antwort über G-Protein gekoppelte Signaltransduktionwege vermittelt. Da gezeigt werden konnte, daß HCC-2 die CC-Chemokinrezeptoren CCR1 und wahrscheinlich auch CCR3 aktiviert, stellen Monozyten somit ein geeignetes Zellsystem zur Überprüfung der biologischen Aktivität dar.

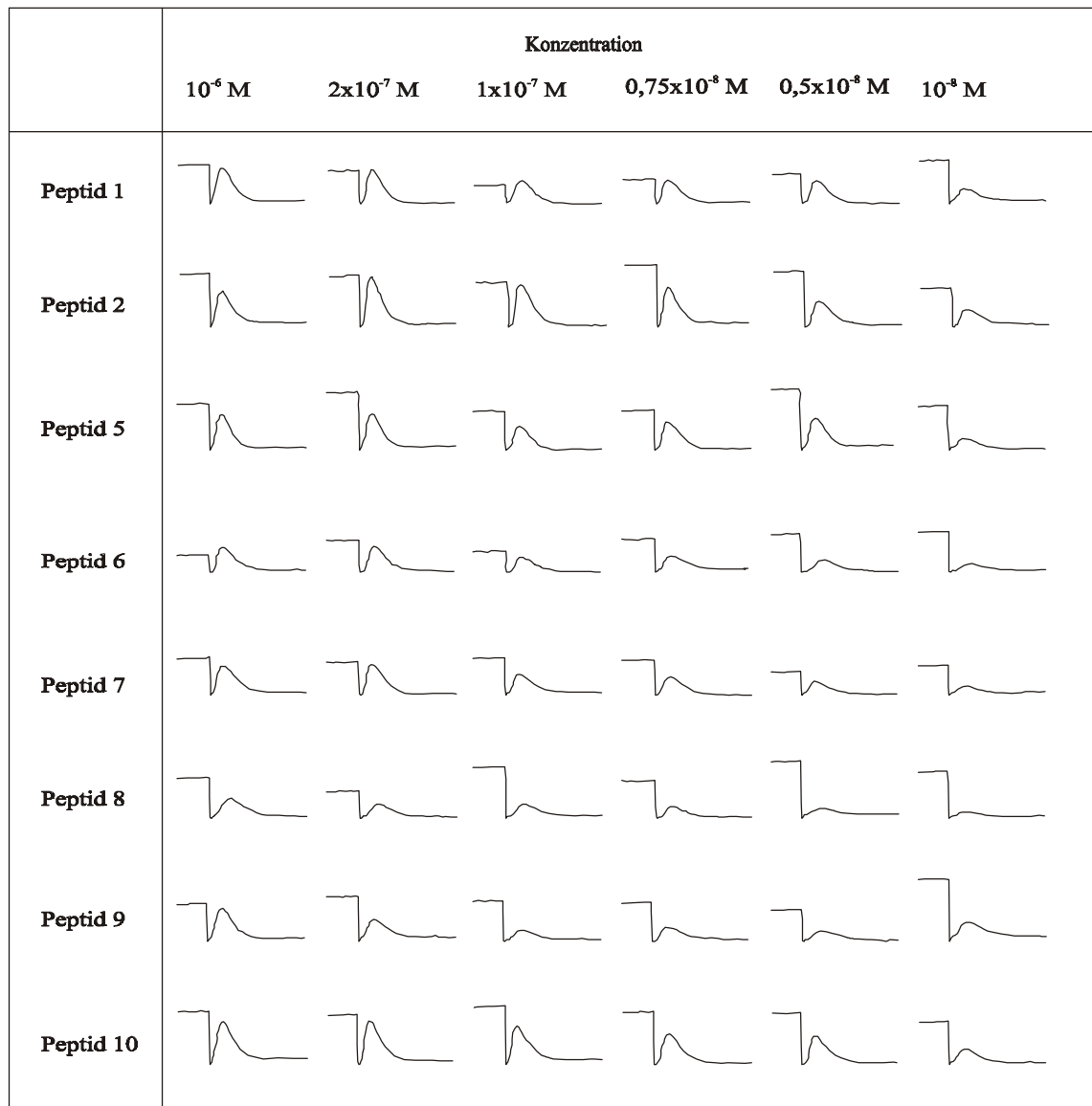
##### 4.5.1 Calciumausschüttung

Nach der Aktivierung eines Chemokinrezeptors kommt es im Laufe der G-Protein-vermittelten Signalkaskade zu einer kurzfristigen Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern. Der temporäre Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration in THP-1-Zellen wurde über die Fluoreszenzänderung des Chelatbildners Fluo-4 verfolgt. Die Fluoreszenzänderung ist proportional zur Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration.

Die Calciumausschüttung wurde in THP-1-Zellen auf einem FLPR<sup>96</sup>-System gemessen. Pro Chemokin wurden Konzentrationen in einem Bereich von  $10^{-6}$  M bis  $10^{-8}$  M eingesetzt, um eine dosisabhängige Wirkung der Substanzen zu ermitteln. Für synthetische HCC-2-Derivate, deren Peptidgehalt nicht explizit bestimmt wurde, wurde ein Peptidgehalt von 65% angenommen. Alle aktiven Substanzen wurden mehrfach, mit je einer Verdünnungsreihe, parallel auf einer 96 *Well*-Platte gemessen, so daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung der verschiedenen Derivate direkt miteinander verglichen werden konnte. Als Positivkontrolle wurde ATP (Adenosintriphosphat) verwendet.

Peptid 4, die Disulfidisomere 1 und 2 von Peptid 3 (in Mischung getestet), das monozyklische Derivat von Peptid 3 und die dreifach verbrückten Isomere 1 (zuerst auf der C18-HPLC

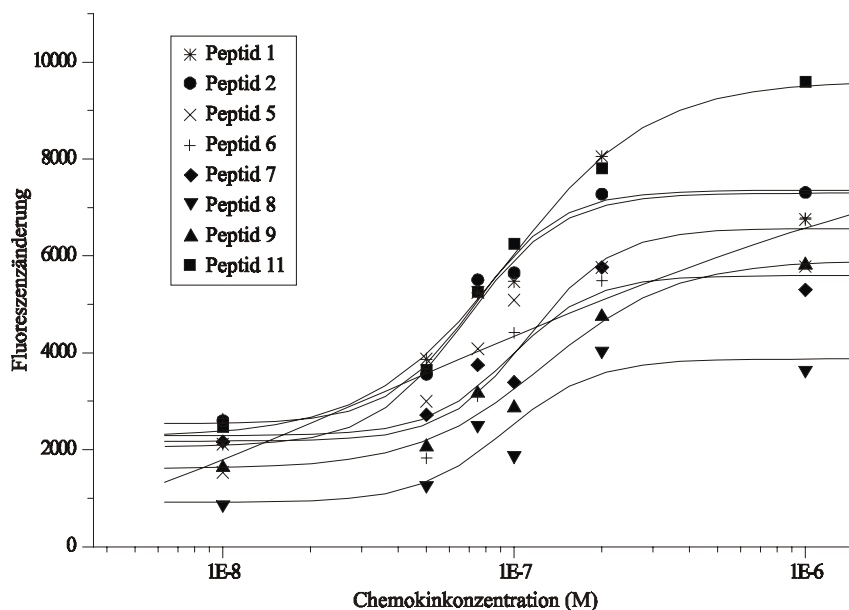
eluerendes Produkt) und 2 von Peptid 11 zeigen keine dosisabhängige Aktivierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung. Mit Ausnahme des monozyklischen Peptids 3 und dem ersten Isomer von Peptid 11, wird ein schwaches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M beobachtet. Dies ist wahrscheinlich auf einen unspezifischen Peptideffekt zurückzuführen.



**Abbildung 20:** Typischer Verlauf des Fluoreszenzsignals bei der Aktivierung von THP-1-Zellen durch HCC-2 und seine Derivate. Bei der Injektion der Chemokinlösungen werden bei Suspensionszelllinien die am Boden abgesetzten Zellen aufgewirbelt, wodurch der kurzfristige Abfall der Grundlinie vor dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal verursacht wird.



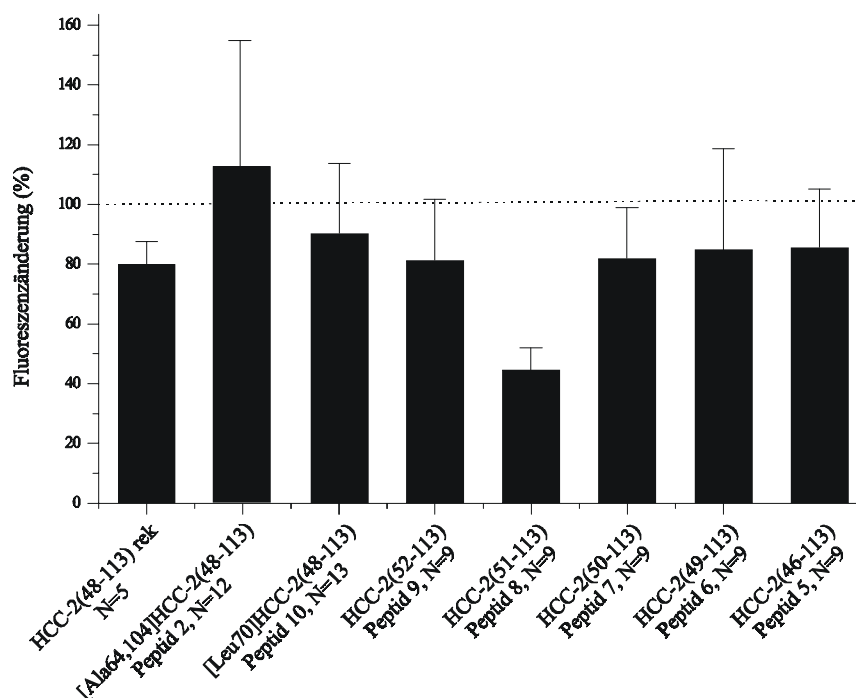
Rekombinant erzeugtes HCC-2(48-113), Peptid 1, 2 und die Peptide 5-10 aktivieren dosisabhängig die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in THP-1-Zellen (Abbildung 20). Der halbmaximale Effekt ( $\text{EC}_{50}$ ) aller Derivate liegt in einem Bereich zwischen  $7 \times 10^{-8}$  M und  $2 \times 10^{-7}$  M (Abbildung 21). Über statistische Methoden (T-Test) wurde ermittelt, daß sich die  $\text{EC}_{50}$ -Werte nicht signifikant unterscheiden. Anschließend wurde die maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung, d.h. die Fluoreszenzänderung des Chelatbildners im Sättigungsbereich der Dosiswirkungskurve bei einer Chemokinkonzentration von  $10^{-6}$  M aller aktiven Derivate verglichen. Als interner Standard wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung von Peptid 1 auf 100% gesetzt (Abbildung 22). Über einen T-Test konnte gezeigt werden, daß sich die Peptide 7-9 und rekombinant erzeugtes HCC-2(48-113) signifikant von Peptid 1 unterscheiden. Während die Stimulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung von Peptid 7, 9 und rekombinant erzeugtem Peptid 1 bei ca. 80% liegt, zeigt das um 3 Aminosäuren N-terminal verkürzte Peptid 8 eine deutlich kleineren Effekt von etwa 45%.



**Abbildung 21:** Dosiswirkungskurve der biologisch aktiven HCC-2 Derivate am FLPR<sup>96</sup>-System. Jeder Meßwert stellt den Mittelwert aus fünf unabhängigen Versuchen dar.

Die Ergebnisse der Stimulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung korrelieren gut mit den Ergebnissen der Strukturuntersuchung. Die Peptide 3 und 11, für die keine definierte dreidimensionale Struktur nachgewiesen werden konnte, sind auf THP-1-Zellen inaktiv.

Das 92 Aminosäuren umfassende HCC-2(22-113) zeigt im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen [79] keine biologische Aktivität. Es ist daher wahrscheinlich, dass dies nicht die im Organismus vorkommende biologisch aktive Form von HCC-2 ist. HCC-2(22-113) könnte jedoch als Proprotein sezerniert und am Wirkungsort von Proteasen zum biologisch aktiven Peptid konvertiert werden. Das N-terminal um zwei Aminosäuren verlängerte bzw. die sukzessiv bis zu Asp52 verkürzten Derivate von HCC-2(48-113) stimulieren alle die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen an RANTES, MCP-1 und MIP-1 $\beta$  [35, 52, 45], bei denen eine Verkürzung des N-Terminus zu Rezeptorantagonisten führt. Das FLPR-System ist jedoch nicht geeignet, quantitative Unterschiede im halbmaximalen Effekt ( $\text{EC}_{50}$ ) der Chemokine zu bestimmen, so daß keine Aussage über Potenzunterschiede der Chemokine gemacht werden kann.



**Abbildung 22:** Maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung in THP-1-Zellen hervorgerufen durch  $10^{-6}$  M Chemokinlösungen. Die Anzahl der Versuche (N) pro Chemokin ist angegeben.

Deutliche Unterschiede werden indes bei der maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation in THP-1-Zellen beobachtet. Rekombinant erzeugtes HCC-2(48-113) zeigt im Vergleich zu synthetisch dargestelltem Material eine verringerte Aktivität. Dies ist auf einen systematischen Fehler bei

der Berechnung der Verdünnungsreihe zurückzuführen, da der Peptidgehalt des rekombinanten Proteins nicht durch eine Aminosäureanalyse bestimmt wurde und so fälschlich als 100% angenommen wurde. Rekombinant erzeugtes und synthetisch dargestelltes Material unterscheiden sich daher nicht. Die um 2, 3 und 4 Aminosäuren N-terminal verkürzten HCC-2 Derivate zeigen eine um mindestens 20% verminderte maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung in THP-1-Zellen. Phe49 ist demnach eine in die Rezeptoraktivierung involvierte Aminosäure. Es ist interessant, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nicht kontinuierlich mit jeder weiteren Verkürzung abnimmt, sondern bei Peptid 8 ein Minimum durchläuft. Ein möglicher Grund für diesen Effekt könnte sein, daß HCC-2 in Abhängigkeit von der Länge des N-Terminus unterschiedliche Rezeptoren aktiviert oder blockiert, bzw. einen Rezeptor unterschiedlich stark stimuliert. Da bisher kein Zusammenhang zwischen der Höhe des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals und den Leukozytenreaktionen wie z.B. Chemotaxis nachgewiesen wurde, muß ein Unterschied auf dem Niveau der Signaltransduktion nicht notwendigerweise einen Effekt auf die Leukozytmigration haben.

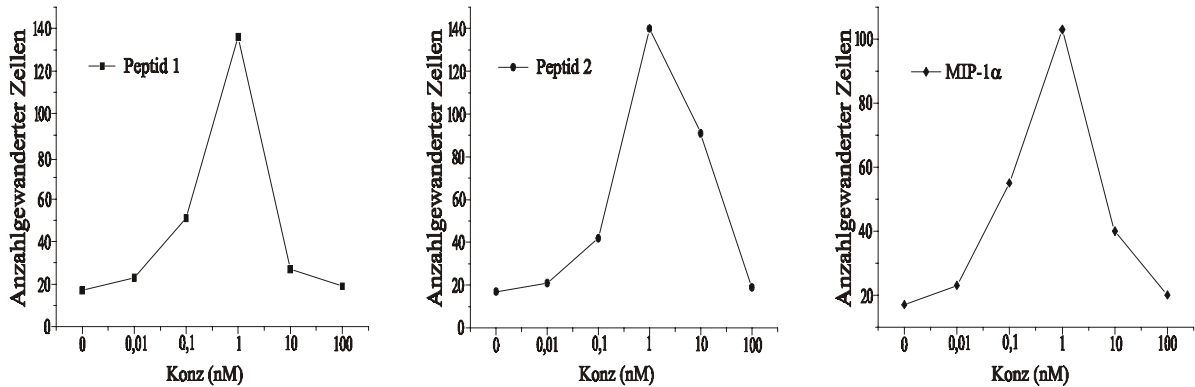
In zukünftigen Untersuchungen sollen Rezeptorbindungsstudien an mit Chemokinrezeptoren stabil transfizierten Zellen, die einzelne definierte Chemokinrezeptoren überexprimieren, durchgeführt werden. Alle bisher aktiven Derivate sollten hierbei an den Rezeptoren CCR1-5 getestet werden. Zusätzlich sollte die Bindung von Peptid 10 an CXC-Rezeptoren untersucht werden, um eine mögliche Verschiebung der Rezeptorselektivität von CC- nach CXC-Chemokinrezeptoren nachzuweisen.

#### 4.5.2 Chemotaxis

Peptid 1 und 2 wurden *in vitro* auf ihre Fähigkeit getestet, Chemotaxis bei Monozyten durch eine semipermeable Polycarbonatmembran auszulösen. Als Positivkontrolle diente MIP-1 $\alpha$ , das die CC-Chemokinrezeptoren CCR1, 4, und 5 aktiviert (Abbildung 23). Beide HCC-2 Derivate induzieren ähnlich wie MIP-1 $\alpha$  Chemotaxis bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  M. Peptid 1 und 2 stimulieren demnach Monozyten in einem physiologisch relevanten Konzentrationsbereich. Das Fehlen der dritten Disulfidbrücke hat keinen Einfluß auf die Aktivierung der Monozyten.

Es ist auffällig, daß die Migration bei einer ChemokinKonzentration von  $10^{-9}$  M ausgelöst wird, bei der es zu keiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung in THP-1-Zellen kommt. Es kann daher

vermutet werden, daß Chemotaxis nicht über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalkaskade induziert wird. Zur näheren Charakterisierung der bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation aktiven HCC-2 Derivate sollten diese in weiteren Versuchen auf ihre Potenz, Chemotaxis in Monozyten oder einer monozytären Zelllinie, wie z.B. HL60-Zellen [129], zu induzieren, untersucht werden.



**Abbildung 23:** Darstellung eines exemplarischen Versuchs zur Stimulation von Chemotaxis bei Monozyten. Chemotaxis wird ausgelöst durch Peptid 1, Peptid 2 und MIP-1 $\alpha$  (Azahl durchgeführter Versuche: N=3).

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden erste Untersuchungen zur Struktur/Aktivitätsbeziehung des neuen humanen CC-Chemokins HCC-2 durchgeführt. Eine notwendige Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit von HCC-2 und HCC-2-Derivaten mit einer nativen Disulfidverbrückung. Die darzustellenden Proteine stellen aufgrund ihrer Größe und ihres Cysteinreichtums schwierige synthetische Zielmoleküle dar, so daß zunächst die Synthese von HCC-2 etabliert wurde.

### 5.1 Synthese von HCC-2 und verwandten Proteinen

Zwei Synthesestrategien, der schrittweise Aufbau der Peptidkette am Harz durch die Fmoc- bzw. Boc-Schutzgruppentaktik und die Segmentkopplung *native chemical ligation* wurden auf ihre grundsätzliche Eignung zur Darstellung von HCC-2 und verwandter Proteine überprüft.

Es konnte gezeigt werden, daß HCC-2 durch eine systematische Optimierung der Fmoc-Chemie in ausreichender Menge und Reinheit dargestellt werden kann. Bei der Totalsynthese des Proteins trat zunächst eine Akkumulation von Fehlsequenzen und Abbruchpeptiden auf, die eine Analyse „schwieriger“ Sequenzbereiche unmöglich machte. Die Sequenz des Proteins wurde daher halbiert, so daß beide Proteinteilstücke separat synthetisiert und analysiert werden konnten. Ein Acetylierungsschritt nach jeder Aminosäurekopplung unterdrückte hierbei die Bildung von Fehlsequenzen und erlaubte so eine eindeutige Identifikation unvollständig koppelnder Aminosäuren, deren Acylierungseffizienz anschließend gezielt verbessert werden konnte.

Da die Primärstruktur von Proteinen den Ablauf der schrittweisen Peptidsynthese bestimmt, ist es bisher nicht gelungen eine universell anwendbare Synthesestrategie für Chemokine und andere Proteine dieser Größe zu etablieren [86, 88, 111]. Aus diesem Grund wurde überprüft, inwieweit sich die hier verwendete Optimierungsstrategie der Fmoc-Chemie auf ein cysteinreiches Protein ähnlicher Größe jedoch signifikant abweichender Aminosäuresequenz, das CC-Chemokin HCC-1, übertragen läßt. Die bei HCC-1 auftretenden Acylierungsprobleme einzelner Aminosäuren, die bei anderen Sequenzbereichen als bei HCC-2 auftreten, konnten erfolgreich identifiziert und optimiert werden. Das Resultat der HCC-1 Synthese weist darauf hin, daß sich die hier verwendete Synthesestrategie grundsätzlich zur Darstellung kleiner Proteine (50-100 Aminosäuren) eignet. Obwohl die hier

etablierte Optimierungsstrategie eine zeitaufwendige, individuelle Analyse unvollständig koppelnder Sequenzbereiche von HCC-1 und HCC-2 notwendig macht, konnten aufbauend auf diesen Ergebnissen HCC-2-verwandte Proteine, die Punktmutationen und N-terminale Verkürzungen enthalten, schnell, in ausreichender Menge und Reinheit für strukturelle und biologische Folgeuntersuchungen dargestellt werden. Dieses Syntheseverfahren basierend auf Fmoc-Chemie eröffnet daher den Zugang zu einer Reihe weiterer pharmakologisch relevanter Proteine, wie z.B. Proteinkinaseinhibitoren und Wachstumsfaktoren. Größere Proteine (> 110 Aminosäuren) sind über eine schrittweisen Peptidsynthese jedoch nur in Einzelfällen zugänglich (z.B. HIV-Protease), da im Laufe der Synthese eine mögliche Aggregation der wachsenden Peptidkette sowie die Bildung von Sekundärstrukturelementen zu geringeren Acylierungseffizienzen der Aminosäure bzw. zum Abbruch der Peptidkette führen.

HCC-2 und HCC-1 wurden alternativ unter Verwendung der Boc-Schutzgruppentaktik in manueller Arbeitsweise dargestellt. Trotz einer zur Fmoc-Chemie analogen Aktivierung der Aminosäuren mit HBTU resultierte ein Rohprodukt von deutlich minderer Qualität. Da bei der Boc-Chemie andere Seitenkettenschutzgruppen und Harze als bei der Fmoc-Chemie eingesetzt werden, ist die Vielzahl der Nebenprodukte auf eine vermehrte Bildung von Sekundärstrukturelementen im Laufe der Peptidsynthese und auf Adduktbildungen bei der Abspaltung des Produkts vom Harz mit Flußsäure zurückzuführen. Die Synthese von HCC-2 und HCC-1 durch Boc-Chemie scheint daher im Vergleich zur Fmoc-Schutzgruppentaktik ein weniger geeignetes Syntheseverfahren zu sein. Die im Gegensatz zur automatisierten Fmoc-Synthese sehr zeitaufwendige manuelle Durchführung von Boc-Synthesen stellt einen weiteren Hinderungsgrund dar, die Boc-Chemie analog zur Fmoc-Chemie durch eine Analyse schwieriger Sequenzbereiche weiter zu optimieren. Die erhaltenen Resultate zeigen jedoch eindeutig, daß eine von Clark-Lewis *et al.* [130] publizierte generelle und einheitliche Darstellung von Chemokinen über Boc-Chemie, ohne eine eingehende Analyse der individuell unterschiedlichen Primärstruktur der Proteine, wenig realistisch ist.

Erste methodische Untersuchungen zur *native chemical ligation*, in denen authentische Peptidsegmente von HCC-2 ligiert wurden, zeigten, daß HCC-2 hierdurch prinzipiell zugänglich ist. Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Synthese des harzgebundenen Peptidthioesters umgeht die bisher notwendige zeitraubende Darstellung eines Thioesterlinkers und vereinfacht so die Ligation wesentlich. Da bei der *native chemical ligation* ungeschützte, wasserlösliche Segmente eingesetzt wurden, konnte das

Ligationsprodukt analog zur Fmoc-Chemie direkt über nur einen chromatographischen Schritt isoliert und weiterverarbeitet werden.

Die Segmentkopplung stellt eine effiziente Alternative zum schrittweisen Aufbau der Peptidkette durch die Fmoc-Chemie dar. Bei der Ligation werden kurze Proteinteilstücke eingesetzt, die sich in der Regel unproblematisch darstellen lassen. Eine individuelle Optimierung ist daher nicht notwendig, so daß unterschiedlichste Proteine schnell und einfach zugänglich sind. Speziell modifizierte Aminosäuren, die z.B. aufgrund eines erhöhten sterischen Anspruchs nur eine geringe Acylierungseffizienz aufweisen, können eingebaut werden, da das betroffene Segment in einem größeren Ansatz dargestellt werden kann und so die Ausbeute der Gesamtsynthese nicht beeinflußt. Die durch die Ligation gebildeten linearen Proteine werden mit in einer höheren Reinheit und Ausbeute als bei der Fmoc-Chemie erhalten, da das wasserlösliche Segment vorgereinigt eingesetzt werden kann. Ein von Hackeng *et al.* [131] kürzlich entwickelter Thiolinker ermöglicht eine unkomplizierte Synthese löslicher Thioesterpeptide über Boc-Chemie, wodurch die Reinheit und Ausbeute der Reaktion noch weiter verbessert werden könnte.

Weiterführende Untersuchungen zur Etablierung der Ligation müssen in Zukunft jedoch noch durchgeführt werden. Die Darstellung cysteinreicher Proteine wie z.B. der Chemokine HCC-2 und HCC-1 könnte durch eine multiple Ligation kleinerer Peptidsegmente weiter optimiert werden. Gezielt modifizierte Derivate, die Veränderungen auf nur einem Proteinsegment tragen, könnten auf diesem Weg wesentlich schneller als mit der schrittweisen Peptidsynthese dargestellt werden. Obwohl die Segmentkopplung *native chemical ligation* bisher nicht vollständig entwickelt ist, birgt dieses Syntheseverfahren, im besonderen die multiple Ligation, zukünftig ein großes Potential zur schnellen Darstellung großer, cysteinreicher Proteine (bis zu 200 Aminosäuren) [131]. Insbesondere der Einbau unnatürlicher Aminosäuren sowie kombinatorischer Synthesen kommen durch diese Möglichkeiten in Betracht.

Die Disulfidbrücken von HCC-2, einem Großteil der HCC-2-Derivate sowie HCC-1 konnten über eine oxidative Faltung in Gegenwart des Redoxsystems Cys/Cys<sub>2</sub> selektiv eingeführt werden. Die regioselektive Verbrückung der Cysteine in [Ala64,104]HCC-2(48-113) stellt eine sinnvolle Alternative zur oxidativen Faltung dar, da sie eine definierte Disulfidverbrückung des resultierenden Proteins gewährleistet. Dies erspart die aufwendige Analyse der Verbrückung unspezifisch oxidierten Disulfidisomere, die z.B. bei der oxidativen Faltung von [Asp64,104]HCC-2(48-113) und [Ala64, Pro104]HCC-2(48-113) entstehen. Die durch die optimierte Fmoc-Chemie dargestellten und anschließend gefalteten Proteine wurden

innerhalb von 3-4 Wochen in Mengen von mehreren Milligramm (10-20 mg) erhalten, was durch rekombinante Techniken nicht möglich ist. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von ca. 2,5% (bezogen auf 1 mmol eingesetztes Harz). Das primäre Ziel, das Chemokin HCC-2 und gezielt modifizierte HCC-2-Derivate in ausreichender Menge für biologische und strukturelle Folgeuntersuchungen auf synthetischen Weg darzustellen wurde somit erreicht. Da bei der regioselektiven Synthese von [Ala64,104]HCC-2(48-113) ein zusätzlicher Reinigungsschritt nach der Bildung des monozyklischen Intermediats notwendig ist, liegt hier die Gesamtausbeute bei ca. 1%. [Asp64,104]HCC-2(48-113) und [Ala64, Pro104]HCC-2(48-113) wurden in geringerer Ausbeute erhalten, da die Sequenzmodifikationen offensichtlich die für die Faltung notwendigen intramolekularen Wechselwirkungen stören.

## 5.2 Die Struktur/Aktivitätsbeziehung von HCC-2

Die Funktion der ungewöhnlichen dritten Disulfidbrücke zwischen Cystein 64 und 104, des Aminoterminus, der C-terminalen  $\alpha$ -Helix und der bei allen CC-Chemokinen konserviert vorliegenden Aminosäure Tyr70 sollte anhand von Punktmutationen und N-terminalen Modifizierungen in Bezug auf die oxidative Faltung, die dreidimensionale Struktur sowie die biologische Aktivität von HCC-2 untersucht werden.

Hierzu wurde zunächst HCC-2(48-113) eingehend untersucht. Die sechs freien Cysteine des linearen HCC-2 falten ausschließlich d.h. selektiv in Gegenwart eines Redoxpuffers zu einem korrekt verbrückten Produkt (Cystein 53-77, Cystein 54-93 und Cystein 64-104). Obwohl HCC-2(48-113) im Vergleich zum Proprotein HCC-2(22-113) um 26 Aminosäuren N-terminal verkürzt vorliegt, beinhaltet dieses Protein alle für eine selektive Faltung notwendigen Informationen.

NMR-spektroskopische Strukturuntersuchungen von HCC-2(48-113) zeigten, daß dieses Chemokin die chemokin-typische Tertiärstruktur, bestehend aus einem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt und einer darüberliegenden C-terminalen  $\alpha$ -Helix ausbildet [100]. Die ungewöhnliche dritte Disulfidbrücke scheint keine Auswirkung auf die dreidimensionale Struktur von HCC-2 zu haben und legt wahrscheinlich die Orientierung der N-terminalen Aminosäuren in Position 62 bis 67 fest. Diese Aufgabe wird bei den zweifach verbrückten Chemokinen durch das konservierte Tryptophan erfüllt, das in HCC-2 durch Gly100 ersetzt ist. Im Gegensatz zu den meisten anderen CC- und CXC-Chemokinen, die zur einer spezifischen Oligomerisierung unterschiedlichen Grades neigen, liegt HCC-2 unter den



Bedingungen der bisher durchgeführten Messungen (NMR, SEC) ausschließlich als Monomer vor. Geringfügige Sequenzunterschiede sind vermutlich für die fehlende Dimerisierungsneigung von HCC-2 verantwortlich.

Es konnte gezeigt werden, daß HCC-2(48-113) einen temporären intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in THP-1-Zellen (eine leukämische, monozytäre Suspensionszelllinie) sowie die Migration von Monozyten bei physiologisch relevanten Konzentrationen induziert. Wie erwartet unterschieden sich die rekombinant und synthetisch erzeugten Chemokine nicht. Die hier beobachtete biologische Aktivität des monomeren HCC-2(48-113) ist ein weiterer Hinweis darauf, daß Chemokinrezeptoren *in vitro* und *in vivo* durch monomere und nicht dimere Chemokine aktiviert werden. Dieser Befund stimmt mit Untersuchungen überein, aus denen klar hervorgeht, daß bei physiologisch relevanten Konzentrationen alle Chemokine dissoziiert vorliegen [37]. Neueste Untersuchungen zur Dimerisierungsneigung der Chemokine RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  legen jedoch nahe, daß auch die aggregierte Form der Chemokine biologische Effekte über Chemokinrezeptor-unabhängige Signaltransduktionswege wie z.B. über Glycosaminglycane vermitteln [39]. Sollten Chemokine zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden, würden bei einer Applikation der Proteine lokal erhöhte Konzentrationen auftreten unter denen die meisten Chemokine dimerisieren und daher ungewollte Nebenwirkungen verursachen könnten. Monomere Chemokine wie z.B. HCC-2 stellen demzufolge interessante Zielmoleküle zur weiteren Erforschung der Mechanismus der Aggregation und deren Unterdrückung dar.

### 5.2.1 Die Funktion der dritten Disulfidbrücke

Der Einfluß der für HCC-2 charakteristischen dritten Disulfidbrücke wurde anhand der Proteine [Ala64,104]HCC-2(48-113), [Asp64,104]HCC-2(48-113) und [Cys(Acm)64,104]HCC-2(48-113) untersucht, die alle die vier typischen Cysteine der Chemokine in konservierter Position tragen.

Von allen drei Proteinen konnte nur [Ala64,104]HCC-2(48-113), das anstelle der Cysteine 64 und 104 die sterisch weniger anspruchsvolle Aminosäure Alanin trägt, selektiv zum korrekt verbrückten Produkt falten. Ein Selektivitätsverlust der oxidativen Faltung wurde für [Asp64,104]HCC-2(48-113) und [Cys(Acm)64,104]HCC-2(48-113) beobachtet. [Ala64,104]HCC-2(48-113) weist im Vergleich zu HCC-2(48-113) eine sehr ähnliche

dreidimensionale Struktur auf. Abgesehen von geringfügigen Verschiebungen der Orientierung der Seitenkette von Ile72 wurden keine Veränderungen beobachtet. Die beiden erhaltenen zweifach verbrückten Disulfidisomere von [Asp64,104]HCC-2(48-113) hingegen bilden nach NMR-Experimenten keine definierte Tertiärstruktur aus. [Ala64,104]HCC-2(48-113) induziert in gleicher Weise wie HCC-2(48-113) bei physiologisch relevanten Konzentrationen eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung in THP-1-Zellen sowie Chemotaxis bei Monozyten, wohingegen die Disulfidisomere von [Asp64,104]HCC-2(48-113) entsprechend ihrer undefinierten Struktur inaktiv sind.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die ungewöhnliche dritte Disulfidbrücke von HCC-2 keinen Einfluß die Selektivität und das Produkt der Faltung, die Ausbildung der Tertiärstruktur sowie die biologische Aktivität des Chemokins hat. Die vier konservierten Cysteine aller Chemokine reichen hierfür aus. Es kann spekuliert werden, daß die dritte Disulfidbrücke eine zusätzliche Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur bewirkt und so das zirkulierende Chemokin vor einem vorzeitigen Abbau durch Proteasen schützt.

Werden an die Stelle der dritten Disulfidbrücke jedoch eine erhöhte sterische Hinderung, verursacht durch die Cysteinseitenkettenschutzgruppe AcM oder negative Ladungen, durch die beiden  $\gamma$ -Carboxygruppen der Asparaginsäure, gesetzt, so verläuft die bisher selektive oxidative Faltung unspezifisch. Eine sterische Hinderung oder sogar eine Abstoßung der Peptidketten in Position 64 und 104 aufgrund zweier negativer Ladungen unterdrücken demzufolge eine für die oxidative Faltung essentielle, intramolekulare Wechselwirkung. Die Selektivität des Faltungsprozesses wird daher zusätzlich zu den Wechselwirkungen der vier konservierten Cysteine durch eine kovalente Bindung bzw. die räumliche Annäherung der Peptidregionen um Cys64 und 104 gesteuert. Keines der oxidierten Produkte von [Asp64,104]HCC-2(48-113) scheint das für Chemokine typische dreisträngige  $\beta$ -Faltblatt bzw. die C-terminale  $\alpha$ -Helix auszubilden. Eines der Produkte der oxidativen Faltung von [Cys(AcM)64,104]HCC-2(48-113) hingegen zeigte nach einer sich anschließenden Einführung der dritten Disulfidbrücke die chemokin-typische Tertiärstruktur. Während eine erhöhte sterische Hinderung nur zu einem Selektivitätsverlust der Faltung führt, scheint eine komplette Unterdrückung der Annäherung der Peptidregionen um Position 64 und 104, verursacht durch eine möglichst weite Abstoßung negativer Ladungen, mit der Bildung der dreidimensionalen Struktur des Chemokins unvereinbar zu sein. Aufgrund des Verlusts der

Tertiärstruktur sind beide Produkte von [Asp64,104]HCC-2(48-113) folglich nicht mehr in der Lage, die Membranrezeptoren CCR1 und CCR3 von HCC-2 zu aktivieren

### 5.2.2 Die Rolle des N-Terminus

Zwei N-terminal verlängerte und drei N-terminal verkürzte Derivate von HCC-2(48-113) wurden dargestellt. Alle N-terminal modifizierten Peptide falten oxidativ analog zu HCC-2(48-113) selektiv zum korrekt verbrückten Protein. Der Aminoterminus des Chemokins ist in den Faltungsprozeß folglich nicht bzw. nur in untergeordnetem Maße involviert. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß das N-terminal um 26 Aminosäuren verlängerte HCC-2(22-113) analog zu HCC-2(48-113) vermutlich ausschließlich als Monomer vorliegt. Systematische NMR-spektroskopische Strukturuntersuchungen des CC-Chemokins MIP-1 $\beta$  haben gezeigt, daß N-terminale Verkürzungen nicht die Tertiärstruktur jedoch die Oligomerisierungsneigung der Chemokine beeinflussen [35]. Da weder bei HCC-2(22-113) noch bei dem um 26 Aminosäuren N-terminal verkürzten HCC-2(48-113) eine dimere Quartärstruktur auftritt, kann für die vier verbleibenden, N-terminal nur noch um bis zu drei Aminosäuren verkürzten HCC-2-Derivate eine zu HCC-2(48-113) analoge monomere Tertiärstruktur angenommen werden.

Mit Ausnahme von HCC-2(22-113) stimulieren alle N-terminal modifizierten Peptide dosisabhängig eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung in THP-1-Zellen. Das 92 Aminosäuren enthaltene Protein ist demnach entweder ein Antagonist oder wahrscheinlicher eine biologisch inaktive Form von HCC-2. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Arbeiten von Youn *et al.* [79], in denen eine agonistische Aktivität des rekombinant in *E. coli* erzeugten Chemokins an CCR1- und CCR3-Rezeptoren gezeigt wurde. Unter Berücksichtigung, daß das Gen von HCC-2 ein sekretorisches Signalpeptid aufweist, legen die hier erhaltenen Ergebnisse nahe, daß es sich bei HCC-2(22-113) um das inaktive bzw. sehr schwach aktive Proprotein von HCC-2 handelt. Proproteine werden nach der Transkription aus der Zelle ausgeschleust und im Folgenden durch eine proteolytische Prozessierung in das funktionell aktive Peptid, wie z.B. HCC-2(48-113), konvertiert. Diese Vermutung sollte in Zukunft durch weitere biologische Versuchssysteme bestätigt werden.

Die Verkürzung des Aminoterminus von HCC-2 führte im Gegensatz zu Studien an RANTES [51, 52], MCP-1 [45, 46] und MDC [44] zu keiner antagonistische Aktivität der resultierenden

HCC-2-Derivate. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zum Zweistufenbindungsmodell der Chemokine (siehe 1.3), da die bisher durchgeführten biologischen Versuche nicht geeignet sind, spezifische Unterschiede der Ligand-Rezeptor-Interaktionen der einzelnen HCC-2-Derivate exakt nachzuweisen. Unterschiede in der maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation weisen jedoch auf mögliche Veränderungen der Rezeptorselektivität und -aktivierung hin. Abhängig von der Länge des N-Terminus ist es denkbar, daß verschiedene CC-Chemokinrezeptoren, in diesem Fall CCR1 und CCR3, in unterschiedlichem Ausmaß aktiviert bzw. blockiert werden. Aufbauend auf diesen initialen Untersuchungen werden z. Z. quantitative Bindungsstudien an stabil mit nur einem CC-Chemokinrezeptor (CCR1 oder CCR3) transfizierten Zellen durchgeführt. Diese Studien erlauben die Kinetik der Rezeptor-Ligand-Interaktion und die Affinitätsunterschiede einzelner Liganden nachzuweisen, wodurch funktionelle Unterschiede der N-terminal verkürzten HCC-2-Derivate im Detail aufgeklärt werden können.

### 5.2.3 Die Rolle der $\alpha$ -Helix

Die Funktion der C-terminalen  $\alpha$ -Helix sollte anhand von [Ala64, Pro104]HCC-2(48-113) untersucht werden, in dem die Bildung dieses Strukturelements durch eine Substitution von Cys104 gegen ein helixbrechendes Prolin gestört wurde. Die oxidative Faltung dieses Proteins verlief in hohem Ausmaß unspezifisch. Es bildete sich bevorzugt ein monozyklisches Produkt sowie zwei zweifach verbrückte Disulfidisomere. Keines der beiden zweifach verbrückten Isomere zeigte bei NMR-Untersuchungen eine definierte Tertiärstruktur. Demnach unterdrückt die Substitution von Cys104 gegen Prolin nicht nur wie beabsichtigt die Bildung der C-terminalen  $\alpha$ -Helix, sondern ebenso die Bildung des chemokin-typischen dreisträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts. Dieser überraschende Befund weist darauf hin, daß die  $\alpha$ -Helix ein essentieller Bestandteil der Gesamtstruktur von HCC-2 ist, welche die Ausbildung der Tertiärstruktur und damit die Selektivität der oxidativen Faltung maßgeblich beeinflusst. Keines der beiden erhaltenen Disulfidisomere stimulierte eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung in THP-1-Zellen. Dies ist aufgrund der fehlenden Tertiärstruktur des Chemokins nicht verwunderlich.

Anhand von [Ala64, Pro104]HCC-2(48-113) konnte der Einfluß der  $\alpha$ -Helix auf die Ligand-Rezeptor-Interaktion von HCC-2 nicht aufgeklärt werden, da die fehlende  $\alpha$ -Helix zu einem kompletten Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur des Chemokins führt. Ein hierzu

widersprüchliches Ergebnis wurde von Clark-Lewis *et al.* [43] bei der Synthese C-terminal verkürzter Derivate des CXC-Chemokins IL-8 erhalten. Analog zu der in dieser Arbeit verfolgten Synthesestrategie wurden dort IL-8-Derivate durch einen schrittweisen Aufbau der Peptidkette und einer sich anschließenden oxidativen Faltung erhalten. In Folgeuntersuchungen zeigte ein IL-8-Derivat, dem die C-terminale  $\alpha$ -Helix sowie ein  $\beta$ -Turn fehlten, eine verminderte, jedoch detektierbare chemotaktische Aktivität an neutrophilen Granulozyten. Es war darüber hinaus in der Lage, an neutrophilen Granulozyten gebundenes, iodiertes IL-8 zu verdrängen. Die biologische Aktivität dieses IL-8-Derivats legt nahe, daß es im Gegensatz zu [Ala64, Pro104]HCC-2(48-113) trotz der fehlenden  $\alpha$ -Helix alle anderen prinzipiell für die Rezeptorinteraktion notwendigen Strukturelemente ausbildet. Untersuchungen an anderen Chemokinen müssen zeigen, ob die bei HCC-2 beobachtete essentielle Rolle der  $\alpha$ -Helix für die Ausbildung der Tertiärstruktur generell gültig ist oder ausschließlich hier auftritt. Um die funktionelle Relevanz der  $\alpha$ -Helix von HCC-2 aufzuklären, muß für ein geeignetes Derivat eine alternative Synthesestrategie etabliert werden. Ein möglicher Ansatz könnte die enzymatische Abspaltung der kompletten  $\alpha$ -Helix aus dem korrekt verbrückten Chemokin [Ala64,104]HCC-2(48-113) sein.

#### 5.2.4 Die Rolle der Einzelmutation Tyr70Leu

Für das CXC-Chemokin IL-8 konnte gezeigt werden, daß eine Substitution der konservierten Aminosäure Leucin70 im ersten Strang des  $\beta$ -Faltblatts gegen sterisch aufwendigere Aminosäuren wie z.B. Tyrosin zu einer verminderten CXC-Chemokinaktivität jedoch auch zu einer neu hinzu gewonnenen agonistischen Aktivität an CC-Chemokinrezeptoren führt [132, 42]. CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen der IL-8-Mutanten legen die Vermutung nahe, daß der im Vergleich zu CXC-Chemokinen verminderte  $\alpha$ -helikale Strukturanteil ein Grund für die agonistische Aktivität an dem CCR1-Rezeptor ist. Der  $\alpha$ -helikale Anteil der CC-Chemokine liegt sogar noch darunter. Um den Mechanismus der Rezeptorselektivität der Chemokinfamilien eingehender zu untersuchen, wurde ein HCC-2-Derivat dargestellt, in dem das bei den CC-Chemokinen an dieser Stelle konservierte Tyrosin durch Leucin ersetzt wurde.

Anhand von [Leu70]HCC-2(48-113) konnte gezeigt werden, daß diese Einzelsubstitution weder die Selektivität der oxidativen Faltung, die Tertiärstruktur, noch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulation in THP-1-Zellen beeinflusst. NMR-Strukturuntersuchungen zeigen eindeutig, daß sich der  $\alpha$ -helikale Anteil dieses Chemokins im Vergleich zu HCC-2(48-113)

---

nicht verändert hat. Sollte der  $\alpha$ -helikale Anteil der Tertiärstruktur für die spezifische Rezeptorerkennung der CC- und CXC-Chemokine verantwortlich sein, so müßten Folgeuntersuchungen zeigen, daß [Leu70]HCC-2(48-113) keine neu hinzugewonnene CXC-Chemokinaktivität aufweist. Die bisher durchgeführten Untersuchungen eignen sich indes nicht, Effekte auf die Rezeptorerkennung und -selektivität nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde jedoch die Voraussetzung für Rezeptorbindungsstudien an CXC- und CC-Chemokinrezeptoren geschaffen, die den Effekt der hier vorgenommenen Einzelsubstitution auf die Affinität und Kinetik der Ligand-Rezeptor-Interaktion nachweisen werden. Ebenso erlaubt die entwickelte Synthesemethodik die Herstellung von praktisch beliebigen Chemokin-Chimären, die wichtige Hilfsmittel bei der Aufklärung der Interaktion von Chemokinen und ihrer spezifischen Zelloberflächenrezeptoren darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Chemokine spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Rekrutierung bestimmter Leukozytenfamilien und beeinflussen so maßgeblich die Pathogenese entzündlicher Krankheiten. Das Interesse an dem Mechanismus der Ligand-Rezeptor-Interaktion der Chemokine ist seit der Entdeckung, daß HIV Leukozyten über Chemokinkorezeptoren infiziert, erheblich gestiegen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Struktur/Aktivitätsbeziehung des neuen humanen CC-Chemokins HCC-2 anhand synthetischer Derivate aufgeklärt werden. Aus diesem Grund wurden verschiedene Synthesestrategien, die schrittweise Peptidsynthese und die Segmentkopplung durch *native chemical ligation* und Schutzgruppentaktiken, Boc- und Fmoc-Chemie, auf ihre Eignung zur Darstellung von HCC-2 und verwandter Proteine erprobt. Die zwei bzw. drei Disulfidbrücken dieser Proteine wurden durch eine oxidative Faltung und alternativ durch einen regio- und semiregioselektiven Ansatz selektiv eingeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß HCC-2(48-113) und HCC-2-Derivate über eine optimierte Fmoc-Synthesestrategie, gefolgt von einer oxidativen Faltung der linearen Peptide schnell und in hoher Reinheit hergestellt werden können. Unvorhergesehene Modifikationen durch posttranslationale Prozessierungen, wie sie bei der Expression von HCC-2 in verschiedenen Wirtsorganismen beobachtet wurden, werden so umgangen. Das verwandte Chemokin HCC-1 konnte durch einen analogen Syntheseweg ebenfalls synthetisiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete Syntheseverfahren basierend auf einer systematische Optimierung des Fmoc-Chemie ermöglicht demzufolge auch den Zugang auch zu anderen pharmakologisch relevanten Proteinen von ähnlicher Größe. Erste Untersuchungen zur *native chemical ligation* zeigten, daß diese Methode zukünftig ein vielversprechendes Potential zur Darstellung größerer cysteinreicher Proteine aufweist.

Strukturuntersuchungen von HCC-2(48-113) zeigten, daß dieses Chemokin die typische Tertiärstruktur aller Chemokine, jedoch keine dimere Quartärstruktur ausbildet. Es konnte zudem nachgewiesen werden, daß die C-terminale  $\alpha$ -Helix für die Bildung der Sekundär- und Tertiärstrukturelemente von HCC-2 essentiell ist. Die dritte Disulfidbrücke, die Länge des Aminoterminus sowie eine Einzelsubstitution (Tyr70Leu) auf dem ersten Strang des  $\beta$ -Faltblatts hingegen beeinflussen die dreidimensionalen Struktur von HCC-2 nicht. Mit Ausnahme von HCC-2(22-113) bewirken alle HCC-2-Derivate mit einer stabilen Tertiärstruktur *in vitro* eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Weitere detaillierte Untersuchungen insbesondere Rezeptorbindungsstudien sind notwendig, um die Veränderungen der Rezeptorselektivität und -aktivierung der N-terminal modifizierten HCC-2-Derivate sowie der Leucin70-Mutante eingehender zu untersuchen. Die bisher durchgeführten und nunmehr möglichen exakten Studien zur Struktur/Aktivitätsbeziehung von HCC-2 stellen eine Grundlage zur Charakterisierung des Mechanismus der Chemokinrezeptorbindung und -aktivierung dar. Hierdurch kann die notwendige Voraussetzung für ein Design therapeutisch wirksamer Chemokinrezeptorantagonisten geschaffen werden.

## 7 Literatur

1. Kalinkovich, A., Weisman, Z. und Bentwich, Z. (1999) Chemokines and chemokine receptors: Role in HIV infection. *Immunol. Lett.* **68**, 281-287.
2. Barnes, D.A., Tse, J., Kaufhold, M., Qwen, M., Hesselgesser, J., Strieter, R., Horuk, R. und Perez, H.D. (1998) Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. *J. Clin. Invest.* **101**, 2910-2919.
3. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., Charo, I.F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2<sup>+</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**, 894-897.
4. Kennedy, J., Kelner, G.S., Kleyensteuber, S., Schall, T.J., Weiss, M.C., Yssel, H., Schneider, P.V., Cooks, B.G., Bacon, K.B. und Zlotnik, A. (1995) Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* **155**, 203-209.
5. Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A. und Schall, T.J. (1997) A new class of membrane-bound chemokines with a CX<sub>3</sub>C motif. *Nature* **385**, 640-644.
6. Naruse, K., Ueno, M., Satoh, T., Nomiya, H., Tei, H., Takeda, M., Ledbetter, D.H., Van Coillie, E., Opendakker, G., Gunge, N., Sakkai, Y., Iio, M. und Miura, R. (1996) A YAC contig of the human CC chemokine gene clustered on chromosome 17q11.2. *Genomics* **34**, 236-240.
7. Modi, W.S. und Chen, Z.Q. (1998) Localization of the human CXC chemokine subfamily on the long arm of chromosome 4 using radiation hybrids. *Genomics* **47**, 136-139.
8. Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H. und Baggiolini, M. (1987) Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil activating factor produced by monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 755-761.
9. Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J. und Leonard, E.J. (1987) Purification of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9233-9237.
10. Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J.P. und Opendakker, G. (1992) Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J. Exp. Med.* **176**, 59-65.
11. Schulz-Knappe, P., Mägert, H.J., Dewald, B., Meyer, M., Cetin, Y., Kubbies, M., Kirchhoff, K., Raida, M., Adermann, K., Kist, A., Reinecke, M., Sillard, R., Pardigol, A., Ugucioni, M., Baggiolini, M. und Forssmann, W.G. (1996) HCC-1, a novel chemokine from human plasma. *J. Exp. Med.* **183**, 295-299.
12. Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T. und Honjo, T. (1993) Single sequence trap: A cloning strategy for secreted proteins and type 1 membrane proteins. *Science* **261**, 600-603.
13. Rossi, D.L., Vicari, A.P., Franz-Bacon, K., McClanhan, T.K. und Zlotnik, A. (1997) Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines MIP-3 $\alpha$  and MIP-3 $\beta$ . *J. Immunol.* **158**, 1033-1036.
14. Murphy, P.M. (1996) Chemokine receptors: Structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Fact. Rev.* **7**, 47-64.



15. Zlotnik, A., Morales, J. und Hedrick, J.A. (1999) Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit. Rev. in Immunol.* **19**, 1-47.
16. Horuk, R., Chitins, C.E., Darbonne, W.C., Colby, T.J., Rybicki, A., Hadley, T.J. und Miller, L.H. (1993) A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: The erythrocyte chemokine receptor. *Science* **261**, 1182-1184.
17. LiWang, A.C., Jing, Cao, J., Zheng, H., Lu, Z., Peiper, S.C. und LiWang, P.J. (1999) Dynamic study of the anti-human immunodeficiency virus chemokine viral macrophage-inflammatory protein-II (VMIP-II) reveals a fully monomeric protein. *Biochemistry* **38**, 442-453.
18. Devalaraja, M.N. und Richmaond, A. (1999) Multiple chemotactic factors: Fine controll or redundancy? *TiPS* **20**, 151-156.
19. Mantovani, A. (1999) The chemokine system: Redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* **20**, 254-257.
20. Uggucioni, M., D'Apuzzo, M., Loetscher, M., Dewald, B., und Baggiolini, M. (1995) Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **25**, 64-68.
21. Barrett, J.R. (1997) Chemokines. *Blood* **90**, 909-928.
22. Clore, G.M., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K. und Gronenborn, A.M. (1990) Three-dimensional structure of interleukin-8 in solution. *Biochemistry* **29**, 1689-1696.
23. Baldwin, E.T., Weber, I.T., St. Charles, R., Xuan, J.C., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., Edwards, B.F., Clore, G.M., Gronenborn, A.M. und Wlodawer, A. (1991) Crystal structure of interleukin-8: Symbiosis of NMR and crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 502-506.
24. Crump, M.P., Gong, J.H., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, A., Virelizier, J.L., Baggiolini, M., Sykes, B.D. und Clark-Lewis, I. (1997) Solution structure and basis for the functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* **16**, 6996-7007.
25. Skelton, N.J., Aspiras, F., Ogez, J. und Schall, T. (1995) Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type. *Biochemistry* **34**, 5329-5342.
26. Chung, C., Cooke, R.M., Proudfoot, A.E.I. und Wells, T.N.C. (1995) The three-dimensional solution structure of RANTES. *Biochemistry* **34**, 9307-9314.
27. Kim, K.S., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I. und Sykes, B.D. (1996) Structural characterization of a monomeric chemokine: Monocyte chemoattractant protein-3. *FEBS Lett.* **395**, 277-282.
28. Meunier, S., Bernassau, J.M., Guillemot, J.C., Ferrara, P. und Darbon, H. (1997) Determination of the three dimensional structure of the CC chemokine monocyte chemoattractant protein 3 by  $^1\text{H}$  two dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **36**, 4412-4422.
29. Crump, M.P., Rajarathnam, K., Kim, K.S., Clark-Lewis, I. und Sykes, B.D. (1998) Solution structure of Eotaxin, a chemokine that selektivly recruits eosinophils in allergic inflammation. *J. Biol. Chem.* **273**, 22471-22479.
30. Young, H., Roongta, V., Daly, T.J. und Mayo, K.H. (1999) NMR structure and dynamics of the monomeric neutrophil-activating peptide 2. *Biochemistry* **338**, 591-598.

31. Mizoue, L.S., Bazan, J.F., Johnson, E.C. und Handel, T.M. (1998) Solution structure and dynamics of the CX<sub>3</sub>C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX<sub>3</sub>CR1. *Biochemistry* **38**, 1402-1414.
32. Crump, M.P., Clore, M.G. und Gronenborn, A.M. (1995) Three-dimensional structures of  $\alpha$  and  $\beta$  chemokines. *FASEB J.* **9**, 57-62.
33. Clark-Lewis, I., Kim, K.S., Rajarathnam, K., Gong, J.H., Dewald, B., Moser, B., Baggiolini, M. und Sykes, B.D. (1995) Structure-activity relationship of chemokines. *J. Leuk. Biol.* **57**, 703-711.
34. Schnitzel, W., Monschein, U. und Besemer, J. (1994) Monomer-dimer equilibria of interleukin-8 and neutrophil-activating peptide 2. Evidence for IL-8 binding as a dimer and oligomer to IL-8 receptor B. *J. Leuk. Biol.* **55**, 763-770.
35. Laurence, J.S., LiWang, A.C. und LiWang, P.J. (1998) Effect of the N-terminal truncation and solution on chemokine dimer stability: Nuclear magnetic resonance structural analysis of macrophage inflammatory protein 1 $\beta$  mutants. *Biochemistry* **37**, 9346-9354.
36. Lodi, P.J., Garrett, D.S., Kuszewski, J., Tsang, M.L.S., Leonard, W.J., Gronenborn, A.M. und Clore, G.M. (1994) High resolution solution structure of the  $\beta$  chemokine hMIP-1 $\beta$  by multidimensional NMR. *Science* **263**, 1762-1767.
37. Paolini, J.F., Willard, D., Consler, T., Luther, M. und Krangel, M.S. (1994) The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. *J. Immunol.* **153**, 2704-2712.
38. Witt, D.P. und Lander, A.D. (1994) Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr. Biol.* **4**, 394-400.
39. Czaplewski, L.G., McKeating, J., Crayen, C.J., Higgins, L.D., Appay, V., Brown, A., Dudgeon, T., Howard, L.A., Meyers, T., Owen, J., Palan, S.R., Tan, P., Wilson, G., Woods, N.R., Heyworth, C.M., Lord, B.I., Brotherton, D., Christison, R., Criag, S., Cibbes, S., Edwards, R.M., Evans, S.J., Gilbert, R., Morgan, P., Randle, E., Schofield, N., Varley, P.G., Fisher, J., Waltho, J.P. und Hunter, M.G. (1999) Identification of the amino acid residues critical for aggregation of human CC chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and RANTES. *J. Biol. Chem.* **274**, 16077-16084.
40. Clark-Lewis, I., Dewald, B., Loetscher, M., Moser, B. und Baggiolini, M. (1994) Structural requirements for IL-8 function identified by design of analogs and CXC chemokine hybrids. *J. Biol. Chem.* **269**, 16075-16081.
41. Rajarathnam, K., Sykes, B. D., Dewald, B., Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (1999) Disulfide bridges in interleukin-8 probed using non-natural disulfide analogues: Dissociation of role in structure from function. *Biochemistry* **38**, 7653-7658.
42. Lusti-Narasimhan, M., Chollet, A., Power, C.A., Allet, B., Proudfoot, A.E.I. und Wells, T.N.C. (1996) A molecular switch of chemokine receptor selectivity. *J. Biol. Chem.* **271**, 3148-3153.
43. Clark-Lewis, I., Schuhmacher, C., Baggiolini, M. und Moser, M. (1991) Structure-activity relationship of Interleukin-8 determined using chemical synthesized analogs. *J. Biol. Chem.* **266**, 23128-23134.
44. Struyf, S., Proost, P., Sozzani, S., Mantovani, A., Wuyts, A., DeClercq, E., Schols, D. und Van Damme, J. (1998) Enhanced anti-HIV-1 activity and altered chemotactic potency of NH<sub>2</sub>-terminally processed macrophage-derived chemokine (MDC) imply an additional MDC receptor. *J. Immunol.* **161**, 2672-2675.

45. Weber, M., Uguccioni, M., Baggiolini, M., Clark-Lewis, I. und Dahinden, C.A. (1996) Deletion of the NH<sub>2</sub>-terminal residues converts monocyte chemotactic protein from an activator of basophil mediator release to an eosinophil chemoattractant. *J. Exp. Med.* **183**, 681-685.
46. Gong, J.H. und Clark-Lewis, I. (1995) Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH<sub>2</sub>-terminal residues. *J. Exp. Med.* **181**, 631-640.
47. Nufer, O., Corbett, M., Walz, A. (1999) Amino-terminal processing of chemokine ENA-78 regulates biological activity. *Biochemistry* **38**, 636-642.
48. Elsner, J., Petering, H., Höchstetter, R., Kimming, D., Wells, T.N.C., Knapp, A. und Proudfoot, A.E.J. (1997) The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2892-2898.
49. Simmons, G., Clapham, P.R., Picard, L., Offord, R.E., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Buser, R., Wells, T.N.C. und Proudfoot, A.E.I. (1997) Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* **276**, 276-279.
50. Macphee, C.H., Appelbaum, E.R., Johanson, K., Moores, K.E., Imburgia, C., Fornwald, J., Berkhout, T., Brawner, M., Groot, P.H.E., O'Donnell, K., O'Shannessy, D., Scott, G. und White, J.R. (1998) Identification of a truncated form of the CC chemokine CKβ-8 demonstrating greatly enhanced biological activity. *J. Immunol.* **161**, 6273-6279.
51. Oravecz, T., Pall, M., Roderiquez, G., Gorrell, M.D., Ditto, M., Nguyen, N.Y., Boykins, R., Unsworth, E. und Norcross, M.A. (1997) Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T Cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage. *J. Exp. Med.* **186**, 1865-1872.
52. Struyf, S., De Meester, I., Scharpe, S., Lenaerts, J.P., Menten, P., Wang, J.M., Proost, P. und Van Damme, J. (1998) Natural truncations of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC chemokine inhibitor. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1262-1271.
53. Proost, P., De Meesters, I., Schols, D., Struyf, S., Lambeir, A.M., Wuyts, A., Opdenakker, G., De Clercq, E., Scharpe, S. und Van Damme, J. (1998) Amino-terminal truncations of chemokines by CD26/Dipeptidyl-peptidase IV. *J. Biol. Chem.* **273**, 7222-7227.
54. Baggiolini, M., Dewald, B. und Moser, B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**, 97-179.
55. Moser, B., Dewald, B., Barella, L., Schuhmacher, C., Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (1993) Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modifications. *J. Biol. Chem.* **268**, 7125-7128.
56. Pakianathan, D.R. und Hebert, C.A. (1997) Distinct but overlapping epitopes for the interaction of a CC-chemokine with CCR1, CCR3 and CCR5. *Biochemistry* **36**, 9642-9648.
57. Gong, J.H., Uguccioni, M., Dewald, B., Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (1996) RANTES and MCP-3 antagonists bind multiple chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 10521-10527.
58. Ji, T.H., Grossmann, M. und Ji, I. (1998) G protein-coupled receptors. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **273**, 17299-17302.

59. Wells, T.N.C., Power, C.A., Lusti-Narasimhan, M., Hoogewerf, A.J., Cooke, R.M., Chung, C., Peitsch, M.C. und Proudfoot, A.E.I. (1996) Selectivity and antagonism of chemokine receptors. *J. Leuk. Biol.* **59**, 53-60.
60. Monteclaro, F.S. und Charo, I.F. (1997) The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. *J. Biol. Chem.* **272**, 23186-23190.
61. Skelton, N.J., Quan, C., Reilly, D. und Lowman, H. (1999) Structure of a CXC chemokine-receptor fragment in complex with interleukin-8. *Structure* **7**, 157-168.
62. Pease, J.E., Wang, J., Ponath, P.D. und Murphy, P.M. (1998) The N-terminal extracellular segments of the chemokine receptors CCR1 and CCR3 are determinants for MIP-1 $\alpha$  and Eotaxin binding, respectively, but a second domain is essential for efficient receptor activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 19972-19976.
63. Lowman, H.B., Slage, P.H., DeForge, L.E., Wirth, C.M., Gillece-Castro, B.L., Bourell, J.H. und Fairbrother, W.J. (1996) Exchanging IL-8 and MGSA receptor binding specificities. *J. Biol. Chem.* **271**, 14344-14352.
64. Samson, M., LaRosa, G., Libert, F., Paindavoine, P., Detheux, M., Vassart, G. und Parmentier, M. (1997) The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J. Biol. Chem.* **272**, 24934-24941.
65. Loetscher, P., Gong, J.H., Dewald, B., Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (1998) N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. *J. Biol. Chem.* **273**, 22279-22283.
66. Heveker, N., Montes, M., Germeroth, L., Amara, A., Trautmann, A., Alizon, M. und Schneider-Mergener, J. (1998) Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides. *Current Biologie* **8**, 369-376.
67. Taub, D.D. (1996) Chemokine-leukocyte interactions: the voodoo that they do so well. *Cytokine Growth Fact. Rev.* **7**, 355-376.
68. Butcher, E.C. und Picker, L.J. (1996) Lymphocyte homing and homostasis. *Science* **272**, 60-66.
69. Carlos, T.M. (1994) Leukocyte-endothelium adhesion molecules. *Blood* **84**, 2068-2101.
70. Springer, T.A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 827-872.
71. Tanaka, Y., Adams, D.H. und Shaw, S. (1993) Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leucocytes. *Immunol. Today* **14**, 111-115.
72. Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. und Shaw, S. (1993) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 $\beta$ . *Nature* **361**, 79-82.
73. Rot, A. (1992) Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: Role in neutrophil migration. *Immunol. Today* **13**, 291-294.
74. Rot, A. (1993) Neutrophil attractant/activation protein-1 (IL-8) induces in vitro neutrophil migration by a haptotactic mechanism. *Eur. J. Immunol.* **23**, 303-306.
75. Sugden, P.H. und Clerk, A. (1997) Regulation of the ERK subtype of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell. Signal.* **9**, 337-351.
76. Ihle, J. (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature* **377**, 591-594.
77. Bacon, K.B., Premack, B.A., Gardner, P. und Schall, T.J. (1995) Activation of dual T cell signalling pathways by the chemokine RANTES. *Science* **269**, 1727-1730.

78. Maghazachi, A.A. (1999) Intracellular signalling pathways induced by chemokines in natural killer cells. *Cell. Signal.* **11**, 385-390.
79. Youn, B.S., Zhang, S.M., Lee, E.K., Park, D.H., Broxmeyer, H.E., Murphy, P.M., Locati, M., Pease, J.E., Kim, K.K., Antol, K. und Kwon, S. (1997) Molecular cloning of leucotactin: A novel human  $\beta$ -chemokine, a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and a potent agonist at CC chemokine receptors 1 and 3. *J. Immun.* **159**, 5201-5205.
80. Coulin, F., Power, C.A., Alouani, S., Peitsch, M.C., Schroeder, J.M., Moshizuki, M., Clark-Lewis, I. und Wells, T. (1997) Characterization of macrophage inflammatory protein 5/human CC cytokine-2, a member of the macrophage-inflammatory-protein family of chemokines. *Eur. J. Biochem.* **248**, 507-515.
81. Wang, W., Bacon, K.B., Oldham, E.R. und Schall, T.J. (1998) Molecular cloning and functional characterization of human MIP-1 $\delta$ , a new C-C chemokine related to mouse CCF-18 and C10. *J. Clin. Immun.* **18**, 214-222.
82. Pardigol, A., Forssmann, U., Zucht, H.D., Loetscher, P., Schulz-Knappe, P., Baggiolini, M., Forssmann, W.G. und Mägert, H.J. (1998) HCC-2, a human chemokine: Gene structure, expression pattern, and biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6308-6313.
83. Youn, B.S., Zhang, S.M., Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Antol, K., Fraser, M. und Kwon, S. (1998) Characterization of Ck $\beta$ 8 and Ck $\beta$ 8-1: Two alternatively spliced forms of human  $\beta$ -chemokine, chemoattractants for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and potent agonists at CC chemokine receptor 1. *Blood* **91**, 3118-3126.
84. Rudolph, R. und Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56.
85. Kane, J.F. und Hartley, D.L. (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Tibtech.* **6**, 95-101.
86. Boykin, R.A., Oravec, T., Unsworth, E. und Syin, C. (1999) Chemical synthesis and characterization of chemokine RANTES and its analogues. *Cytokine* **11**, 8-15.
87. Brown, A.R., Covington, M., Newton, R.C., Ramage, R. und Welch, P. (1996) The total synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *J. Pept. Sci.* **2**, 40-46.
88. Clark-Lewis, I., Moser, B., Walz, A., Baggiolini, M., Scott, G.J. und Aebbersold, R. (1991) Chemical synthesis, purification, and characterization of two inflammatory proteins, neutrophil activating peptide 1 (IL-8) and neutrophil activating peptide 2. *Biochemistry* **30**, 3128-3135.
89. Clark-Lewis, I., Aebbersold, R., Ziltener, H., Schrader, J.W., Hood, L.E. und Kent, S.B.H. (1986) Automated chemical synthesis of a protein growth factor for homopoietic cells, interleukin-3. *Science* **231**, 134-139.
90. Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bodi, J., Kimura, T., Tsuji, F.I. und Sakakibara, S. (1998) Chemical synthesis of the precursor molecule of the *aequorea* green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13549-13554.
91. Ueda, H.U., Siani, M.A., Gong, W., Thompson, D.A., Brown, G.G. und Wang, J. (1997) Chemically synthesized SDF-1 $\alpha$  analogue, N33A, is a potent chemotactic agent for CXCR4/Fusin/LESTR-expressing human leukocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 24966-24970.

92. Hackeng, T.H., Mounier, C.M., Bon, C., Dawson, P.E., Griffin, J.H. und Kent, S.B.H. (1997) Total chemical synthesis of enzymatically active human type II secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7845-7850.
93. Lu, W., Qasim, M.A., Laskowski Jr., M. und Kent, S.B.H. (1997) Probing intermolecular main chain hydrogen bonding in serine protein-protein inhibitor complexes: Chemical synthesis of the backbone-engineered turkey ovomucoid third domain. *Biochemistry* **36**, 673-679.
94. Schnölzer, M., Alewood, P., Jones, A.J., Alewood, D. und Kent, S.B.H. (1992) In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **40**, 180-193.
95. Kaiser, E., Colescott, E.L., Bossinger, C.D. und Cook, P.I. (1970) *Anal. Biochem.* **34**, 595.
96. Volkmer-Engert, R., Landgraf, C. und Schneider-Mergener, J. (1998) Charcoal surface-assisted catalysis of intramolecular disulfide bond formation in peptides. *J. Pept. Res.* **51**, 365-369.
97. Tam, J.P., Wu, C.R., Liu, W. und Zhang, J-W. (1991) Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxid. Scope applications. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6657-6662.
98. Schagger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-397.
99. Edman, P. und Begg, G.A. (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-91.
100. Sticht, H., Escher, S.E., Schweimer, K., Forssmann, W-G., Rösch, P. und Adermann, A. (1999) Solution structure of the human CC chemokine 2: A monomeric representative of the CC chemokine subtype. *Biochemistry* **38**, 5995-6002.
101. Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Nilges, M. und Ryan, C.A. (1987) Three-dimensional structure of potatoe carboxypeptidase inhibitor in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics. *Biochemistry* **26**, 8012-8023.
102. Kraulis, P.J., Clore, G.M., Nilges, M., Jones, T.A., Petterson, G., Knowles, J. und Gronenborn, A.M. (1989) Determination of the three-dimensional structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from richoderma reesei. A study using nuclear magnetic resonance and distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* **28**, 7241-7257.
103. Wagner, G., Braun, W., Havel, T.F., Schaumann, T., Go, N. und Wüthrich, K. (1987) Protein structures in solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry. The polypeptide fold of the basic pancreatic trypsin inhibitor determining using two different algorithms, DISGEO and DISMAN. *J. Mol. Biol.* **196**, 611-639.
104. Brünger, A.T. (1993). *X-PLOR Version 3.1*, Howard Hughes Medical Institute & Yale University, New Haven, CT.
105. Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M. und Pastore, A. (1995) Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *EMBO J.* **14**, 3572-3584.
106. Kemmink, J., Darby, N.J., Dijkstra, K., Nilges, M. und Creighton, T.E. (1996) Structure determination of the N-terminal-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N NMR spektroskopie. *Biochemistry* **35**, 7684-7691.
107. Holak, T.A., Nilges, M. und Oschkinat, H. (1989) Improved strategies for the determination of protein structures from NMR data: the solution of acyl carrier protein. *FEBS Lett.* **242**, 649-654.

108. Nilges, M. (1993) A calculation strategy for the structure determination of symmetric dimers by proton NMR. *Proteins* **17**, 297-309.
109. Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I. und Kent, S.B.H. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **266**, 776-779.
110. Scanlon, D.B., Eefting, A., Lloyd, C.J., Burgess, A.W. und Simpson, R.J. (1987) Synthesis of biologically-active human transforming growth factor- $\alpha$  by fluorenylmethoxycarbonyl solid phase chemistry. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **7**, 516-518.
111. Najib, J., Letailleur, T., Gesquière, J.-C. und Tartar, A. (1996) Solid-phase synthesis of  $\omega$ -Agatoxin IVA, a P-type calcium channel blocker. *J. Pept. Sci.* **2**, 309-317.
112. Camarero, J.A., Cotton, G.J., Adeva, A. und Muir, T. (1998) Chemical ligation of unprotected peptides directly from a solid support. *J. Pept. Res.* **51**, 303-316.
113. Canne, L.E., Walker, S.M. und Kent, S.B.H. (1995) A general method of thioester resin linkers for the use in the solid phase synthesis of peptide- $\alpha$ -thioacids. *THL* **36**, 1217-1220.
114. Schulz, A., Escher, S., Marx, U.C., Rösch, P., Forssmann, W.G. und Adermann, K. (1998) Carboxy-terminal extension stabilizes the topological stereoisomers of guanylin. *J. Pept. Res.* **52**, 518-525.
115. Moroder, L., Besse, D., Musiol, H.J., Rodolph-Böhner, S. und Siedler, F. (1996) Oxidative folding of cystine-rich peptides vs regioselective cysteine pairing strategies. *Biopolymers* **40**, 207-234.
116. Volkmer-Engert, R., Landgraf, C. und Schneider-Mergener, J. (1998) Charcoal surface-assisted catalysis of intramolecular disulfide bond formation in peptides. *J. Pept. Res.* **51**, 365-369.
117. Johnson, J.L. und Craig, E.A. (1997) Protein folding in vivo: Unraveling complex pathways. *Cell* **90**, 201-204.
118. Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
119. Lozanov, V., Guarnaccia, C., Patthy, A., Foti, S. und Pongor, S. (1997) Synthesis and cystein/cystin-catalyzed oxidative folding of the Amaranth  $\alpha$ -amylase inhibitor. *J. Peptide Res.* **50**, 65-72.
120. Husbyn, M., Örning, L., Sakariassen, K.S. und Fischer, P.M. (1997) Peptides corresponding to the second epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor VII: Synthesis, folding and biological activity. *J. Peptide Res.* **50**, 475-482.
121. Yang, Y., Swweeney, W.V., Schneider, K., Chait, B.T. und Tam, J.P. (1994) Two-step selective formation of the three disulfide bridges in the synthesis of the C-terminal epidermal growth factor-like domain in human blood coagulation factor IX. *Protein Science* **3**, 1267-1275.
122. Chau, M.H. und Nelson, J.W. (1991) Direct measurement of the equilibrium between glutathione and dithiothreitol by high performance liquid chromatographie. *FEBS Lett.* **291**, 296-300.
123. Nishio, H., Inui, T., Nishiuchi, Y., De Medeiros, C.L.C., Rowan, E.G., Harvey, A.L., Katoh, E., Ymazaki, T., Kimura, T. und Sakakibara, S. (1998) Chemical synthesis of dendrotoxin-I: Revision of the reported structure. *J. Peptide Res.* **51**, 355-364.
124. Adamson, J.G. und Lajoie, G.A. (1993) Guanidine hydrochloride assists intramolecular disulfide bond formation in cysteine peptides. *Peptides: Biol. Proc. Am. Pept. Symp.*, 13<sup>th</sup>, 44-45. [Edited by: Hodges, R.S. und Smith, J.A., Escom Leiden 1994].

125. Kraulis, P. (1991) Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
126. Merritt, E.A. und Murphy, M.E.P. (1994) Raster 3 D version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta. Crystallogr.* **D50**, 869-873.
127. Forssmann, U., Belen Degado, M., Ugucioni, M., Loetscher, P., Garotta, G. und Baggiolini, M. (1997) *FEBS Lett.* **408**, 211-216.
128. Sticht, H., Escher, S.E., Schweimer, K., Forssmann, W.G., Rösch, P. und Adermann, K. (1999) Solution structure of the human CC chemokine 2: A monomeric representative of the CC chemokine subtype. *Biochemistry* **38**, 5995-6002.
129. Legdeur, M.C.J.C., Beelen, R.H.J., Schuurhuis, G.J., Broekhoven, M.G., van de Loosdrecht, A.A., Tekstra, J., Langenhijzen, M.M.A.C. und Ossenkoppele, G.J. (1997) A functional study on the migration of human monocytes to human leukemic cell lines and the role of monocyte chemoattractant protein-1. *Leukemia* **11**, 1904-1908.
130. Clark-Lewis, I., Vo, L., Owen, P. und Anderson, J. (1994) Chemical synthesis, purification, and folding of C-X-C and C-C chemokines. *Methods in Enzymology* **287**, 233-250.
131. Hackeng, T.M., Griffin, J.H. und Dawson, P.E. (1999) Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10068-10073.
132. Lusti-Narasimhan, M., Power, C.A., Allet, B., Alouani, S., Baconi, K.B., Mermod, J.J., Proudfoot, A.E.I. und Wells, T.N.C. (1995) Mutation of Leu25 and Val27 introduces CC chemokine activity into interleukin-8. *J. Biol. Chem.* **270**, 2716-2721.



## **Erklärung**

Hannover, 1.11.1999

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von August 1997 bis einschließlich November 1999 am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung GmbH (IPF) in Hannover in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Technische Chemie der Universität Hannover unter Betreuung von Herrn Prof. T. Scheper durchgeführt.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß die vorliegende Doktorarbeit selbständig von mir erarbeitet und erstellt wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

## Curriculum Vitae

---

### Zur Person

**Sylvia E. Escher**

Diplom-Chemikerin, promoviert

geboren am 27.09.1972 in Münster (Westf.)

verheiratet

### Hochschulstudium/Berufserfahrung

Oktober 1992 – Juni 1997

Diplomstudiengang Chemie an der Universität Hannover;  
Schwerpunktfach des Hauptstudiums: Organische Chemie;  
Abschluß nach 9 Semestern: Diplom-Chemikerin; Note: sehr gut (1,2).

Dezember 1996 – Juni 1997

Diplomarbeit im Fachbereich Technische Chemie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. T. Scheper. Durchführung am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung (IPF) unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W.G. Forssmann. Thema: Synthese, biologische Aktivität und Dynamik stabilisierter Derivate der topologischen Stereoisomere des Peptidhormons Guanylin.

August 1997 – Dezember 1997

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung

Dezember 1997 – Dezember 1999

Stipendium des Fonds der chemischen Industrie

August 1997 – Dezember 1999

Doktorarbeit am Niedersächsischen Institut für Peptid-Forschung. Thema: Untersuchungen zur Struktur/Aktivitätsbeziehung des humanen CC-Chemokins HCC-2. Abschluß: Dr. rer. nat., Note: sehr gut.

Dezember 1999

Jahrespreis 1999, verliehen vom Institut für Peptid-Forschung für wissenschaftlich besonders relevante Arbeiten.

## Curriculum Vitae

---

### Auslandsaufenthalt

September 1995 – April 1996      Praktikum an der Universität Paris-Süd/Orsay im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Lubineau, Institut für molekulare und multifunktionelle organische Chemie. Thema: Nouvelle voie d'accès stéréoselective aux Allyl 2-acetamido-2-deoxy-glucopyranosids.

### Schulbildung

1979 – 1983      Besuch der Grundschule Ascheberg  
1983 – 1985      Besuch der Realschule Ascheberg  
1985 – 1992      Besuch des altsprachlichen Privaten Gymnasiums Canisianum in Lüdinghausen. Abschluß Abitur, Note sehr gut (1,5).

### Besondere Kenntnisse

Fremdsprachen      Französisch sehr gut Kenntnisse, Englisch gute Kenntnisse

Peptidsynthesestrategien      Schutzgruppentaktik: Fmoc-Chemie, Boc-Chemie  
Segmentkopplung: *native chemical ligation*

Analytik      RP-HPLC, Kapillarzonenelektrophorese, Gelelektrophorese,  
Massenspektroskopie (ES-MS, LC-MS)

EDV      Programme: Word, Excel, Origin, Corel Draw, analytische  
Anwendungsprogramme  
Betriebssystem: Windows

### Freizeitinteressen

Akkordeon  
Inline skating  
Volleyball/Beachvolleyball

## Veröffentlichungen

---

### Artikel

- 1999 Escher, S.E., Sticht, H., Forssmann, W.G., Rösch, P. und Adermann, K. (1999) Synthesis and characterisation of the human CC chemokine HCC-2. *J. Pept. Res.* **54**, 505-513.
- Sticht, H., Escher, S.E., Schweimer, K., Forssmann, W.G., Rösch, P. und Adermann, K. (1999) Solution structure of the human chemokine HCC-2: A monomeric representative of the CC-chemokine subtype. *Biochemistry* **38**, 5995-6002.
- 1998 Schulz, A., Escher, S., Marx, U.C., Rösch, P., Forssmann, W.G. und Adermann, K. (1998) Carboxy-terminal extension stabilizes the topological stereoisomers of guanylin. *J. Pept. Res.* **52**, 518-525.
- 1997 Lubineau, A., Escher, S., Alais, J. und Bonnaffé, D. (1997) Stereoselectivity control in anomeric O-alkylation. Application to the synthesis of C<sub>2</sub> symmetric glycoconjugates. *THL* **38**, 4087-4090.

### Posterbeiträge

- 1999 Adermann, K., Escher, S.E., Klodt, J., Marx, U.C. und Schulz, A. (1999) Connecting diarrhoea and stereochemistry: Structure-function analysis of the guanylyl cyclase activity peptide hormones guanylin and uroguanylin. Second Lower-Saxony-Israel Symposium on the Life Sciences.
- 1998 Escher, S., Schulz, A., Marx, U.C., Rösch, P., Forssmann, W.G. und Adermann, K. Structure-activity relationship and design of stabilized guanylin stereoisomers. In: *Peptides 1998* (Bajusz, S., Hudecz, F. Eds.) 416-417.